



HAL
open science

Effet de la dérégulation de la voie Sonic Hedgehog sur les réponses aux dommages de l'ADN et la prédisposition aux cancers

Aurélie Charazac

► **To cite this version:**

Aurélie Charazac. Effet de la dérégulation de la voie Sonic Hedgehog sur les réponses aux dommages de l'ADN et la prédisposition aux cancers. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV006 . tel-01267278

HAL Id: tel-01267278

<https://theses.hal.science/tel-01267278v1>

Submitted on 4 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Aurélie CHARAZAC

Thèse dirigée par **Thierry DOUKI** et
codirigée par **Walid RACHIDI**

préparée au sein du **Laboratoire de Lésions des Acides Nucléiques**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Effet de la dérégulation de la voie sonic hedgehog sur les réponses aux dommages de l'ADN et la predisposition aux cancers.

Thèse soutenue publiquement le **29 octobre 2015**
devant le jury composé de :

Pr. Alain TAIEB

Professeur-Praticien Hospitalier à l'Université de Bordeaux, Rapporteur

Pr. Robert BAROUKI

Professeur à l'Université Paris Descartes, Rapporteur

Pr. Odile DAMOUR

Praticien Hospitalier au Groupe Hospitalier Edouard Herriot, Examineur

Dr. Pablo RADICELLA

Directeur de recherche au CEA de Fontenay-aux-Roses, Examineur

Pr. Jean-Luc LENORMAND

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Président du jury

Dr. Thierry DOUKI

Directeur de recherche au CEA de Grenoble, Directeur de thèse

Dr. Walid RACHIDI

Maître de conférences à l'Université Joseph Fourier, Co-Directeur de thèse



'Les folies sont les seules choses qu'on ne regrette jamais.'

O. WILDE

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mes rapporteurs, le Pr Alain TAIEB et le Pr Robert BAROUKI d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie aussi les autres membres de mon jury de thèse : le Pr Odile DAMOUR, le Dr Pablo RADICELLA ainsi que le Pr Jean-Luc LENORMAND.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Thierry MAGNALDO, le Dr Dominique ARDAIL et le Pr Michel SEVE qui par leurs expertises et leurs conseils m'ont permis d'ouvrir les perspectives de ce travail.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Dr Thierry DOUKI, pour son accompagnement tout au long de cette thèse, pour sa confiance et pour le partage de son expérience scientifique.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans l'encadrement de mon co-directeur de thèse, le Dr Walid RACHIDI. Je le remercie pour sa confiance ainsi que pour la liberté qu'il m'a accordée me permettant de gagner en autonomie. Merci pour ta capacité d'analyse et tes très nombreuses connaissances qui m'ont permis de progresser et ont su répondre à mes préoccupations.

Ce projet scientifique a fait appel à plusieurs collaborations. Merci aux équipes du Dr Michel MARTIN et du Dr Jérôme LAMARTINE pour les discussions sur le projet LOWRADSENSOR. Je remercie également la start-up LX-Repair dirigée par le Dr Sylvie SAUVAIGO pour les études par biopuces. Enfin, merci à l'équipe Prométhée de l'Institut de Biologie et de Pathologie de Grenoble pour leur expertise, leur accompagnement et leur aide durant l'été que j'ai passé à leur côté. Je remercie plus particulièrement Sylvia LEHMANN pour sa disponibilité ainsi que pour ses précieuses explications sur la protéomique.

J'adresse également mes remerciements au chef du LAN, le Dr Jean-Luc RAVANAT, pour son accueil, sa bonne humeur et son soutien (tant pour les manip que pour mes petits soucis informatiques).

Je remercie sincèrement Zohra TERMACHE. Merci de toute l'aide que tu m'as apportée du point de vue administratif bien sûr, mais aussi pour ta sympathie et ton amitié qui m'ont touchée quand j'en avais le plus besoin.

Je souhaite également remercier tous les étudiants, thésards, post-docs, et autres membres du labo qui m'ont aidé à traverser ces trois années de thèses. Il est difficile de citer tout le monde mais merci à Ewa, Momo, Guillaume (pour votre bonne humeur communicative pendant ma première année de thèse), Christophe (mais on est à Mâcon ?!), Silvestre (Vive le mi-LAN assez !), Sarah, Sylvain (pour ta précieuse aide lors de mes manips puces, mais surtout pour ton amitié), David (pour les papotages au labo rose, les matinées en pièce culture, et tes ronchonnements qui me font toujours autant rire), Paul (le thésard du rond-point qui a malgré tout toujours été disponible lorsque j'avais besoin d'irradier mes cellules, qui a su égayer notre congrès grec et avec qui j'ai pu partager les doutes inhérents au statut de thésard), Camille, Nadège et Amandine (pour les brunchs dominicaux, les sorties Ikea du jeudi soir, les soirées macarons/discussions, mais surtout pour votre amitié). Enfin, comment écrire une page de remerciements au LAN sans parler de la sacro-sainte pause-café où l'on partage la bonne humeur du matin, les gâteaux et les flashes infos. Ce moment quotidien d'échanges m'a permis de ne pas avoir besoin de psy avant ma dernière année de thèse, alors merci à tous ceux qui y ont participé jusqu'au bout...

A côté de la vie de labo, je tiens aussi à remercier tous mes amis : Alice et Julien (les vrais amis restent malgré la distance), Julien (la vie nous a fait traverser des périodes de bonheur et d'autres un peu plus sombres, mais l'amitié qui nous lie reste intacte), Guillaume (merci de m'avoir si souvent prêté ta femme), Benoît (merci de m'avoir supportée pendant les heures sombres de la rédaction, et d'avoir toujours su trouver les mots justes pour me rassurer et me motiver), Anthony (faut-il réellement mettre des mots sur ces moments?), Margaux (Meuf, je promets de toujours tenir la corde pour toi...), Morgane (Biche, je te remercie pour toutes ces discussions, ces délires et ces moments de douces folies (c'est tchi !), mais surtout pour avoir embelli ces trois années...).

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille. Merci à mes grands-mères, ainsi qu'à Julien et Alicia, pour leur soutien indéfectible. Merci papa et maman pour votre confiance, votre tendresse et votre amour qui m'ont permis de ne jamais abandonner, même dans les moments les plus durs.

Table des matières

Liste des abréviations	5
Liste des figures	9
Liste des tableaux	13
Avant-propos	15
Etude bibliographique	17
I - Les réponses aux dommages de l'ADN (DDR)	19
A - Les dommages de l'ADN	19
1) Les sources endogènes et leurs lésions associées.....	19
2) Les sources exogènes et leurs lésions associées.....	21
B - Les réponses aux dommages de l'ADN	23
1) Le signalement des dommages	23
2) Les réponses effectives du DDR.....	27
C - Les systèmes de réparation de l'ADN.....	33
1) La réparation par excision de bases.....	33
2) La réparation par excision de nucléotides.....	37
3) La réparation par suture non homologue	39
4) La réparation par recombinaison homologue.....	41
5) La réparation des mésappariements	41
D - Implications pathologiques de défauts dans la DDR	43
II - Le syndrome de Gorlin	47
A - Le syndrome de Gorlin.....	47
1) Historique, généralités et signes cliniques.....	47
2) Etiologie	53
B - La voie sonic hedgehog (SHH)	54
1) Historique et généralités.....	54
2) Fonctionnement	55
3) Modèles et rôles physiologiques	61
4) Implications pathologiques de défauts dans la voie SHH	63
C - La peau	65
1) Généralités et structure	65
2) Les cancers cutanés	68
3) Cas des fibroblastes issus des patients Gorlin	69

III - La radiosensibilité	71
A - Les rayonnements ionisants	71
1) Définitions et généralités	71
2) Conséquences : de la cellule à l'organisme	72
3) Cas des faibles doses d'irradiation	73
B - La radiosensibilité humaine.....	75
1) Définition et généralités	75
2) Radiosensibilité et réparation de l'ADN	76
Objectifs	79
Résultats	83
I - Caractérisation des fibroblastes Gorlin	85
A - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCH1</i> sur l'expression des gènes de la voie de signalisation SHH	87
B - Evaluation de la survie clonale à long terme après exposition à différents stress.....	87
1) Effet des rayonnements ionisants	89
2) Effet des UVB	91
3) Effet des UVA.....	91
4) Effet de la bléomycine	91
C - Conclusion.....	92
II - Caractérisation de la réparation par la voie BER et stress oxydant	95
A - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCH1</i> sur l'expression des gènes de la voie BER...95	
1) Statut de la voie BER au niveau basal	95
2) Etude de la réponse de la voie BER par différentes doses de rayonnements	97
3) Etude de la stimulation de la voie BER après différentes doses de rayonnements	103
B - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCH1</i> sur l'activité d'excision-resynthèse des petites lésions associées au BER.....	105
1) Activité enzymatique de la voie BER au niveau basal	107
2) Activité enzymatique de la voie BER après exposition à une forte dose de rayonnement ionisant	107
C - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCH1</i> sur la production de l'anion superoxyde	109
1) Statut de la production de l'anion superoxyde au niveau basal	111
2) Effet de différentes doses de rayonnements ionisants.....	111
D - Conclusion.....	113

III - Etat des autres systèmes de réparations (NHEJ, HR, NER)	117
A - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCHI</i> sur l'expression des gènes des autres voies de réparation (NHEJ, HR, NER)	117
1) Statut au niveau basal	117
2) Effet de différentes doses de rayonnements ionisants.....	119
3) Etude de la stimulation des autres voies de réparation après différentes doses de rayonnements	122
B - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCHI</i> sur l'efficacité de réparation du NER	123
C - Conclusion.....	125
IV - Etat des autres paramètres de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR)	127
A - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCHI</i> sur l'expression des gènes de signalisation du DDR.....	127
1) Statut au niveau basal	127
2) Effet de la réponse de la signalisation par différentes doses de rayonnements ionisants	129
3) Etude de l'effet de l'irradiation sur l'expression des gènes de signalisation du DDR	131
B - Evaluation du rôle de la mutation de <i>PTCHI</i> sur la mort cellulaire programmée	133
C - Conclusion.....	134
V - La protéomique, un générateur d'hypothèse	135
A - Etude au niveau basal.....	136
B - Validation par western blot	138
Discussion	139
Conclusions & Perspectives	153
Matériels & Méthodes	159
I - Matériels	161
II - Méthodes	163
A - Culture cellulaire.....	163
1) Passage, maintien et récolte	163
2) Conservation.....	163
B - Stress cellulaire.....	164
1) Irradiation ionisante	164
2) Irradiation UVA ou UVB	164
3) Stress chimique.....	164
C - Caractérisation à l'aide du test de survie clonogénique	165

D - Etude du phénotype réparation des fibroblastes.....	165
1) Etude transcriptomique	165
2) Etude de l'activité d'excision-resynthèse	167
E - Etude de la production de l'anion superoxyde	168
F - Etude de la mort cellulaire programée.....	169
G - Etude protéomique et validation de gènes	169
1) Etude protéomique	169
2) Etude par western blot.....	172
H - Analyse statistique	173
Bibliographie.....	175
Annexes.....	191
Annexe 1.....	193
Annexe 2.....	196
Annexe 3 : Tableau des primers utilisés pour la RT-qPCR	198
Annexe 4 : Article soumis à DNA Repair	199
Annexe 5 : Communications scientifiques,encadrements de stagiaires et articles.....	213

Liste des abréviations

6-4 pp	Photoproduit 6-4
8-oxoG	8-oxoguanine
AAG	ADN glycosylase alkyladénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	A-purinique ou A-pyrimidique
APE1	AP endonucléase 1
AT	Ataxie telangiectasie
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BaP	Benzo-[a]-pyrène
BCC	Basal cell carcinoma (Carcinome basocellulaire)
BER	Base excision repair (Réparation par excision de bases)
CDK	Cyclin dependant kinase
CE	Carcinome épidermoïde
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CKI	Cycline dependent kinase inhibitor
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer (Dimère de pyrimidine)
CS	Cockayne syndrome
DDR	DNA damage response (Réponse aux dommages de l'ADN)
DHH	Desert hedgehog
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA-PK	DNA protein kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GG-NER	Global genomic nucleotide excision repair (Réparation globale du génome par excision de nucléotides)
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique

HH	Hedgehog
HHIP	Hedgehog interacting protein
HPE	Holoproencéphalie
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HR	Homologous recombination (Réparation par recombinaison homologue)
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IGF	Insulin growth factor
IHH	Indian hedgehog
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation
M	Mitose
MMR	Mismatch repair (Réparation des mésappariements)
MYH	MutY homolog
NBCCS	Nævomatose basocellulaire
NBS	Nijmegen breakage syndrome
NER	Nucleotide excision repair (Réparation par excision de nucléotides)
NHEJ	Non homologous end joining (Réparation par suture non homologue)
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PARP2	Poly(ADP-ribose) polymerase 2
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K-like	Phosphatidylinositol 3-kinase like
PML	Promyelocytic leukemia protein
PNK	Polynucléotide kinase
PTCH1	Patched homolog 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFC	Replication factor C
RI	Rayonnement ionisant
ROS	Reactive oxygen species (Espèce reactive de l'oxygène)
RPA	Protéine de réplication A
S	Synthèse
SCID	Severe combined immunodeficiency

SHH	Sonic hedgehog
SMO	Smoothened
SNP	Single nucléotide polymorphism
SOD	Superoxyde dismutase
SSBR	Single strand break repair
SUFU	Suppressor of fused
SVF	Sérum de veau foetal
TC-NER	Transcription coupled NER (Réparation par excision de nucléotide durant la transcription)
TDG	ADN glycosylase Thymine
UNG	Uracil DNA glycosylase
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XP	Xeroderma pigmentosum
XPAB2	XPA binding protein 2

Liste des figures

Figure 1 : Les dommages de l'ADN et leurs sources associées	20
Figure 2 : La cascade de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN	24
Figure 3 : La régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline-Cycline dependant kinase.....	26
Figure 4 : Lien entre régulation du cycle cellulaire et réponse aux dommages de l'ADN.	28
Figure 5 : Représentation des deux voies de signalisation de la mort cellulaire programmée	30
Figure 6 : La voie de réparation par excision de bases (BER) et la voie de réparation des cassures simple brin (SSBR)	34
Figure 7 : La voie de réparation par excision de nucléotides (NER).....	36
Figure 8 : La voie de réparation par suture non homologue (NHEJ)	38
Figure 9 : La voie de réparation par recombinaison homologue (HR).....	40
Figure 10 : La voie de réparation des mésappariements (MMS).....	42
Figure 11 : Exemples de pathologies liées à des défauts dans la signalisation ou dans les réponses effectives de la réponse aux dommages de l'ADN	44
Figure 12 : Les critères majeurs de diagnostic du syndrome de Gorlin	48
Figure 13 : Structure de la protéine PTCH1	52
Figure 14 : La voie de signalisation sonic hedgehog.....	58
Figure 15 : Les modulateurs de la voie sonic hedgehog.....	60
Figure 16 : Lien entre régulation du cycle cellulaire et voie sonic hedgehog	62
Figure 17 : Implication de la voie sonic hedgehog dans la survenue des cancers.....	64
Figure 18 : Coupe de peau de la main au microscope optique	66
Figure 19 : Conséquences des rayonnements ionisants sur la cellule et leurs effets au niveau de l'organisme	74
Figure 20 : Représentation des modèles de relation dose-effet après irradiation à des faibles doses	74
Figure 21 : La voie de signalisation sonic hedgehog et ses principaux acteurs.....	86

Figure 22 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie SHH de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal.....	87
Figure 23 : Courbes de survie de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) après exposition à des doses croissantes de A) rayonnement ionisant et B) rayonnement ultraviolet B	88
Figure 24 : Courbes de survie de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) après exposition à des doses croissantes de A) rayonnement ultraviolet A et B) bléomycine	90
Figure 25 : La voie de réparation par excision de base (BER), la voie de réparation des cassures simple brin (SSBR) et leurs principaux acteurs	96
Figure 26 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie BER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal.....	98
Figure 27 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie BER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy.....	100
Figure 28 : Le principe de la biopuce plasmide.....	104
Figure 29 : Mesure de l'activité d'excision-resynthèse à l'aide de la biopuce plasmide dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal	106
Figure 30 : Exemple de résultats obtenus sur biopuce plasmide	106
Figure 31 : Mesure de la stimulation de l'excision-resynthèse à l'aide de la biopuce plasmide dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 24h après une irradiation de 6 Gy	108
Figure 32 : Mesure de la production de l'anion superoxyde par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) au niveau basal	110
Figure 33 : Vérification par microscopie de fluorescence de la production de l'anion superoxyde dans la lignée normale (GM00730) et les trois lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300)	110
Figure 34 : Mesure de la production de l'anion superoxyde par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 25 minutes après un rayonnement γ de 0,1 Gy, 2 Gy ou 6Gy	112

Figure 35 : Les voies de réparation des cassures double brin et leurs principaux acteurs : à gauche, la voie de recombinaison homologe (HR) et à droite, la voie de réparation par suture non homologue (NHEJ)	116
Figure 36 : Mesure de l'expression de certains acteurs des voies NHEJ, HR et NER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal	118
Figure 37 : Mesure de l'expression des principaux acteurs des voies NHEJ, HR et NER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy	120
Figure 38 : Etude de la cinétique de réparation par la voie NER par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem	124
Figure 39 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la signalisation de la DDR dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal	128
Figure 40 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la signalisation de la DDR dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4 h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy	130
Figure 41 : Mesure de l'apoptose par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) au niveau basal	132
Figure 42 : Etude de l'expression protéique de la superoxyde dismutase [Cu-Zn] et de la GPX4 dans la lignée normale GM00730, la lignée Gorlin GM01552 et la lignée HeLa, sans irradiation : A) quantification et B) images caractéristiques.....	138
Figure 43 : Modèle d'explication de l'apparition du phénotype des patients Gorlin.....	152
Figure 44 : Positionnement des mutations présentes au sein des lignées Gorlin de notre étude	162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales anomalies retrouvées chez les patients atteints du syndrome de Gorlin classées en fonction des différents organes atteints.....	50
Tableau 2 : Tableau comparatif des principaux acteurs de la voie sonic hedgehog entre la drosophile et l'Homme.....	56
Tableau 3 : Caractéristiques des lignées primaires utilisées lors de cette étude	86
Tableau 4 : Rapports entre les expressions des principaux gènes du BER : 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement.....	102
Tableau 5 : Rapports entre les expressions de certains gènes du NEHJ, du HR et du NER à 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement.....	124
Tableau 6 : Rapports entre les expressions des gènes de signalisation de la DDR à 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement.....	132
Tableau 7 : Caractéristiques des lignées primaires utilisées lors de cette étude	161

Avant-propos

ADN, trois lettres pour désigner une molécule fragile, mais pourtant essentielle à la vie. En effet, l'ADN ou acide désoxyribonucléique assure deux fonctions fondamentales : la synthèse des protéines qui participent à tous les processus biologiques et la transmission fidèle de l'information génétique. Sa découverte eut lieu en 1869 par le physicien-biologiste suisse Friedrich Miescher (1), mais ce n'est qu'en 1953 que Watson et Crick parvinrent à résoudre sa structure en double hélice (2). Depuis, les découvertes sur ce polymère et son intégrité s'accumulent.

L'ADN est en permanence soumis à des agressions susceptibles de modifier sa séquence et donc l'information pour laquelle elle code. Chez l'Homme, les conséquences de ces lésions peuvent être multiples : allant de l'évolution de l'espèce à l'apparition des cancers. Afin de conserver son intégrité, la cellule a donc développé un ensemble complexe de voies de signalisation nommé la réponse aux dommages de l'ADN (DDR pour DNA damage response) dont l'une des issues possibles est la réparation de l'ADN. De nombreuses maladies, dont le Xeroderma Pigmentosum (XP) sont dues à des déficiences dans cette DDR et plus précisément ici dans l'un des systèmes de réparation de l'ADN. Ces patients présentent une hyperphotosensibilité et une forte propension à développer des cancers. Ce genre de symptômes se retrouve aussi dans d'autres maladies comme le syndrome de Gorlin où les patients présentent à la fois une forte sensibilité aux rayonnements ionisants et une forte probabilité à développer des cancers, notamment des carcinomes basocellulaires.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier le lien entre la DDR et la voie de signalisation mutée chez les patients Gorlin afin de mettre en évidence une possible défaillance des systèmes de réponses aux dommages de l'ADN chez ces patients.

Etude bibliographique

I - Les réponses aux dommages de l'ADN (DDR)

Chaque jour, les 75 000 milliards de cellules qui composent l'organisme subissent chacune en moyenne de 1 000 à 10 000 lésions au niveau de leurs ADN (3).

Etant donné les effets potentiellement dévastateurs de l'instabilité génomique engendrée par ces dommages (cancer, vieillissement, mort), les cellules ont développé un réseau de signalisation pour une réponse spécifique aux différentes lésions de l'ADN connu sous le nom de réponse aux dommages de l'ADN (4). Ces lésions peuvent découler de contraintes endogènes résultant d'erreurs de réplication de l'ADN et des sous-produits du métabolisme cellulaire, mais aussi de sources exogènes comme les rayonnements ionisants et ultraviolets.

Nous allons donc aborder dans la première partie de cette étude bibliographique la description des différentes sources de dommages de l'ADN. Nous nous intéresserons ensuite à la mise en place de la cascade de signalisation de la DDR pouvant mener à différentes réponses effectives : arrêt du cycle cellulaire, modulation de la transcription de certains gènes, activation de la réparation de l'ADN ou apoptose. Enfin, les implications pathologiques liées à un défaut de la DDR seront abordées.

A - Les dommages de l'ADN

1) Les sources endogènes et leurs lésions associées

La majorité des altérations endogènes touchant l'ADN résulte en de petites lésions n'impactant que faiblement la structure de la double hélice d'ADN (Figure 1).

La grande majorité de ces lésions sont la conséquence de l'activité métabolique normale des cellules en présence d'oxygène. En effet, bien qu'indispensable à la vie, l'oxygène possède aussi un effet délétère sur l'organisme : c'est le paradoxe de la vie en aérobie (5). Le métabolisme oxydatif dans les mitochondries, ainsi que la peroxydation des lipides génèrent des radicaux libres (ROS pour reactive oxygen species). La cellule se retrouve donc en présence de radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$), de peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et d'anions superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) qui sont immédiatement pris en charge par un système de détoxification complexe comprenant notamment la superoxyde dismutase (6). Ces radicaux libres, que l'on nomme stress oxydant, vont mener à l'apparition de dommages oxydatifs dont la nature et le rendement dépendent de la nature des espèces oxydantes (7). Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent provoquer

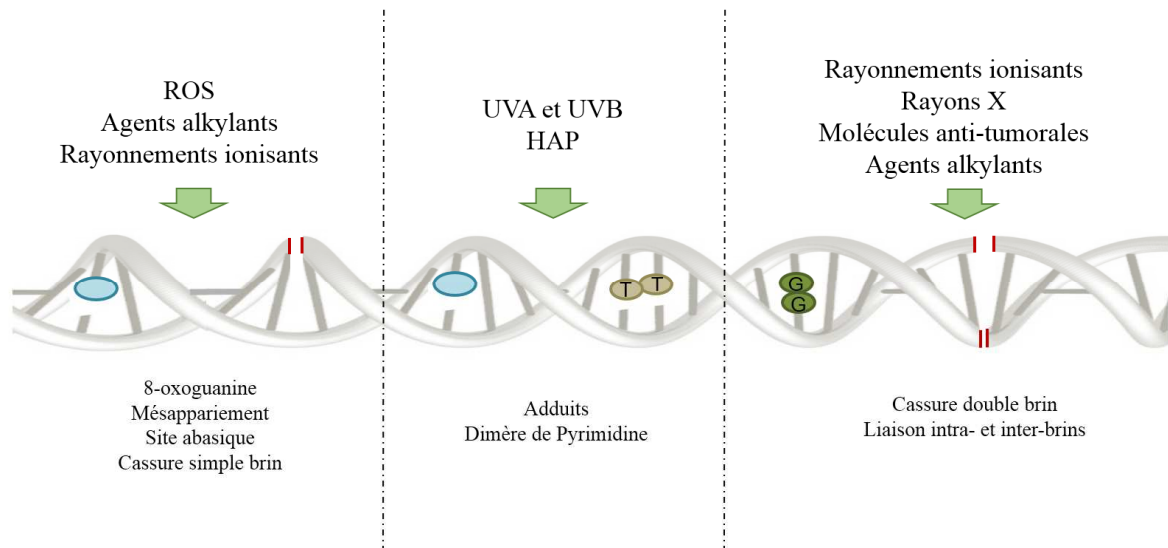


Figure 1 : Les dommages de l'ADN et leurs sources associées. Les ROS, les agents alkylants ainsi que les rayonnements ionisants auront tendance à créer des mésappariements, des sites abasiques, des 8-oxoguanines et des cassures simple brin. Les rayonnements ultraviolets, ainsi que certains produits chimiques comme les HAP formeront des dimères de pyrimidines, ainsi que des adduits volumineux. Enfin, les rayonnements ionisants, les rayons X, les molécules anti-tumorales ainsi que les agents alkylants créeront des cassures double brin et des liaisons intra- ou inter-brins.

D'après De Boer *et al.* (8).

divers types de lésions comme des cassures simple brin de l'oxygène peuvent provoquer divers types de lésions comme des cassures simple brin de l'ADN, des pontages ADN-protéines, des modifications et des pertes de bases. Parmi les modifications, on observe des désaminations, ainsi que la formation de diol de thymine et d'uracile. On retrouve aussi des lésions oxydatives dont la plus abondante est la 8-oxoguanine (8-oxoG) (9). La perte de bases peut avoir lieu spontanément ou après une oxydation ou une alkylation de l'ADN. Elle est due à une hydrolyse de la liaison glycosidique formant ainsi un site abasique.

L'activité métabolique cellulaire peut aussi entraîner des défauts de réplifications (3) menant à des mésappariements ou à l'incorporation de nucléotides modifiés par oxydation (10).

L'ADN possède aussi une instabilité intrinsèque. En effet, l'eau à 37°C est aussi responsable de la désamination spontanée de bases qui vont transformer l'adénine en hypo-xanthine, la guanine en xanthine, la cytosine en uracile et la 5 Methyl-cytosine en thymine entraînant une altération de l'information codante (11).

2) Les sources exogènes et leurs lésions associées

Les dommages d'origines exogènes sont ceux provoqués par des agents externes à la cellule comme les rayonnements ultraviolets (UV), les rayonnements ionisants (RI), la fumée de cigarette ou encore les traitements de chimiothérapie (Figure 1). La majorité de ces altérations résulte en l'apparition de lésions volumineuses ayant un impact sur la structure de la double hélice d'ADN.

a. Stress chimiques

Il existe de nombreux agents chimiques qui peuvent endommager l'ADN. En exemple, on peut citer les agents alkylants ou les drogues antitumorales comme le cisplatine ou la bléomycine.

Comme leurs noms l'indiquent, les agents alkylants sont à l'origine d'ajout de groupement alkyle. Ces alkylations peuvent être directes ou indirectes. Dans ce dernier cas, l'agent génotoxique nécessite une métabolisation par la cellule avant de pouvoir interagir avec la molécule d'ADN. Ceci se produit par exemple avec la fumée de cigarette contenant notamment des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le benzo-[a]-pyrène (BaP), le métabolite

de l'un des HAP les plus nocifs, réagit alors avec l'ADN pour donner l'adduit volumineux du BaP-diol époxyde (12). La métabolisation du BaP peut aussi générer des ROS induisant la formation de bases oxydées et des cassures de brins.

En revanche, le cisplatine va réaliser une alkylation directe. Ce composé utilisé en traitement chimiothérapeutique est à l'origine de la formation de liaisons intra- ou inter-brins au sein de la double hélice d'ADN (13, 14). Il peut également donner lieu au relargage d'espèces réactives de l'oxygène et à la formation de dommages oxydatifs (15).

Enfin, certains agents chimiques comme la bléomycine peuvent créer des cassures double brin de l'ADN.

b. Stress physiques

Les agents mutagènes physiques correspondent principalement aux rayonnements ultraviolets provenant du soleil, ou ionisants dus aux rayonnements cosmiques, aux éléments radioactifs présents dans le sol, mais aussi aux traitements médicaux.

Parmi les trois catégories de rayonnements UV, seuls les UVA et les UVB sont capables de pénétrer l'atmosphère de la Terre. En effet, les UVC, les UV les plus énergétiques et donc les plus nocifs, sont complètement filtrés par la couche d'ozone et n'atteignent donc pas la surface de la Terre.

Les UVB vont provoquer différentes lésions au niveau de la molécule d'ADN comme les dimères de pyrimidines (CPD correspondant à une liaison TT, CC, TC ou CT du même brin d'ADN) ou les photoproduits 6-4 (6-4PP correspondant à une liaison TC). Dans une moindre mesure, ces UVB peuvent aussi engendrer la formation de petites lésions oxydatives comme la 8-oxoG.

Les UVA, quant à eux, ont été pendant longtemps associés exclusivement à la formation de dommages oxydatifs (16). En effet, ils sont faiblement absorbés par les bases de l'ADN et excitent donc plus facilement les chromophores cellulaires comme les mélanines et le tryptophane (17). C'est l'émission d'énergie entraînée par la désexcitation de ces photosensibilisateurs qui va mener à la formation d'espèces réactives de l'oxygène comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou l'anion superoxyde (O_2^-) (18). Cependant des études ont démontré qu'une irradiation par les UVA conduisait à la formation de six fois plus de CPD que de 8-oxoG dans l'ADN de fibroblastes (19). Ce même résultat est retrouvé au niveau de la peau (20).

c. Cas des rayonnements ionisants

De par leur nature, les rayonnements ionisants peuvent induire des dommages dans les différents compartiments cellulaires, dont la molécule d'ADN (21). Ils peuvent avoir un effet direct résultant du dépôt d'énergie sur le substrat conduisant à une ionisation de ce dernier, ou un effet indirect résultant de l'interaction du rayonnement avec une molécule d'eau. Cette radiolyse de l'eau est responsable d'environ 75% des interactions des rayonnements ionisants avec la matière (22). Elle engendre la formation de deux radicaux hautement réactifs, mais possédant une durée de vie très courte : OH^\cdot et H^\cdot . Ces ions ainsi formés vont réagir et mener à la formation d'espèces réactives de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces ROS vont entraîner l'apparition de coupures simple ou double brin de la molécule d'ADN, des modifications de bases comme l'apparition de diols de thymine ou d'uracile ou aussi de 8-oxoguanine. On retrouve aussi des pontages ADN-protéines ainsi que des pertes de bases (3).

En ce qui concerne les effets directs des rayonnements ionisants, on retrouve principalement la formation de bases modifiées provenant de l'arrachement d'électrons formant ainsi un cation radical. On peut notamment citer le 2-désoxyribose, le 2'-désoxyguanosine et le 2'-désoxyadénosine. Enfin, les rayonnements ionisants sont aussi susceptibles de créer des lésions complexes telles que les adduits cytosine dCyd341 (23).

B - Les réponses aux dommages de l'ADN

1) Le signalement des dommages

La présence d'une lésion au sein de la molécule d'ADN sera immédiatement repérée et prise en charge par des protéines spécialisées. Ces senseurs vont activer des transducteurs qui amplifieront le signal et permettront aux effecteurs d'engager la cellule vers son destin : la modulation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription de certains gènes, la réparation de l'ADN ou bien l'apoptose (Figure 2) (24). Chacun de ces acteurs sera recruté de manière spatio-temporelle précise au cours de la DDR (3).

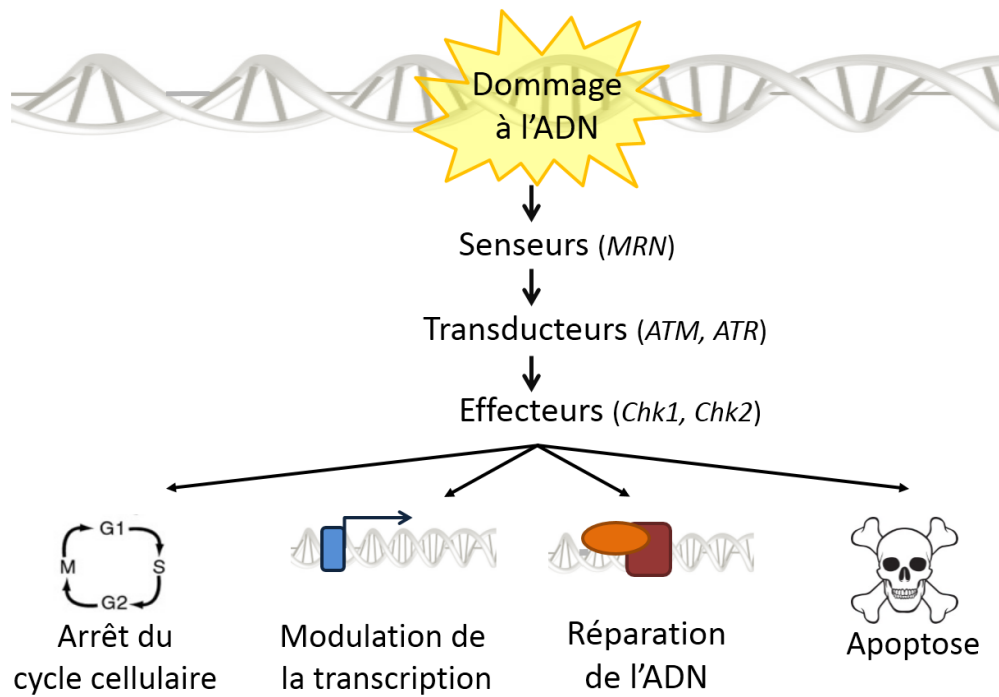


Figure 2 : La cascade de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN. Le dommage sera dans un premier temps reconnu par les senseurs qui activeront des transducteurs. Ces derniers permettront d'amplifier le signal jusqu'aux effecteurs. La cellule stoppera donc son cycle cellulaire afin de pouvoir moduler la transcription de certains gènes, de réparer son ADN ou d'entrer en apoptose.

Afin de protéger efficacement l'intégrité du génome, tous les types de lésions doivent être reconnus par les senseurs. A ce jour, 5 complexes moléculaires permettent ce signalement : PARP1 et PARP2, MRN, Ku70-Ku80, RPA, 9-1-1 (3, 24).

Les cassures de l'ADN simple et double brin peuvent être reconnues par les protéines PARP1 et PARP2 (Poly (ADP-Ribose) polymerase 1 et 2) entraînant la synthèse de chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) (3). Cette PARylation aura notamment lieu sur les histones menant à la réorganisation de la chromatine et au recrutement du complexe de réparation de l'ADN au site de la cassure simple brin (3, 25). Dans le cas des cassures double brin, il semble que PARP1 participe à l'accumulation du complexe MRN à travers l'activation de la protéine kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (26).

Les cassures double brin peuvent aussi être prises en charge par d'autres mécanismes comme les complexes MRN (MRE11-RAD50-NBS1) ou le complexe Ku70-Ku80. Ces deux complexes entrent en compétition pour la signalisation de ce type de dommage. Le complexe MRN permet la résection de la lésion et participe au recrutement de la protéine ATM (3). La création du complexe hétérodimérique Ku70-Ku80 permet l'activation de la protéine kinase-ADN dépendante DNA-PK. Ce complexe permettra d'initier spécifiquement la voie de réparation par suture non homologue (27).

Lors du blocage des fourches de réplication, la formation de l'ADN simple brin par résection des cassures double brin conduira à l'accumulation du complexe hétérotrimérique RPA (Protéine de réplication A) (3). Ce complexe va permettre de stabiliser l'ADN simple brin et d'activer la protéine ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (3).

Enfin, le complexe 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) permet l'activation de la protéine ATR (3).

La détection des lésions a donc pour effet d'activer l'une des deux voies majeures de transduction du signal de dommages chez les mammifères : la voie ATM ou la voie ATR. Ces protéines ATM et ATR font partie de la famille des PI3K-like kinases (Phosphatidylinositol 3-kinase like) (3). Bien que de récentes études aient montré un chevauchement de ces voies, on considère le plus souvent qu'ATM est le transducteur des cassures double brin (28). De son côté, ATR est plus connu pour être activé suite à la présence de cassures simple brin ou d'un blocage de fourche de réplication (28). Suite à leur activation par phosphorylation, ces deux voies vont initier une cascade d'activation propageant et amplifiant le signal jusqu'aux effecteurs.

Ces protéines peuvent aussi participer directement à la phosphorylation de la protéine p53, considérée bien souvent comme la gardienne du génome (29).

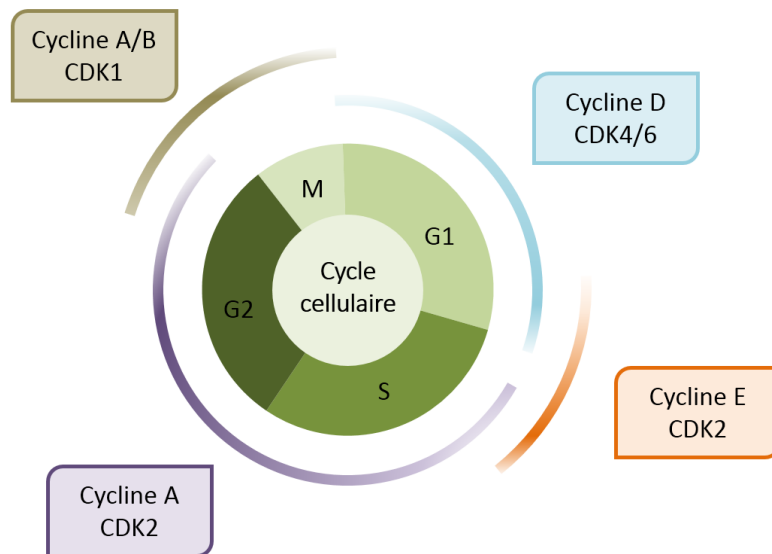


Figure 3 : La régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline-Cycline dépendant kinase. Le complexe Cycline D-CDK4/6 permet la progression à travers la phase G1 du cycle cellulaire. Le complexe Cycline E-CDK2 permet le passage de la phase G1 à la phase S tandis que le complexe Cycline A-CDK2 régule les phases S/G2. Enfin, le complexe cycline A/B-CDK1 autorise le passage de la phase G2 à la mitose.

D'après Poehlmann *et al.* (30).

Enfin, les effecteurs vont faire évoluer la cellule en fonction du taux de dommage. Parmi les plus connus, on retrouve les sérines/thréonines kinases Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinase 1 et 2) qui vont être activées à travers des mécanismes distincts (28). La première sera activée par phosphorylation à l'aide de la protéine ATR. La seconde sera elle aussi activée par phosphorylation grâce à l'action d'ATM (28). Les multiples cibles de ces effecteurs sont décrites plus en détail dans les paragraphes suivants.

2) Les réponses effectives du DDR

a. L'arrêt du cycle cellulaire

Au cours de sa vie, la cellule suit un rythme de croissance et de développement aboutissant à la naissance de deux cellules filles génétiquement identiques. Ce cycle cellulaire est un procédé ubiquitaire et complexe, impliqué dans le développement de l'organisme. Il peut se décomposer en quatre phases se succédant toujours dans le même ordre : Gap 1 (G1), Synthèse (S), Gap 2 (G2) et Mitose (M) (Figure 3). Les phases G1 et G2 permettent de préparer la cellule à deux événements critiques : la synthèse de l'ADN et la mitose (31). Les cellules ont toutefois la possibilité de sortir du cycle cellulaire en entrant en phase de quiescence également nommée G0 (Gap 0) (31).

La progression des cellules à travers ce cycle cellulaire s'effectue grâce à l'action coordonnée de kinases cycline-dépendantes (CDK pour cyclin dependant kinases) et de leurs protéines cyclines partenaires. Le complexe hétérodimérique ainsi formé autorise l'activation de la CDK par phosphorylation. Comme leurs noms le laissent penser, les cyclines sont des protéines régulées de manière très fine tout au long du cycle cellulaire. Ainsi, les CDK associées sont donc activées ou désactivées en fonction de la phase du cycle dans lequel se trouve la cellule (31, 32). En plus de ces CDK qui permettent le passage d'une phase à l'autre et l'enchaînement correct du cycle, il existe des mécanismes capables de coordonner finement l'arrêt du cycle cellulaire en cas d'anomalies. Ces checkpoints sont au nombre de trois et se répartissent tout au long du cycle cellulaire. Le premier est situé à la transition G1-S, tandis que le deuxième a lieu à la transition G2-M. Enfin, le dernier se produit durant la phase S (30). Ainsi, un arrêt en G1 permettra de résoudre le problème avant répllication de l'ADN, alors qu'un arrêt en G2 permettra à la mitose de ne pas avoir lieu tant que la synthèse d'ADN n'est pas complète (33).

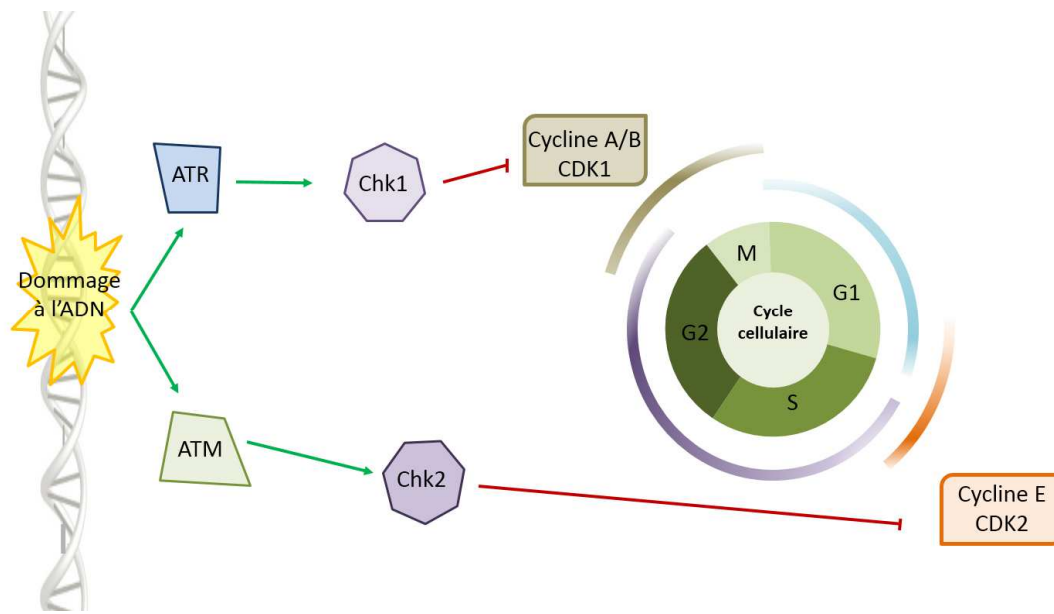


Figure 4 : Lien entre régulation du cycle cellulaire et réponse aux dommages de l'ADN. L'activation des kinases effectrices Chk1 et Chk2 s'effectue par phosphorylation à l'aide des protéines ATR et ATM respectivement. Chk1 va empêcher l'activation du complexe Cycline A/B-CDK1 menant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2. De manière similaire, Chk2 va entraîner l'arrêt de la cellule en G1 en prévenant l'activation du complexe Cycline E-CDK2.

D'après Poehlmann *et al.* (30).

Il en va de même avec la présence de lésions dans la molécule d'ADN. Ces dernières entraîneront l'activation des checkpoints à l'aide notamment des CKI (Cycline dependent kinase inhibitor). L'arrêt du cycle cellulaire sera effectif tant que le défaut ne sera pas corrigé (31).

D'un point de vue moléculaire, ces checkpoints sont principalement régulés par l'activation des deux kinases effectrices : Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinase 1 et 2) (Figure 4). Chk1 permettra la phosphorylation de la phosphatase Cdc25C, la dirigeant vers le protéasome pour être dégradée. Cette dégradation va empêcher l'activation du complexe Cycline B-CDK1 menant à l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (30). Chk2 agira de la même manière avec la phosphatase Cdc25A, empêchant cette fois-ci l'activation du complexe Cycline E-CDK2 requis pour l'entrée en phase S (30).

b. La modulation de la transcription de certains gènes

Les kinases effectrices Chk1 et Chk2 permettent aussi de moduler la transcription de certains gènes (28). La révolution de l'apparition des puces transcriptomiques a permis d'augmenter significativement notre connaissance sur la modulation de la transcription des gènes en réponse à un dommage de l'ADN. De nombreuses études ont été menées, mais la diversité des puces, des modèles cellulaires, ainsi que des traitements utilisés pour induire un dommage spécifique ou non rendent la comparaison difficile (34-36). Toutefois, à partir de l'étude de toutes ces données, Derks *et al.* (35), estiment que l'expression d'un peu plus d'une centaine de gènes est altérée après un dommage à l'ADN. L'une des cibles majeures de cette réponse est la protéine p53, connue pour réguler l'intégrité du génome et déterminer l'avenir cellulaire. p53 joue le rôle d'activateur de transcription principalement à travers son interaction directe avec les séquences régulatrices de ses gènes cibles. Parmi eux, on retrouve ceux jouant un rôle dans la régulation de la transcription (FOS,...), de la modulation du cycle cellulaire (CDKN1A, 14-3-3,...), de la réparation de l'ADN (PCNA, RAD51,...) et de l'apoptose (BAX,...) (37).

Cette réponse transcriptionnelle est globale et nécessite d'être fortement et étroitement régulée afin que la DDR soit parfaitement exécutée.

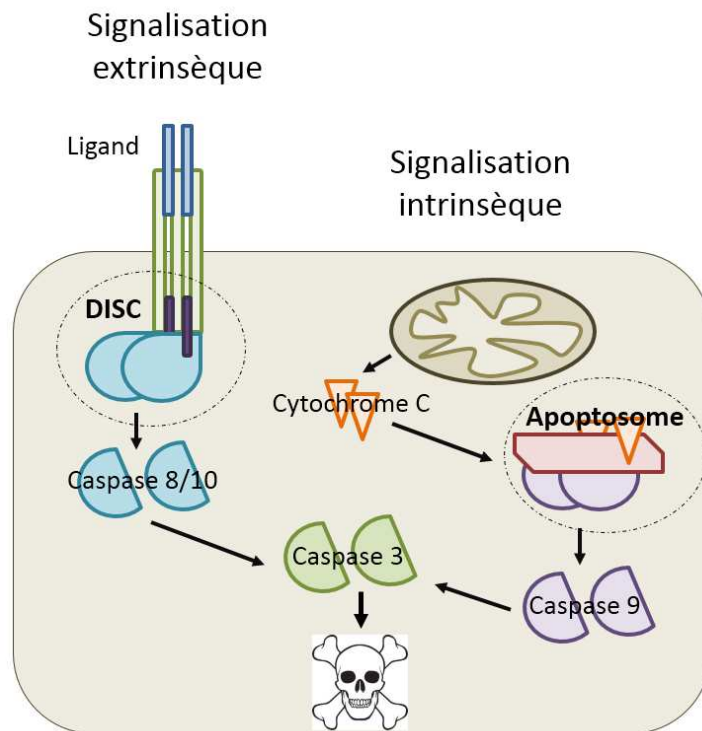


Figure 5 : Représentation des deux voies de signalisation de la mort cellulaire programmée. La voie extrinsèque nécessite un signal extérieur à la cellule qui va permettre la création du complexe DISC composé des procaspases initiatrices 8 et 10, des récepteurs de mort cellulaire et des molécules adaptatrices FADD. L'activation des caspases 8 et 10 mène à l'activation de la caspase 3. La signalisation intrinsèque se produit en réponse à un stimulus interne entraînant le relargage du cytochrome C depuis la mitochondrie. Il y aura alors création de l'apoptosome comportant le cytochrome C, la protéine Apaf-1 et la procaspase 9. L'activation de cette dernière permet l'activation de la caspase 3. La cellule entre alors en apoptose.

D'après Chaudhary *et al.* (38).

c. La réparation de l'ADN

Lorsqu'une lésion apparaît au sein de la molécule d'ADN, une des possibilités pour la cellule est de tenter de la réparer afin de maintenir la stabilité du génome.

On distingue cinq grands types de systèmes de réparation se recouvrant partiellement. Globalement, les petites altérations de bases comme les oxydations ou les alkylations, les sites abasiques et les cassures simple brin sont pris en charge par le système de réparation par excision de bases (BER pour base excision repair) (39). Les lésions plus complexes induisant une distorsion de la structure de la double hélice de l'ADN telles que les dimères de pyrimidine, les liaisons intra-brins et les adduits volumineux seront quant à elles réparées par excision de nucléotides (NER pour nucleotide excision repair) (39). Les cassures double brin ainsi que les liaisons inter-brins disposent de deux systèmes de réparation en fonction de la phase du cycle cellulaire à laquelle elles surviennent : la réparation par recombinaison homologue (HR pour homologous recombination), ou la suture non homologue (NHEJ pour non homologous end joining) (39). Le système de réparation des mésappariements (MMR pour mismatch repair) prendra en charge les lésions du même nom (39). Chacun de ces systèmes sera détaillé dans le paragraphe C - Les systèmes de réparation de l'ADN.

d. La mort cellulaire programmée

Lorsqu'une cellule est devenue inutile ou potentiellement dangereuse pour l'organisme, elle peut décider de se 'suicider' à travers un processus physiologique hautement régulé nommé apoptose. Cette mort cellulaire programmée contribue à l'homéostasie tissulaire mais est aussi essentielle pour le développement embryonnaire et le fonctionnement du système immunitaire. Par exemple, au cours de l'embryogenèse, les cellules cartilagineuses de la main sont produites en excès. La formation des doigts implique donc l'apoptose des cellules de l'espace interdigital. Un autre exemple de l'importance de cette mort cellulaire programmée est son rôle dans l'immunité où elle va permettre la destruction des lymphocytes dysfonctionnels ou auto-réactifs et donc empêcher l'établissement d'une possible maladie auto-immune.

L'apoptose peut se déclencher sous l'influence de différents facteurs tels que le stress ou même la présence de lésions irréparables de l'ADN. Ces facteurs vont entraîner une cascade d'évènements dont les protéines clés appartiennent à la famille des caspases. Ces protéases à cystéines peuvent être activées selon deux voies : extrinsèque ou intrinsèque (Figure 5).

Dans le premier cas, le signal provient de l'extérieur de la cellule par l'activation de récepteurs à domaine de mort à la surface cellulaire. La liaison des ligands spécifiques à leurs récepteurs induit la formation d'un complexe protéique appelée DISC (death-inducing signaling complex) composé des procaspases initiatrices 8 et 10 et de molécules adaptatrices FADD (Fas associated death domain). Ces caspases, une fois activées, vont permettre l'activation séquentielle des caspases dites effectrices dont la caspase 3 (40).

Dans le deuxième cas, le signal inducteur est d'origine intracellulaire. Cette voie peut, par exemple, être déclenchée par l'activation de p53 lors d'induction de dommages à l'ADN. Cette activation va entraîner la formation de pores dans la membrane mitochondriale (41) induisant alors la libération du cytochrome C dans le cytosol. Cette libération va permettre l'activation de la protéine Apaf-1 qui va à son tour autoriser la formation d'un complexe appelé apoptosome dans lequel se trouve le cytochrome C, la protéine Apaf-1 et la procaspase 9 (42). Cette caspase, une fois activée, va permettre l'activation à travers un mécanisme de protéolyse des caspases dites effectrices dont la caspase 3 (40).

Une fois cette caspase 3 activée, la physiologie cellulaire va être modifiée : la chromatine va se condenser et être dégradée ; le cytoplasme et les organites vont également se condenser entraînant une diminution du volume cellulaire. Ensuite, la communication cellulaire de la cellule en apoptose est coupée et la membrane cellulaire va se dégrader. La cellule va exprimer des signaux phagocytaires incitant les phagocytes à venir éliminer ses restes (40).

Lorsque le taux de dommage à l'ADN apparaît comme étant trop important pour pouvoir être réparé par les systèmes de réparation de la cellule, l'activation prolongée des kinases ATM et/ou ATR va notamment conduire à la phosphorylation de la protéine p53 (43, 44) au travers des kinases Chk1 et Chk2. p53 permet d'orchestrer la balance entre apoptose et arrêt du cycle cellulaire (45). Suivant la quantité de dommage, elle activera p21 permettant un arrêt du cycle cellulaire ou permettra l'activation directe de gènes pro-apoptotiques comme PUMA ou NOXA (46, 47). Elle joue aussi un rôle sur la régulation transcriptionnelle des gènes inhibant les voies anti-apoptotiques, comme par exemple la protéine suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and tensin homolog) (48). A l'inverse, d'autres gènes de la machinerie apoptotique comme *Apaf-1* et *Caspase 6* seront eux aussi transcriptionnellement modulés.

Enfin, une apoptose p53-indépendante peut aussi être mise en place à travers la phosphorylation de la protéine PML (Promyelocytic leukemia protein) par Chk2 (28). En effet,

il a été montré que les cellules mutantes pour PML ne sont pas capables d'entraîner celle-ci en mort cellulaire programmée induite par des rayonnements ionisants (28).

L'apoptose est à mettre en opposition avec les autres types de morts cellulaires auxquels la cellule peut être soumise : la nécrose et l'autophagie. Déclenchée par des traumatismes ou des infections, la nécrose est une mort cellulaire anormale et non programmée. Elle se caractérise par un gonflement du cytoplasme, la destruction de tous les organites et la rupture de la membrane plasmique entraînant une réponse inflammatoire des tissus environnants. En revanche, l'autophagie est un mécanisme par lequel les organites et les autres constituants cellulaires vont subir une dégradation protéolytique. Cette mort cellulaire est impliquée dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire en cas de ruptures d'apports énergétiques.

C - Les systèmes de réparation de l'ADN

1) La réparation par excision de bases

La réparation par excision de bases ou base excision repair (BER) est par définition le système de réparation des bases endommagées résultant de petites altérations chimiques. Cette voie permet donc la réparation des bases oxydées, méthylées, alkylées ou désaminées ainsi que des sites abasiques et des cassures simple brin (39). Tous ces dommages entraînent une modification de la structure chimique de l'ADN mais ne déforment pas sa double hélice. On considère souvent que cette voie est le gardien principal des dommages induits par le métabolisme cellulaire et notamment par le stress oxydant (11).

Il existe deux voies de synthèse dans le mécanisme du BER dont l'implication dépend de la nature de la lésion et du cycle cellulaire (11). La voie majoritaire est celle du BER de type court ou short patch BER. La voie annexe, celle du BER de type long ou long patch BER, fait appel à des enzymes différentes.

Quatre étapes composent cette voie de réparation par excision de bases (49) (Figure 6):

- La lésion sera tout d'abord reconnue par une ADN glycosylase spécifique de la base endommagée. Certaines sont spécialisées dans l'excision de l'uracile (UNG pour Uracile DNA glycosylase...), tandis que d'autres sont spécialisées dans la réparation des bases oxydées (OGG1 pour 8-oxoguanine DNA glycosylase, MYH pour MutY homolog...) (50).

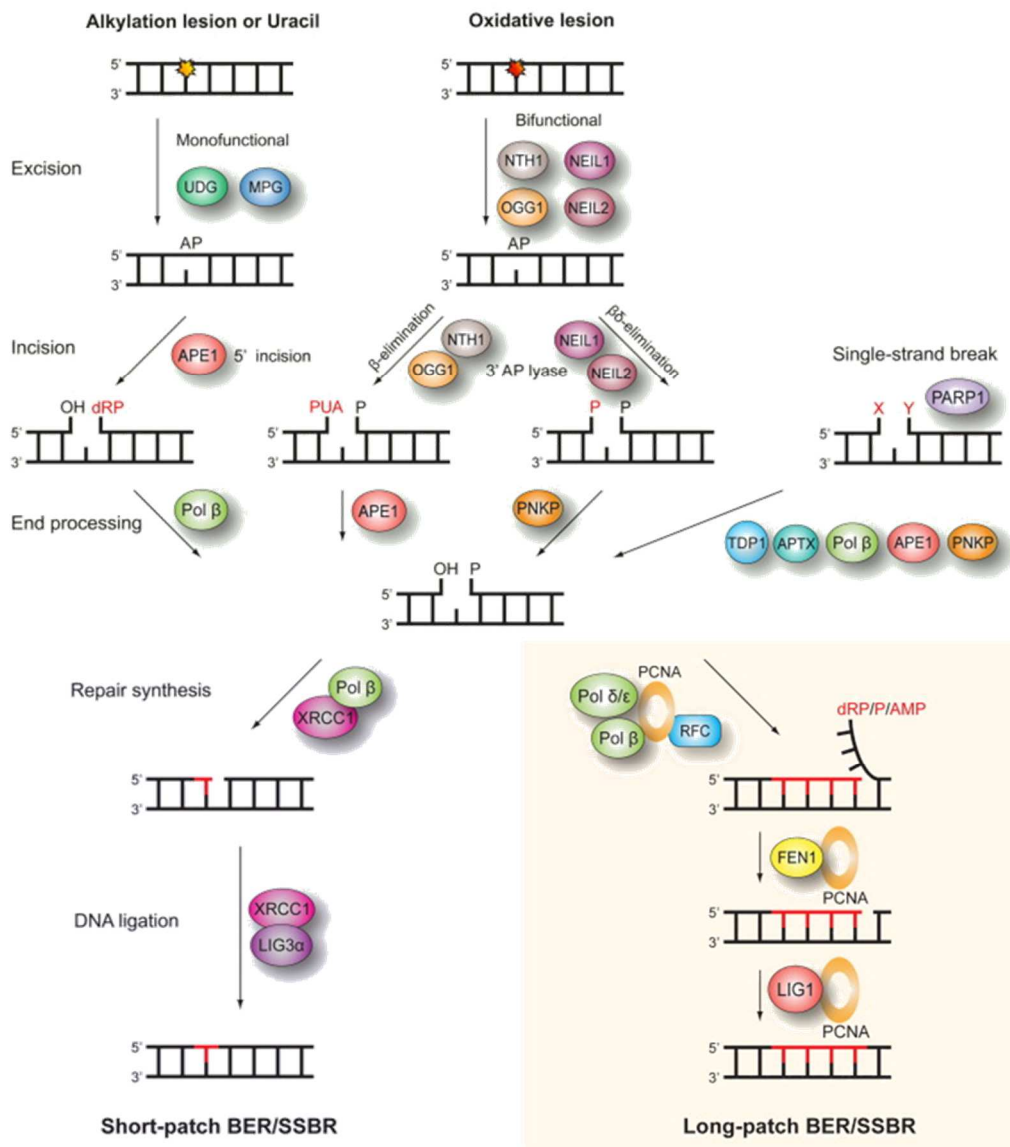


Figure 6 : La voie de réparation par excision de bases (BER) et la voie de réparation des cassures simple brin (SSBR). Ces voies de réparations peuvent se décomposer en quatre grandes étapes : 1) la reconnaissance de la lésion par une ADN glycosylase ou par PARP1 dans le cas d'une cassure ; 2) le clivage de la liaison phosphodiester grâce à une AP endonucléase (cette étape n'a pas lieu dans le SSBR) ; 3) la repolymérisation à l'aide de protéines différentes selon la voie courte ou longue ; 4) la ligature des nucléotides nouvellement synthétisés.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

Cette protéine va permettre d'hydrolyser la liaison entre la base et le résidu entraînant la création d'un site abasique (AP pour A-purique ou A-pyrimidique) sur l'ADN.

- Puis, le squelette chimique de l'ADN sera clivé par une AP endonucléase comme APE1. Ces enzymes ont la capacité de reconnaître les sites abasiques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester en 5' générant une cassure simple brin. Cette activité peut aussi être effectuée par les ADN glycosylases bi-fonctionnelles qui possèdent en plus de l'activité classique de glycosylases, une activité d'AP lyase (OGG1 par exemple). L'extrémité 3'OH ainsi formée servira d'amorce lors de la resynthèse par les ADN polymérases.

- C'est à partir de cette étape que les deux voies du BER se séparent. Dans le cas du short patch BER, un à deux nucléotides sont incorporés par la polymérase β associée à XRCC1. Aucune activité enzymatique de cette dernière n'est pour le moment connue menant à l'hypothèse qu'elle possède une fonction de 'protéine échafaudage' permettant la coordination de ce BER (52).

En revanche, dans le cas de la voie de resynthèse longue, l'incorporation d'un nombre plus important de nucléotides nécessite l'utilisation des polymérases ϵ ou δ associées au facteur de processivité PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et à RFC (Replication factor C). Il semble que PCNA permette la coordination de l'ensemble des acteurs de ce BER (52).

Actuellement, plusieurs hypothèses existent pour expliquer la décision menant à l'activation de la voie courte ou de la voie longue du BER. L'une de ces hypothèses suggère un lien avec la concentration en ATP. En effet, il a été démontré que la voie longue du BER était plus empruntée à des faibles taux d'ATP contrairement à la voie courte qui est préférentiellement utilisée à des hauts niveaux d'ATP (52).

- Enfin, la dernière étape consiste en la ligature des nucléotides nouvellement incorporés grâce à l'action du complexe ligase III/XRCC1 dans le cas de la voie courte. En revanche, lors du long patch BER, ce sera le complexe ligase I/PCNA qui entrera en jeu.

Parmi les petites lésions ne déformant pas la structure de la double hélice d'ADN, on retrouve aussi les cassures simple brin. Afin de réparer ce type de dommage, il existe une variante de la voie BER nommée single strand break repair (SSBR) (53). Dans cette voie, l'étape de reconnaissance par les ADN glycosylases est inutile. Le facteur PARP1 va alors servir de senseur de la cassure (54) et activer la voie de réparation impliquant les protéines du BER (Figure 6).

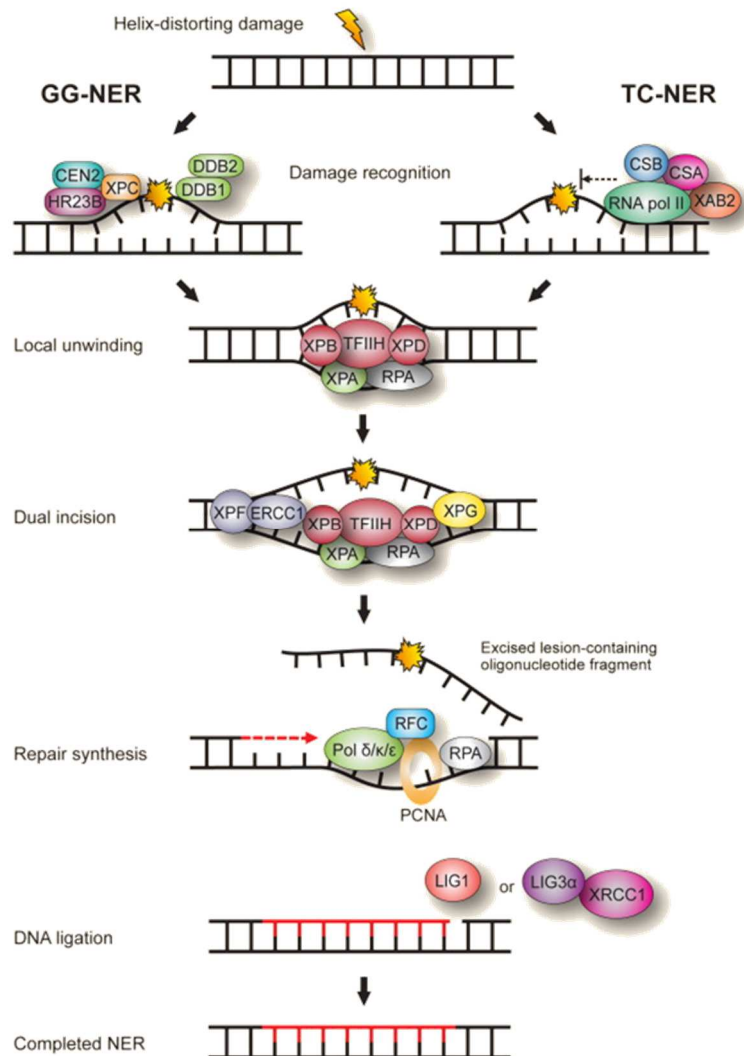


Figure 7 : La voie de réparation par excision de nucléotides (NER). Dans le cas du GG-NER, la reconnaissance de la lésion a lieu grâce à la protéine XPC. En revanche, dans le cas du TC-NER, c'est le blocage de l'ARN polymérase au niveau du dommage qui constitue le début de la signalisation. Puis, le complexe TFIIH prend en charge l'excision d'une trentaine de nucléotides. La resynthèse s'effectue à l'aide de la polymérase ϵ ou γ et des protéines RFC et PCNA recrutées par RPA. Enfin, la ligature des nucléotides nouvellement synthétisés a lieu grâce à l'action de la ligase I.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

2) La réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides ou nucleotide excision repair (NER) est le système de réparation préférentiellement utilisé pour corriger les lésions volumineuses ou étendues engendrant une déformation de la structure de la double hélice d'ADN. Cette voie permet donc la réparation des photoproduits, des pontages intra- ou inter-brins et des adduits encombrants (50). C'est ce mécanisme qui va notamment permettre la réparation de l'ADN endommagé par une exposition aux rayonnements ultraviolets B.

On retrouve à nouveau deux variantes de cette voie de réparation : la réparation globale du génome (GG-NER, pour global genomic NER) et la réparation couplée à la transcription (TC-NER pour transcription coupled NER) (50). La première agit sur l'ensemble du génome contrairement à la deuxième qui est spécifique des lésions présentes sur les brins transcrits des gènes actifs. Seule l'étape de reconnaissance diffère entre ces deux voies. Le schéma mécanistique reste le même : la lésion sera dans un premier temps retirée entraînant l'excision d'une trentaine de nucléotides, puis l'ADN sera resynthétisée et ligaturée pour former une séquence exempte de lésions.

Il y a donc 4 étapes composant cette voie de réparation par excision de nucléotides (55, 56) (Figure 7):

- La reconnaissance de la lésion s'effectuera à l'aide de protéines différentes selon la voie du NER mis en jeu. Dans le cas du TC-NER, c'est le blocage de l'ARN polymérase au niveau du dommage qui constitue le début de la signalisation. Cela va permettre le recrutement des protéines CSA, CSB et XPAB2 (XPA bonding protein 2) (57).

En revanche, lors du GG-NER, c'est la protéine XPC qui agit comme senseur de la distorsion de l'ADN (58). Il semble que cette protéine se fixe sur le brin complémentaire non endommagé (58) expliquant, au moins en partie, la grande variété de dommages réparés par cette voie.

- Puis, vient l'étape d'excision nécessitant pour les deux voies du NER le recrutement du complexe TFIIH formé d'une dizaine de protéines (56). Ce complexe va permettre l'ouverture de la double hélice d'ADN grâce à deux de ses sous-unités XPB et XPD qui possèdent respectivement une activité 3'-5' et 5'-3' hélicase. La stabilisation de l'ADN ainsi ouvert est réalisée par la protéine RPA. Ce sont les deux endonucléases XPG et XPF qui vont permettre l'excision d'un fragment d'une trentaine de nucléotides. L'interaction directe entre

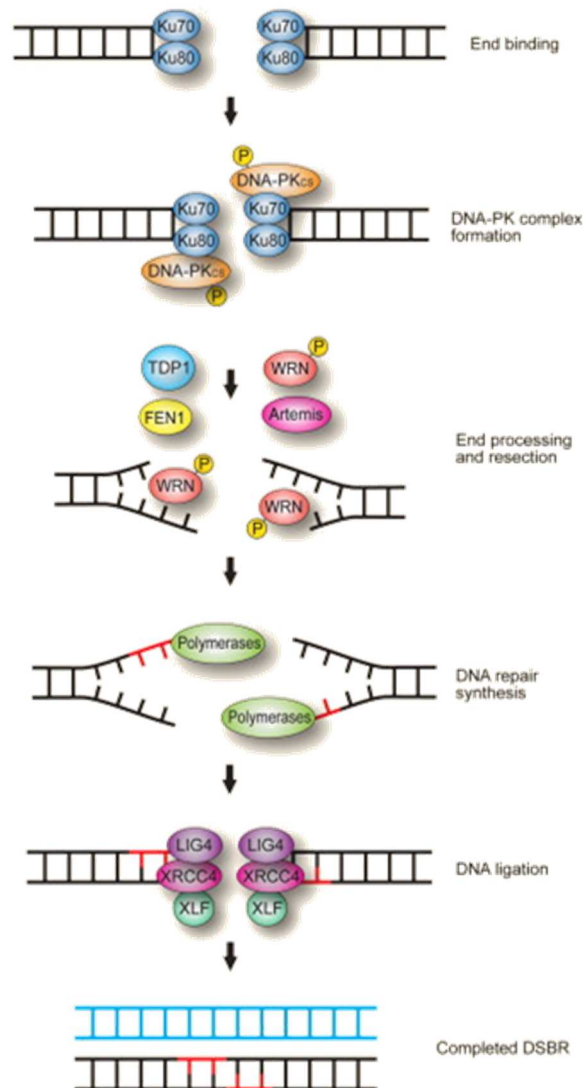


Figure 8 : La voie de réparation par suture non homologue (NHEJ). Globalement, les extrémités libres vont être reconnues par le complexe Ku70-Ku80. Ce dernier va permettre le recrutement de la DNA-PKCs qui en s'autophosphorylant va induire un changement conformationnel laissant libres les extrémités pour les protéines nécessaires à la gestion de la cassure. Enfin, la ligase IV et le facteur XRCC4 seront recrutés afin de mener à bien la ligature des deux brins.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

XPG et le complexe RPA-TFIIH va permettre de situer précisément l'incision à effectuer (59).

- La resynthèse s'effectuera à l'aide de la polymérase ϵ ou γ et des protéines RFC et PCNA recrutés par RPA (56).

- Enfin, la ligase I va permettre de ligaturer le brin nouvellement formé.

3) La réparation par suture non homologue

La réparation par suture non homologue ou non homologous end joining (NHEJ) permet la réparation des cassures double brin se produisant en phase G1 du cycle cellulaire. C'est une ligation d'extrémité à extrémité, utilisée majoritairement chez les mammifères et étant plus susceptible de créer des erreurs que les autres voies de réparation (Figure 8).

Après formation d'une cassure chromosomique, les extrémités de l'ADN vont directement être détectées grâce à l'activité de l'hétérodimère Ku composé de Ku70 et de Ku80 (27). Ces protéines permettent le recrutement de la protéine DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK (DNA protein kinase). Les deux complexes présents sur chacune des extrémités vont permettre de les maintenir à proximité (60).

Ensuite, une autophosphorylation de DNA-PKcs (60) va induire un changement conformationnel laissant de la place aux extrémités pour les protéines Artemis et PNK (polynucléotide kinase). Chacune de ces enzymes possède une activité propre et sera recrutée en fonction des besoins. Artemis possède par exemple une activité 5'-3' exonucléase ; une fois complexé avec DNA-PK, ce complexe gagne une activité endonucléase permettant notamment de cliver les extrémités formant une structure en hairpin (61). En ce qui concerne PNK, cette protéine possède à la fois une activité kinase et une activité phosphatase (27).

Pour finir, un deuxième complexe composé de la ligase IV et du facteur XRCC4 va être recruté afin de permettre la ligature des deux brins d'ADN (62).

Une fois la cassure réparée, le complexe DNA-PK va autoriser la dégradation de la plateforme protéique située au niveau de l'ancien dommage. Cette phosphorylation de DNA-PKcs va donc entraîner le détachement de tous les complexes et libérer l'hétérodimère Ku (61-63).

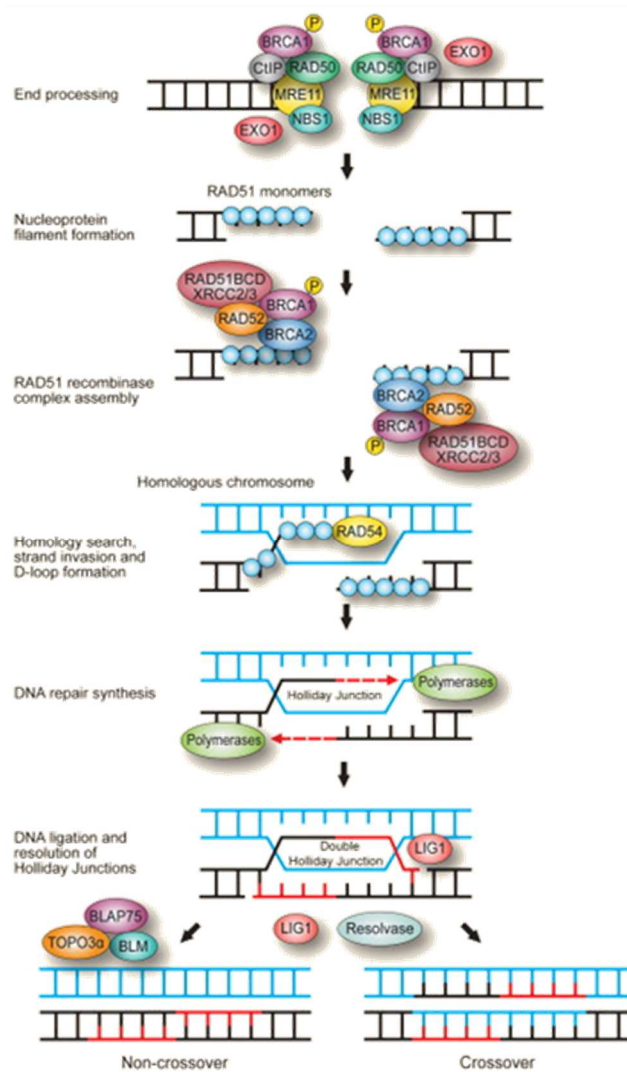


Figure 9 : La voie de réparation par recombinaison homologue (HR). Cette voie nécessite la reconnaissance de la lésion par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Suite à la création d'une longue extrémité simple brin protégée par RPA, la protéine RAD51 sera recrutée afin de rechercher la séquence homologue au niveau de la chromatide sœur. Il y aura alors formation d'une jonction Holliday autorisant l'action d'une ADN polymérase puis de l'ADN ligase I afin d'obtenir un néobrin d'ADN exempt de lésion.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

4) La réparation par recombinaison homologue

La voie de réparation par recombinaison homologue ou homologous recombination (HR) est le système de réparation des cassures double brin apparaissant durant les phases S et G2 du cycle cellulaire (64). En effet, le mécanisme est basé sur l'échange d'information génétique grâce à un événement de recombinaison entre deux chromatides soeurs dont l'une est porteuse du dommage et l'autre intacte (Figure 9). Contrairement à la voie NHEJ, celle-ci est considérée comme 'error-free', car elle autorise la restauration de la séquence d'ADN sans perte d'information génétique.

La cassure double brin va être repérée par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Ce complexe possède une activité exonucléase 5'-3' qui va permettre la création d'une longue extrémité simple brin 3', substrat pour le recrutement de la machinerie de réparation. Cette extrémité simple brin est protégée par la protéine RPA qui permet en même temps le recrutement de RAD51. C'est cette dernière qui va initier la recherche de séquence d'homologie au niveau de la chromatide soeur servant de matrice. Une fois trouvée, une jonction Holliday va être formée et la longue extrémité 3' va envahir l'hélice de l'ADN intacte. Il y aura alors hybridation et une ADN polymérase permettra la néosynthèse du brin. Une fois cette étape finie, la jonction va se refermer et le brin nouvellement synthétisé sera ligaturé par l'ADN ligase I (11, 65).

5) La réparation des mésappariements

La voie de réparation des mésappariements ou mismatch repair (MMR) prend en charge, comme son nom l'indique les mésappariements de bases survenant le plus souvent après une erreur d'incorporation par les ADN polymérase. Il a en effet été établi qu'une base erronée est incorporée toutes les 10^5 bases (66). Ce taux d'erreur est réduit à 10^{-10} bases grâce au système MMR. En outre, ce système de réparation peut aussi prendre en charge les bases alkylées de l'ADN comme l'O6-méthylguanine.

Dans ce système (Figure 10), la reconnaissance du dommage s'effectue à l'aide du complexe MSH :MSH2-MSH6 ou MSH2-MSH3. Le premier reconnaît préférentiellement les mésappariements de bases et les boucles d'un ou deux nucléotides (66). Le second reconnaît les larges boucles dues à la délétion ou à l'insertion de plusieurs nucléotides.

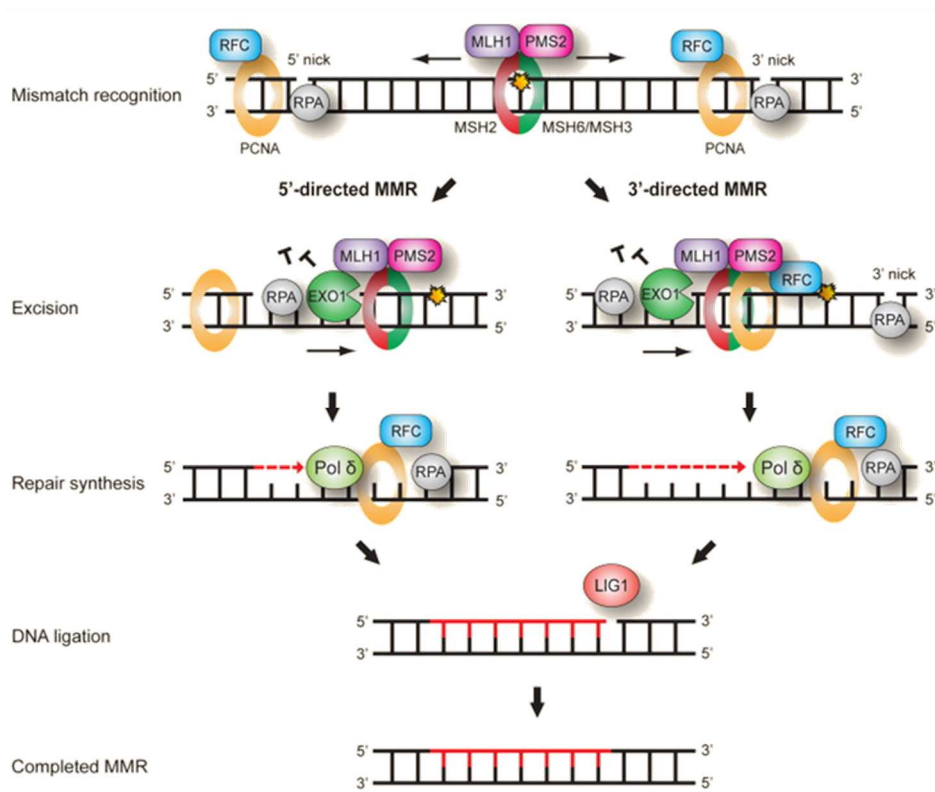


Figure 10 : La voie de réparation des mésappariements (MMS). Les mésappariements sont reconnus par le complexe MSH qui va recruter le complexe MLH1-PMS2. L'excision sera effectuée à l'aide de l'exonucléase 1. L'ADN simple brin sera protégé par la protéine RPA en attendant que la resynthèse ait lieu à l'aide de l'ADN polymérase γ . Enfin, l'ADN ligase I permettra l'obtention du brin néosynthétisé.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

Le recrutement d'un de ces complexes va permettre de confirmer le mésappariement entraînant la mobilisation des complexes hétérodimériques MLH1-MPS2 ainsi que des facteurs de réplifications. Puis selon le sens de la coupure, différentes protéines seront recrutées. Enfin, l'exonucléase 1 excisera le brin non méthylé à l'aide d'un déroulement progressif du duplexe par une hélicase. Une fois le brin excisé, RPA permettra de stabiliser l'excision en protégeant l'ADN simple brin. Puis, la resynthèse aura lieu à l'aide de l'ADN polymérase γ et la ligature se fera grâce à l'ADN ligase I.

D - Implications pathologiques de défauts dans la DDR

De la détection des dommages à la transduction du signal en passant par les différentes réponses effectives, tous les niveaux de la DDR peuvent être touchés par des défaillances pouvant avoir de graves conséquences pathologiques (3, 67) (Figure 11). Ces maladies présentent le plus souvent des caractéristiques phénotypiques communes comme des retards de développement, des problèmes neurologiques ainsi qu'une forte prédisposition à développer des cancers (3).

Parmi toutes ces maladies, on peut citer l'exemple de l'ataxie télangiectasie (AT), une maladie génétique rare due à un défaut de signalisation de la DDR (68, 69). Cette maladie présente une prévalence moyenne de 1 pour 100 000 naissances. Ces patients présentent une démarche instable (ataxie), une dilatation de leurs petits vaisseaux sanguins au niveau de la surface de la peau et du blanc de l'œil (télangiectasie), une déficience immune et enfin, une forte prédisposition aux lymphomes chez les enfants et aux cancers solides (thyroïde, sein..) chez les adultes. Dans ces cellules, il a été montré que le gène *ATM*, acteur majeur dans la réponse aux dommages de l'ADN, est muté entraînant une incapacité à phosphoryler et à activer p53 et Chk2 (70). Les checkpoints du cycle cellulaire ne sont donc plus actifs menant à un cycle cellulaire défaillant. Lorsque ces patients seront exposés à des rayonnements ionisants menant principalement à des cassures double brin de l'ADN, leurs cellules ne seront donc plus en mesure de stopper le cycle cellulaire : réparation de l'ADN et apoptose seront ainsi impactées.

Un autre exemple de syndrome dû à un défaut de signalisation dans la DDR est le syndrome de Nijmegen (NBS pour Nijmegen breakage syndrome) (68). Cette fois-ci, la mutation a lieu dans le gène codant pour la protéine NBS1. Le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) ne

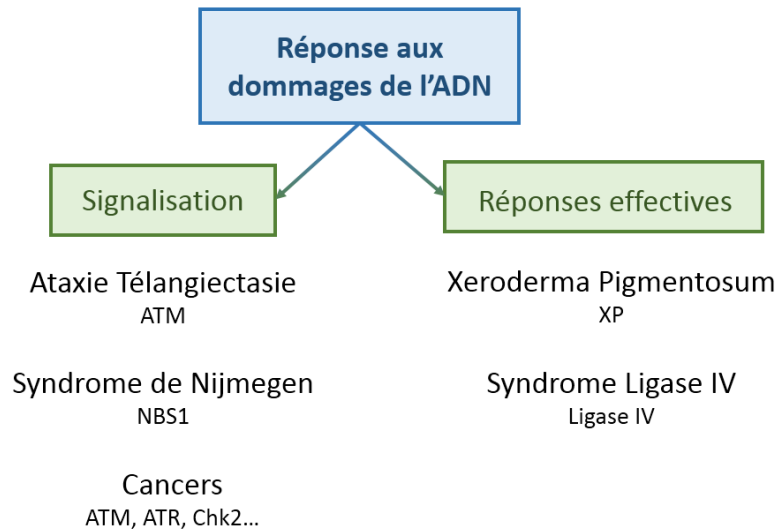


Figure 11 : Exemples de pathologies liées à des défauts dans la signalisation ou dans les réponses effectives de la réponse aux dommages de l'ADN. Le nom de la maladie est écrit en premier suivi en dessous par le nom du gène défaillant. On retrouve l'ataxie téléangiectasie, le syndrome de Nijmegen, le Xeroderma Pigmentosum, le syndrome Ligase IV ainsi que plus généralement les cancers.

pourra donc pas se former correctement empêchant le transport du complexe dans le noyau cellulaire où il est censé reconnaître les cassures double brin de l'ADN (71). Les patients atteints de ce syndrome présentent des symptômes aussi variés que des microcéphalies, des retards de croissance, une immunodéficience et une forte prédisposition à développer des cancers radio-induits.

Enfin, un défaut dans les systèmes de réparation peut aussi être directement responsable de nombreuses maladies comme dans le xeroderma pigmentosum (XP) (69). Il se caractérise par une sensibilité accrue des patients aux rayonnements UV. Concrètement, ces patients possèdent une mutation dans l'un des gènes XP codant pour une protéine participant au mécanisme de réparation par excision de nucléotides. Les mutations dues aux UVB vont donc s'accumuler entraînant une instabilité génomique responsable des traits phénotypiques caractéristiques de ces patients (72). Ces 'enfants de la lune' possèdent une forte propension à développer des cancers de la peau : mélanomes et carcinomes basocellulaires.

On peut aussi citer le syndrome de Cockayne (CS) qui entraîne également une photosensibilité, une dysmorphie faciale ainsi qu'un déficit intellectuel. La durée de vie de ces patients est généralement réduite, mais aucune augmentation de l'incidence des cancers chez ces patients a pu être mise en évidence (73). Cette maladie est causée par des mutations au niveau des gènes *CSA* et *CSB*, jouant tous les deux un rôle dans la reconnaissance des lésions de la voie de réparation par excision de nucléotides (73).

De manière plus générale, il a été démontré que des mutations dans les gènes *ATM*, *ATR* ou même *Chk2* pouvaient être responsables de cancers du sein, des ovaires, du côlon, de la prostate ou même du système lymphatique (30). L'étude de l'haploinsuffisance de *Chk1* chez la souris entraîne de multiples phénotypes liés à la constitution des tumeurs (28). Finalement, près de 50% des tumeurs possèdent une mutation dans le gène *p53* (30).

Ces observations, ainsi que les maladies liées à des défaillances de la DDR, ont conduit à proposer la DDR comme une barrière contre la tumorigénicité (28).

II - Le syndrome de Gorlin

Au-delà de ces maladies présentant des défauts de la DDR, d'autres syndromes présentant des symptômes similaires à ces maladies existent. C'est notamment le cas du syndrome de Gorlin que nous allons décrire dans le premier paragraphe de ce chapitre. La mutation génétique responsable de cette maladie touche le gène Patch-1 Receptor (PTCH1) jouant un rôle primordial dans la voie de signalisation sonic hedgehog. Ceci représentera le deuxième axe de description de cette introduction. Enfin, nous nous attacherons à décrire l'organe le plus étendu du corps humain et porteur de l'un de symptômes les plus importants du syndrome de Gorlin : la peau.

A - Le syndrome de Gorlin

1) Historique, généralités et signes cliniques

C'est en 1894 que Jarisch décrit pour la première fois l'association d'anomalies squelettiques et de carcinomes basocellulaires chez un patient atteint de scoliose (74). La même année, White présente l'histoire familiale d'un patient porteur de multiples carcinomes basocellulaires (75). En 1939, les symptômes d'un patient associant kystes odontogènes et carcinomes basocellulaires multiples sont rapportés par Straith (76). Par la suite, en 1951, Binkley et Johnson décrivent un malade porteur de carcinomes basocellulaires, d'anomalies du développement et d'un fibrosarcome mandibulaire découvert après la mort du patient (77). Il faudra patienter jusqu'en 1960 pour que Gorlin, chirurgien-dentiste et Goltz, dermatologue réalisent la toute première description de cet ensemble de signes cliniques et de symptômes qu'ils nommeront la nævomatose basocellulaire multiple avec kystes du maxillaire et côtes bifides (78). Plus tard, Rayner *et al.* (79) ajouteront de nouveaux outils de classification afin de faciliter le diagnostic de cette maladie.

Maintenant écourtée à nævomatose basocellulaire (NBCCS ; OMIM : #109400), cette maladie génétique rare à transmission autosomique dominante possède une prévalence variant en fonction du pays d'étude. Elle va de 1 pour 55 600 individus en Angleterre (80), à 1 pour 256 000 personnes en Italie (81) en passant par 1 pour 164 000 en Australie (82). Néanmoins, la prévalence moyenne la plus généralement rapportée est de 1 pour 60 000 individus.

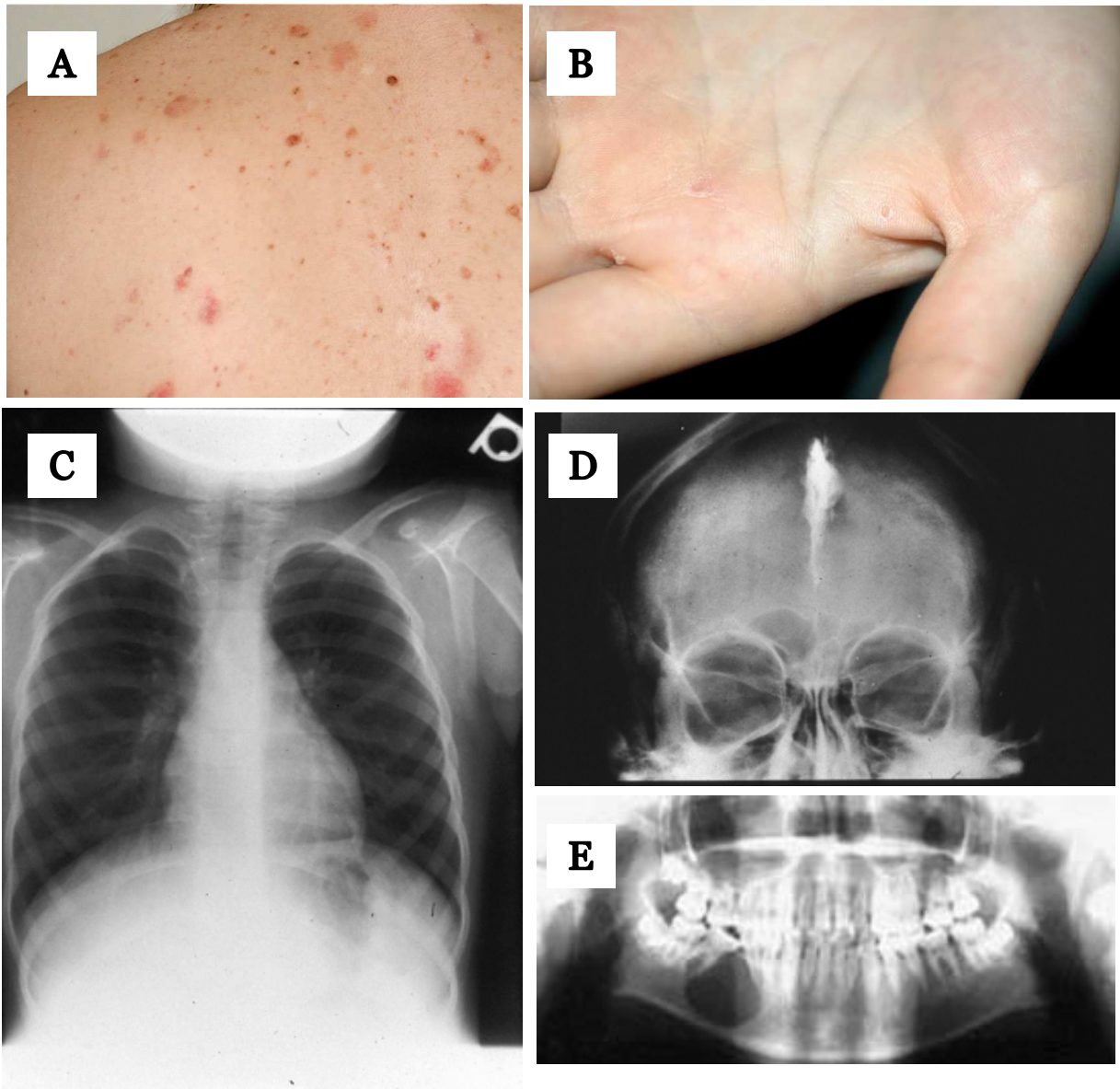


Figure 12 : Les critères majeurs de diagnostic du syndrome de Gorlin.

- A) Multiples carcinomes basocellulaires. B) Pits palmo-plantaires. C) Côte bifide.
 D) Calcification du falx cerebri. E) Tumeur odontogène kérato-kystique.

<http://www.geemboomba.com/home/radiology/radiographic-pathology/gorlin-goltz-syndrome>

http://www.edimark.fr/phototheque/galerie_detail.php?id_galerie=688

Ce syndrome s'exprime avec un sex-ratio équilibré : les hommes et les femmes sont atteints dans les mêmes proportions (83). Enfin, à ce jour, aucune étude n'a pu mettre en évidence une corrélation entre le génotype et le phénotype chez les malades atteints du syndrome de Gorlin (84). L'expression phénotypique étant variable entre chaque patient, le diagnostic clinique de cette maladie s'établit donc à l'aide de différents critères classifiés selon leurs importances (majeures ou mineures). Les États-Unis, le Royaume-Uni et l'Australie possèdent chacun leur propre classement (80, 82, 85). Toutefois, le plus utilisé reste celui des américains décrit par Kimonis *et al.* (85) proposant six critères majeurs (Figure):

- la présence de multiples carcinomes basocellulaires (BCC). Ces tumeurs cutanées représentent l'un des critères les plus évidents de diagnostic de la maladie avec près de 97% de malades atteints (86). Ces carcinomes peuvent apparaître à tout moment pendant la maladie mais ils surviennent en moyenne vers l'âge de 20 ans (87), contrastant avec l'âge d'apparition dans la population générale où ces tumeurs se développent habituellement après 60 ans. Un peu plus de 90% des Caucasiens porteurs de ce syndrome vont développer un BCC contre seulement 40% des Afro-Américains (85). Enfin, il est à noter qu'environ 60% de ces néoplasmes apparaissent au niveau des zones photo-exposées au rayonnement ultraviolet (UV) (85).

- la présence de pits palmo-plantaires, correspondant à de petites dépressions punctiformes d'un à deux millimètres. Touchant 60 à 90% des malades (86), cette manifestation est l'une des plus caractéristiques de par sa relative facilité de dépistage

- l'apparition de tumeurs odontogènes kérato-kystiques au niveau des mandibules. Ces tumeurs osseuses de la mâchoire sont le plus généralement bénignes. Elles sont toutefois très localement agressives et possèdent un fort taux de récurrence après traitement (88). On estime que près de 75% des personnes atteintes de NBCCS développeront ce genre de néoplasmes.

- la présence d'anomalies costales. Diagnostiquée par radiographie, cette manifestation congénitale regroupe la présence de côtes bifides (40% des cas, (86)), évasées, fusionnées ou même carrément absentes (26%, (86)).

- la calcification des tissus mous et notamment du falx cerebri, une partie de la dure-mère formant initialement une cloison entre les deux hémisphères du cerveau. Ce défaut est très rarement détecté durant la petite enfance suggérant que c'est lors du vieillissement progressif que le calcium va venir se déposer (89). Ce défaut du développement est retrouvé chez près de 65% des malades Gorlin (87).

- enfin, une relation familiale avec un porteur de cette maladie.

Anomalies dermatologiques	Multiples carcinomes basocellulaires
	Pits palmo-plantaires
	Lésions nodulaires
	Kystes bénins
Anomalies squelettiques	Déformations costales
	Polydactylie, syndactylie, oligodactylie
	Déformation de Sprengel
	Scoliose
Anomalies cranio-faciales	Calcification du falx-cerebri
	Macrocéphalie
	Brachycéphalie
	Tente du cervelet
	Bosses frontales
Anomalies oro-faciales	Large arrête nasale
	Tumeur odontogène kérato-kystique
	Bec de lièvre
	Eruption ectopique des dents
Anomalies ophtalmologiques	Palais ogival
	Hypertélorisme
	Amaurose
	Ptosis
	Cécité
	Strabisme (esotropie et exotropie)
Anomalies neurologiques	Glaucome
	Médulloblastome
	Méningiome
	Retards mentaux
	Hydrocéphalie
Anomalies sexuelles	Personnalité schizophrène
	Fibromes utérins et ovariens
	Kyste ovarien calcifié
	Hypogonadisme et cryptochidie
	Polymastie

Tableau 1 : Les principales anomalies retrouvées chez les patients atteints du syndrome de Gorlin classées en fonction des différents organes atteints.

Cette étude (85) décrit aussi six autres critères mineurs touchant proportionnellement moins de patients atteints du syndrome de Gorlin :

- une macrocéphalie. On estime que près de 40% des malades atteints de NBCCS présenteront cette hypertrophie de la tête (86).

- la présence de déformations congénitales telles que des fentes labio-palatines aussi appelées bec-de-lièvre, des bosses frontales, ou même un hypertélorisme (augmentation de la distance entre les deux yeux)...

- l'apparition de fibromes utérins et ovariens. Ces anomalies sexuelles touchent jusqu'à 25% des femmes atteintes de cette maladie (87).

- la présence de médulloblastome dès le plus jeune âge des malades. Ces tumeurs embryonnaires du cerveau touchent de 1 à 4% des patients Gorlin (87).

- des anomalies squelettiques comme une scoliose (déformation permanente de la colonne vertébrale), ou bien une fusion ou une élongation des corps vertébraux.

- la présence de déformations squelettiques comme la déformation de Sprengel (surélévation de l'omoplate), une syndactylie (fusion plus ou moins complète de deux ou plusieurs doigts ou orteils entre eux) ou une polydactylie (présence d'un ou plusieurs doigts ou orteils supplémentaires).

Un patient est déclaré atteint du syndrome de Gorlin lorsqu'ils présentent deux critères majeurs, ou bien un critère majeur et deux critères mineurs.

En plus de ces douze critères, plus d'une centaine de manifestations cliniques ont été reportées chez l'ensemble des patients atteints du syndrome de Gorlin (Tableau 1).

De nombreuses anomalies dermatologiques ont été décrites comme la présence de nombreux grains de beauté pouvant évoluer très rapidement. Les patients Gorlin peuvent aussi présenter des nodules ou des kystes épidermiques. On retrouve aussi des anomalies squelettiques comme la calcification du pelvis ou même une brachycéphalie (le crâne est plus long que profond). Les malades Gorlin peuvent aussi présenter des anomalies sexuelles comme des kystes ovariens calcifiés, une cryptorchidie (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum) ou un hypogonadisme (défaut de l'appareil reproducteur). La présence de retards mentaux, de glaucomes, de cataractes, de strabismes et d'anomalies rénales ont déjà été diagnostiqués chez certains de ces patients.

Enfin, déjà décrits pour la plupart dans les douze critères de diagnostic, ces patients Gorlin possèdent une forte prédisposition à développer des cancers dont de multiples carcinomes

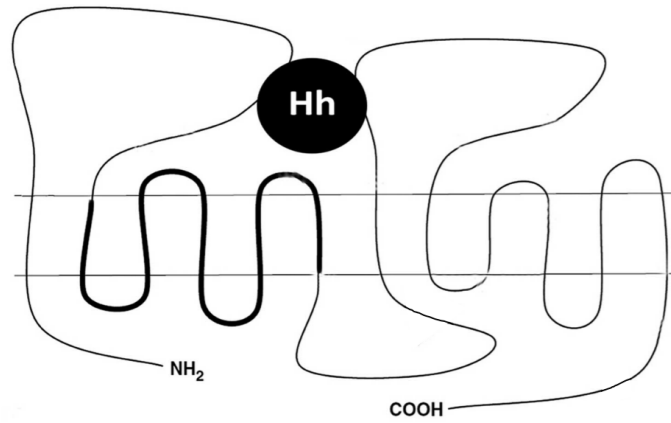


Figure 13 : Structure de la protéine **PTCH1**. On retrouve les 12 domaines transmembranaires et les deux grosses boucles extracellulaires nécessaires à l'interaction avec le ligand hedgehog. Le trait gras correspond au domaine sensible aux stérols (SSD).
D'après Yu *et al.* (90).

basocellulaires, des tumeurs odontogènes kérato-kystiques, des fibromes ovariens et utérins ainsi que des fibromes cardiaques.

La prise en charge classique pour ces patients requiert une approche multidisciplinaire. De manière générale, l'approche chirurgicale est la plus indiquée afin de retirer tous les kystes et les BCC. Si ces derniers sont trop nombreux, d'autres traitements sont possibles comme l'ablation au laser, la thérapie photodynamique ou une chimiothérapie locale. La radiothérapie quand elle doit être évitée. En effet, il a été démontré que les enfants Gorlin traités en radiothérapie développent fréquemment des BCC dans le champ d'irradiation 6 mois à 3 ans après le traitement (91). Plus récemment, on a vu émerger de nouveaux traitements chimiques permettant de traiter les BCC en inhibant spécifiquement la voie sonic hedgehog (SHH) dont l'expression est altérée dans la plupart de ces cancers cutanés. C'est notamment le cas du vismodegib (92) commercialisé par Roche[®] depuis 2013 dans l'Union Européenne.

Enfin, l'espérance de vie n'est pas significativement altérée, mais les nombreuses complications dues aux survenues de multiples tumeurs peuvent entraîner une morbidité non négligeable chez ces patients.

2) Etiologie

Le gène Patched-1 receptor, *PTCH1*, a été identifié en 1996 (93, 94) comme étant le gène principalement responsable de la naéviomatose basocellulaire. Situé sur le chromosome 9q22-23 (95-97), ce gène suppresseur de tumeur code pour un récepteur transmembranaire appartenant à la voie de signalisation sonic hedgehog (SHH) qui permet la régulation de nombreux processus biologiques dont l'embryogenèse et le contrôle de la prolifération cellulaire (98).

Le gène *PTCH1* est composé de 23 exons codant pour une protéine constituée de 12 domaines transmembranaires ainsi que de deux larges boucles extracellulaires et d'une boucle intracellulaire (Figure 13). Deux groupes ont démontré la même année l'importance des boucles extracellulaires dans l'interaction de PTCH1 avec son ligand, la protéine sonic hedgehog (99, 100). Il faudra attendre 6 ans pour que Ming *et al.* suggèrent l'importance de la boucle intracellulaire dans l'interaction entre PTCH1 et smoothed, SMO, un récepteur couplé aux protéines G (101).

Plus de 250 mutations se répartissant tout le long du gène ont déjà été reportées (102) mais aucun hot spot mutationnel n'a été décrit chez les patients Gorlin (83). La nature des mutations est variée: délétions, insertions, erreur d'épissage,... et mène le plus souvent à des mutations perte de fonction. En effet, près de 80% de ces mutations entraînent l'apparition d'un codon stop précoce et donc d'une protéine tronquée (84). La seconde boucle extracellulaire a donc peu de chance de se former empêchant ainsi l'interaction entre PTCH1 et la protéine sonic hedgehog.

Toutefois, il existe une hétérogénéité génétique dans le syndrome de Gorlin avec quelques familles possédant des mutations dans les gènes Patched-2 receptor, *PTCH2* (103), Suppressor of fused, *SUFU* (104) ou même Smoothened, *SMO* (105). Situés respectivement sur le chromosome 1p32, 10q24-q25 et 7q32, ces gènes codent eux aussi pour des acteurs de la voie SHH. En effet, *PTCH2* est un homologue du récepteur *PTCH1*. *SUFU* quant à lui est complexé avec la protéine *GLI* au niveau des cils primaires. Enfin, *SMO* joue un rôle très important dans la transduction du signal de cette voie.

Les patients Gorlin possèdent donc une mutation hétérozygote d'un acteur de la voie sonic hedgehog. Or, la perte d'un seul allèle permet d'entraîner le phénotype Gorlin menant à l'hypothèse d'une haplo-insuffisance (106). Le gène sain produit des protéines saines, mais qui ne permettent pas un fonctionnement correct de la voie SHH. Il y a donc une activation aléatoire de cette voie chez les patients atteints du syndrome de Gorlin.

B - La voie sonic hedgehog (SHH)

1) Historique et généralités

La première identification d'un acteur de la voie sonic hedgehog fut réalisée par Eric Wieschaus et Christiane Nüsslein-Volhard en 1980 lors de recherche sur le développement embryonnaire chez *drosophila melanogaster* (107). Ils mirent en évidence une désorganisation de la distribution des petites excroissances cutanées, les denticules, habituellement présentes uniquement sur la partie antérieure des drosophiles sauvages. Ces larves porteuses de mutations dans le gène hedgehog (*Hh*) étaient alors entièrement recouvertes de denticules lui donnant un

aspect de hérisson (hedgehog en anglais). Cet article scientifique leur valu le Prix Nobel de physiologie et médecine en 1995.

Il faudra attendre une dizaine d'années pour que les scientifiques commencent à avancer des preuves génétiques du rôle de cette protéine dans la signalisation intercellulaire (108, 109). Le clonage du gène a depuis permis de confirmer son rôle de morphogène pouvant établir la polarité dorso-ventrale grâce à un gradient de concentration, ainsi que de mitogènes régulant la prolifération cellulaire (110-113).

Rapidement, plusieurs groupes mirent en évidence la présence de plusieurs homologues au gène *hh* chez le poulet, la souris, le poisson-zèbre ainsi que chez l'homme (114-117). Au total, trois orthologues furent identifiés chez les vertébrés : Desert hedgehog (*DHH*), Indian hedgehog (*IHH*) et Sonic hedgehog (*SHH*). Les deux premiers furent nommés d'après des races de hérissons tandis que le troisième doit son nom au personnage de jeu vidéo créé pour la Sega Megadrive, Sonic le hérisson.

A travers l'exemple de cette protéine, c'est l'ensemble de la voie de signalisation qui a été conservée à travers l'évolution témoignant de son caractère fondamental.

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont permis d'établir l'importance de la signalisation SHH dans les processus d'embryogenèse. Que ce soit chez les invertébrés ou les vertébrés, cette voie permet la régulation spatiale et temporelle de la formation et de la migration de divers tissus dont le tube neural, les poumons, la peau, le squelette axial, les dents et les membres (98, 118-120). Elle est, de plus, cruciale au processus d'organogénèse en contrôlant notamment la croissance des doigts et l'organisation du cerveau. Plus récemment, son implication dans l'hématopoïèse a aussi été démontrée (121).

En revanche, chez l'adulte, cette voie est inhibée, mais peut être réactivée pour permettre la régénération tissulaire, ainsi que la prolifération et la survie cellulaire (113). Elle reste aussi impliquée dans l'homéostasie et le renouvellement des cellules souches (121, 122).

2) Fonctionnement

a. De la drosophile à l'Homme

Globalement, le fonctionnement général de la voie sonic hedgehog est comparable entre les vertébrés et les invertébrés. Pour preuve, la plupart des études génétiques visant à mieux

comprendre les mécanismes d'actions de cette voie de signalisation ont été conduites chez la drosophile et appliquées chez l'Homme. Cependant, il est clair que la voie SHH a gagné en complexité de par le nombre croissant d'isoformes de gènes chez les mammifères.

Ainsi, il existe trois homologues humains au gène hedgehog de la drosophile : sonic hedgehog, desert hedgehog et indian hedgehog. Si le premier est le plus exprimé et donc le plus étudié des trois, les deux autres possèdent tout de même un rôle important au cours du développement de plusieurs organes dont le système nerveux central et le cartilage respectivement.

Cette complexification se retrouve aussi au travers du récepteur protéin patch homolog, PTCH qui est retrouvé en deux exemplaires chez l'Homme : PTCH1 et PTCH2. Ce dernier est retrouvé exprimé dans les yeux et dans les cellules épithéliales des dents en formation et des follicules pileux (123). Toutefois, PTCH1 reste le récepteur le plus largement exprimé dans les cellules humaines.

Il en va de même pour d'autres acteurs importants de la voie SHH (Tableau 2).

Gène chez la drosophile	Gène chez l'Homme	Fonction
Hedgehog (<i>hh</i>)	Sonic hedgehog (<i>SHH</i>) Indian Hedgehog (<i>IHH</i>) Desert Hedgehog (<i>DHH</i>)	Ligand
Patched (<i>ptch</i>)	Patched 1 (<i>PTCH1</i>) Patched 2 (<i>PTCH2</i>)	Récepteur
Smoothened (<i>smo</i>)	Smoothened (<i>SMO</i>)	Transduction du signal
Cubitus interruptus (<i>cu</i>)	Glioma-Associated 1 (<i>GLI1</i>) Glioma-Associated 2 (<i>GLI2</i>) Glioma-Associated 3 (<i>GLI3</i>)	Effecteur

Tableau 2 : Tableau comparatif des principaux acteurs de la voie sonic hedgehog entre la drosophile et l'Homme. Le nombre croissant de gènes pour une même fonction chez l'Homme dénote la complexification de cette voie chez les mammifères.

b. Mécanisme d'action chez l'Homme (Figure 14)

Que ce soit chez l'homme ou chez la drosophile, les protéines de la famille hedgehog sont synthétisées sous la forme de précurseur nécessitant un clivage autoprotéolytique pour être activé. Le fragment N-terminal (HH-N) est par la suite mûri grâce à l'ajout d'un adduit de cholestérol à son extrémité N-terminal et d'un groupement palmitoyl à son extrémité C-terminal. Ces modifications lipidiques sont indispensables pour son ancrage à la surface cellulaire, mais aussi et surtout pour augmenter son activité biologique (124).

La sécrétion des protéines HH modifiées par les cellules qui les produisent dépend notamment de l'activité de la protéine Dispatched (DISP), un récepteur à 12 domaines transmembranaire qui a été initialement identifié chez la drosophile (125). Ce récepteur possède un domaine dit 'sensible aux stérols' (SSD ou Sterol Sensing Domain) (126) montrant ainsi une homologie de séquence avec Patched, le récepteur des facteurs HH. D'autres voies de transport tissu dépendantes (127) ont été mises en évidence pour assurer la diffusion de cette protéine doublement lipidée dans un milieu hydrophile.

Selon le contexte cellulaire, cette protéine pourra avoir une action autocrine et donc agir sur la cellule qui l'a sécrétée, ou bien une action paracrine et donc agir sur les cellules voisines. La façon dont le signal est distribué reste encore inconnue mais plusieurs modèles ont été proposés. L'un d'eux requiert la formation d'un complexe de protéine HH soluble, d'autres proposent le recours aux exosomes ou aux cytonèmes (128). Enfin, l'utilisation de particules lipoprotéiques a aussi été envisagée. Il est fort probable que chaque cellule possède une combinaison de ces mécanismes pour la délivrance du signal (128).

Une fois le signal délivré, le facteur HH va interagir avec son récepteur : la protéine patch homolog, PTCH1. Ce dernier est situé au niveau d'un organite (129) présent uniquement dans les cellules de mammifères : le cil primaire (129). Cette structure, unique par cellule, agit comme un senseur de l'environnement cellulaire. L'interaction entre ces deux acteurs de la voie SHH va déclencher l'internalisation de ce complexe ligand-récepteur dans des vésicules endosomales (128).

Cette internalisation va permettre de lever la répression que ce dernier exerce sur un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) : la protéine smoothened, SMO. Initialement située dans des vésicules intracellulaires, cette protéine à sept domaines transmembranaires est réprimée à l'aide

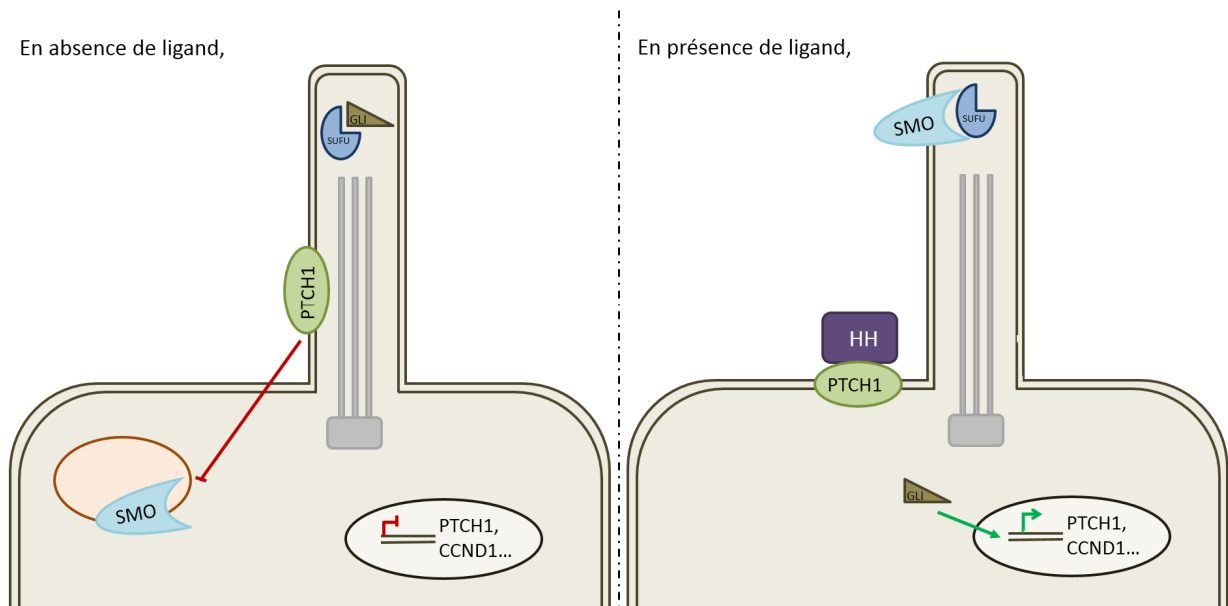


Figure 14 : La voie de signalisation sonic hedgehog. En absence de son ligand hedgehog, PTCH1 (patched homolog 1) localisé au niveau du cil primaire réprime le récepteur SMO (Smoothened). En revanche, en présence de son ligand, la répression de SMO est levée. Il va donc aller interagir au niveau du cil primaire avec le complexe SUFU/GLI (Suppressor of Fused et Glioma Associated Protein). SUFU sera alors dégradé tandis que GLI, activé, sera transloqué dans le noyau où il pourra agir en tant qu'activateur de transcription. Parmi les gènes cibles, on retrouve le récepteur PTCH1, mais aussi la cycline D1 (CCND1). D'après Yao *et al.* (128).

d'un mécanisme non encore élucidé (130). Toutefois, on sait qu'une fois PTCH endocyté, SMO va se diriger vers le cil primaire et y moduler le complexe contenant la protéine Suppressor of Fused (SUFU) et la forme inactive d'une protéine nommée Glioma-associated, GLI. Chez l'homme, il existe trois facteurs de transcription à doigt de zinc GLI : GLI1, GLI2 et GLI3. Le premier va permettre d'activer la réponse, tandis que le dernier agira plutôt comme un répresseur (131). De manière plus générale, il semble surtout que l'activité de chacune de ces protéines dépende du stade de signallement de la voie SHH (131).

Il y aura donc une dissociation de ce complexe SUFU-GLI qui va entraîner la dégradation de la protéine SUFU. De son côté, le facteur GLI va subir des transformations (phosphorylation, sumoylation, ou même protéolyse sélective) qui vont lui permettre de passer du stade de GLI-Réprimé à GLI-Activé (131). Une fois activé, GLI est transloqué dans le noyau où il s'accrochera spécifiquement à des séquences consensus localisées dans les régions promoteurs des gènes cibles permettant d'en réguler l'expression. Parmi ces gènes cibles, on retrouve le facteur de transcription GLI lui-même, mais aussi PTCH, la cycline D1 et des produits impliqués dans la balance prolifération-différentiation (128). Il est à noter que l'une des cibles transcriptionnelles de GLI2 est la cycline D1 (132), responsable du passage à la phase S du cycle cellulaire.

A l'état physiologique, plusieurs phénomènes de rétrocontrôle permettent de réguler cette voie. Parmi ceux-ci, on retrouve les protéines PTCH et HHIP (Hedgehog interacting protein) produites par la signalisation HH et jouant un rôle dans son induction (128).

c. Antagonistes et modulateurs pharmacologiques

Le premier inhibiteur de la voie SHH fut découvert dans les années 1960 grâce à plusieurs scientifiques qui mirent en parallèle la naissance d'agneaux présentant une cyclopie et l'ingestion par leurs mères d'une plante : le *Veratum californicum*. Cette plante contient une grande quantité de cycloamine, un type d'alcaloïde (133). Il a été montré que ce composé se fixe directement sur SMO et inhibe son activité, entraînant l'absence d'activation de la voie SHH (134) (Figure 15). Cependant, la faible efficacité thérapeutique de cette molécule a poussé les scientifiques à chercher des dérivés comme le SANT-1, le SANT-4 ou le GDC-0449 (135). Des modèles pré-cliniques ont d'ores et déjà permis de montrer une inhibition

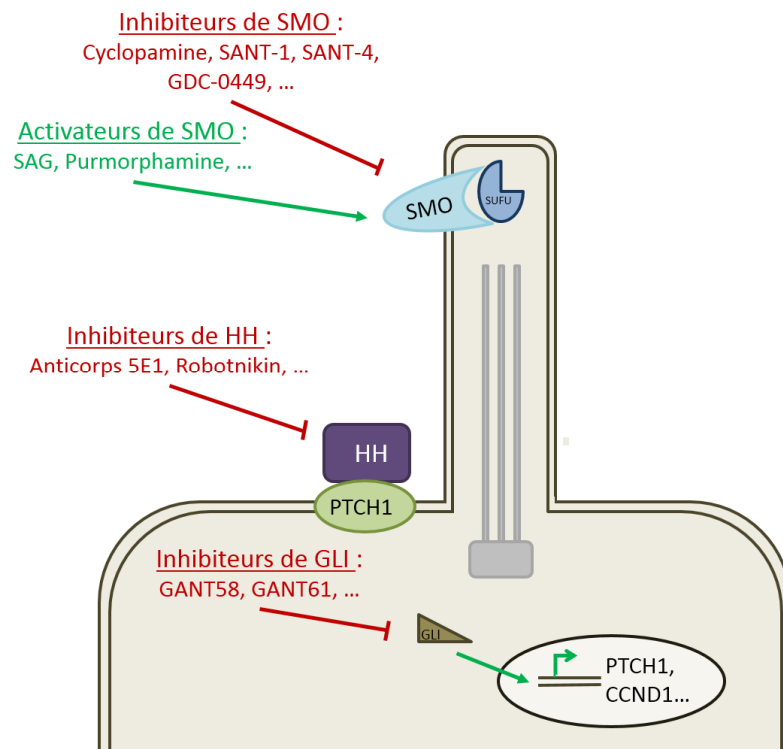


Figure 15 : Les modulateurs de la voie sonic hedgehog. Les inhibiteurs sont représentés en rouge, tandis que les activateurs sont représentés en vert. Trois grandes classes d'inhibiteurs sont représentées ici : ceux modulant la protéine Smoothened, ceux modulant la protéine hedgehog et enfin, ceux modulant la protéine GLI.

D'après Heretsch *et al.* (135).

plus efficace de SMO par ces molécules par rapport à celle de la cyclopatamine (135). Ces molécules sont notamment utilisées dans le traitement des médulloblastomes et des BCC.

La protéine SMO étant à l'interface entre l'initiation de la voie SHH et sa partie cascade réactionnelle, c'est donc la protéine qui est le plus souvent visée pour moduler la voie SHH. Toutefois, certains composants agissant en amont de SMO ont aussi prouvé leur efficacité (Figure 15). C'est le cas des anticorps 5E1 (anti-SHH) ou de la robotnikin qui vont se lier avec plus ou moins d'affinités sur la protéine SHH, empêchant son interaction avec le récepteur PTCH (135). Toutefois, aucun de ces modulateurs n'a encore été utilisé en essai clinique (136).

Enfin, l'autre grande classe de modulateurs de cette voie SHH touche les facteurs de transcriptions GLI. Des composés permettant de bloquer l'activité de transcription de ces protéines et plus spécifiquement de GLI1, comme les molécules GANT 58 et GANT 61 sont en cours de développement (135).

Parallèlement au développement de ces antagonistes synthétiques, les équipes ont développé des agonistes de la voie SHH (Figure 15). Dans cette classe de molécules, on retrouve le SAG (Smoothened Agonist) et la purmorphamine qui ont tous les deux la capacité de se lier à SMO (135). Pour le moment, ces modulateurs sont toujours au stade des essais *in vitro*. Toutefois, il a été montré que le SAG permettrait d'augmenter la survie des neuroblastomes suggérant ainsi un intérêt thérapeutique de la molécule jusqu'alors inexploré (137).

3) Modèles et rôles physiologiques

L'utilisation de modèles cellulaires et animaux a permis d'en apprendre davantage sur les rôles physiologiques de la voie SHH. Bien que les souris wild type ne développent jamais de BCC même après une exposition à un rayonnement UV ou un rayonnement ionisant, les souris PTCH1 +/- sont susceptibles d'induire ces cancers cutanés après de tels stress exogènes (138). Parmi ces souris, une petite proportion va être capable de développer des médulloblastomes et des rhabdomyosarcomes (138). Un autre exemple de souris modèle sont les souris SUFU +/- qui mène au développement d'un phénotype de peau similaire à celui du syndrome de Gorlin mais qui n'entraîne pas de tumeurs (138).

Le rôle de la signalisation SHH dans la survie cellulaire a initialement été décrit *in vitro* dans des cultures de neurones (139), puis *in vivo* sur un modèle d'embryon de poulet. Dans ce modèle, Charrier *et al.* (140) ont montré que la greffe de cellules produisant le ligand SHH dans le tube neural induit la répression de l'apoptose dans ce dernier. D'autres expériences ont permis de confirmer ce rôle de la voie SHH dans l'apoptose : en présence de son ligand, PTCH transmet le signal positif classique ; en absence de son ligand, PTCH peut induire la mort cellulaire programmée (141). Ainsi, le récepteur PTCH fait partie de la classe des récepteurs à dépendance (142).

Il a aussi pu être mis en évidence que cette voie de signalisation pouvait jouer un rôle dans le cycle cellulaire (Figure 16). En effet, SHH régule positivement la transcription des cyclines de phase G1, mais aussi les cyclines D et E (143). De plus, la protéine SHH serait capable de lever l'inhibition exercée par PTCH sur la cycline B favorisant la progression de la phase G2 à la phase M (98, 144).

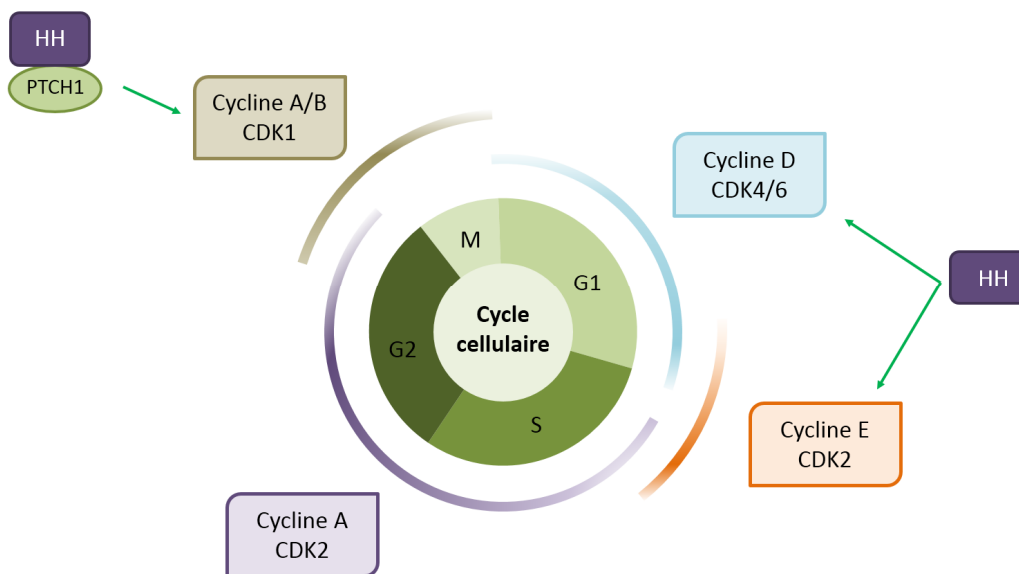


Figure 16 : Lien entre régulation du cycle cellulaire et voie sonic hedgehog. La protéine hedgehog permet de réguler positivement la transcription des cyclines D et E. Cette protéine permet aussi de par son interaction avec le récepteur transmembranaire PTCH1 de lever l'inhibition que ce dernier exerce sur la cycline B.

D'après Roy *et al.* (144).

4) Implications pathologiques de défauts dans la voie

SHH

Etant donné le rôle fondamental de la voie SHH dans la régulation de nombreux aspects de l'embryogenèse, de la croissance à la spécification des types cellulaires, en passant par la prolifération et la survie, il n'est pas surprenant que les mutations affectant des gènes impliqués dans cette voie soient liées à un grand nombre de malformations.

Des mutations congénitales conduisant à une répression constitutive du signal HH peuvent être responsables de l'apparition d'un syndrome appelé l'holoprosencéphalie (HPE) (101). Cette malformation sévère du cerveau entraîne une séparation incomplète du télencéphale et peut s'accompagner de malformations cranio-faciales plus légères comme le bec de lièvre ou très graves, voir létales comme la cyclopie (145).

D'autres mutations touchant cette fois-ci le gène *SHH* ont été associées à des malformations des membres. Hill *et al.* (146) ont en effet démontré que ces mutations pouvaient entraîner des phénotypes allant de la perte des os des mains et des pieds à la syndactylie et la fusion des doigts.

Enfin, la première observation établissant un lien entre la voie SHH et l'apparition de tumeurs a été faite en 1996. Depuis, il a été montré que cette voie de signalisation est impliquée dans près de 25% des cancers humains, allant du cancer du poumon à celui des ovaires, en passant par le cancer du sein, les leucémies et la plupart des carcinomes basocellulaires (128). Une classification de ces cancers a été proposée en fonction de l'implication de la dérégulation de la voie SHH dans l'apparition des cancers (147) (Figure 17).

- Le cancer de type I correspond à une mutation entraînant une suractivation indépendante du ligand de la voie SHH (147). Ce cas de figure est notamment observé lorsque des acteurs de la voie de signalisation comme *SUFU*, *SMO* ou même *PTCH* sont mutés. Il a été montré que 85% des carcinomes basocellulaires sont dus à des mutations inactivatrices de *PTCH*, alors que seulement 10% sont dues à des mutations activatrices de *SMO* (148). Il est intéressant de noter que le positionnement des mutations au sein du gène codant pour la protéine *PTCH* est différent entre les BCC sporadiques et les BCC développés par les patients atteints du syndrome de Gorlin (102). Dans cette classe, on retrouve aussi les médulloblastomes et les rhabdomyosarcomes qui sont pour environ un tiers d'entre eux dus à des mutations de *PTCH* ou de *SUFU* (149).

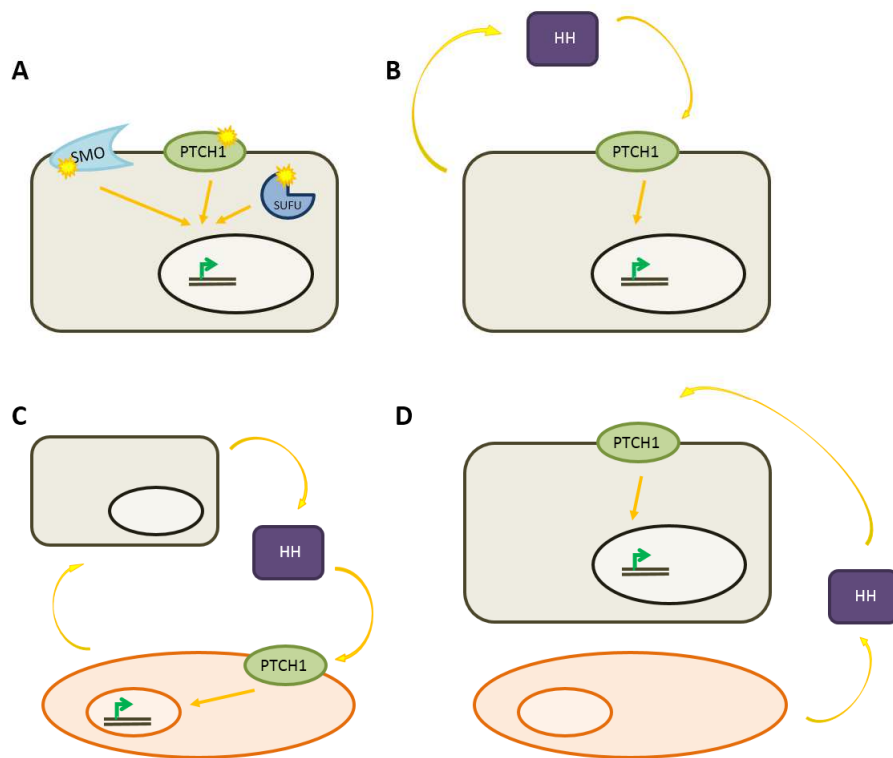


Figure 17 : Implication de la voie sonic hedgehog dans la survenue des cancers.

On retrouve les 4 classes : A) Le cancer de type I, ligand-indépendant, dans lequel une mutation d'un des acteurs principaux de la voie SHH mène à l'activation indépendante du ligand de celle-ci. B) Le cancer de type II, ligand-dépendant, dans lequel la cellule tumorale va produire le ligand qui va permettre de s'autoactiver, ou d'activer une cellule voisine. C) Le cancer de type III, ligand-dépendant, dans lequel la cellule tumorale va produire du ligand qui va permettre d'activer une cellule stromale. D) Le cancer de type IV, ligand-dépendant, dans lequel la cellule stromale produit le ligand permettant l'activation de la voie SHH dans la cellule tumorale.

D'après Teglund *et al.* (147).

- La classe des cancers de type II correspond quant à elle aux cancers ligand dépendant (147). Ces cancers sont dus à des mutations entraînant une suractivation de la voie SHH à cause d'une surproduction de morphogène HH. Par action paracrine, la cellule elle-même ou les cellules voisines seront donc activées. Dans cette classe, on retrouve certains cancers de l'appareil digestif (œsophage, estomac...) (150).

- Dans le cancer de type III récemment décrit, l'apparition de la tumeur est due à une dérégulation de la voie SHH menant à une activation paracrine dépendante du ligand (147). Plus simplement, la production de protéine HH par les cellules tumorales va entraîner une réponse des cellules stromales environnantes. Ces dernières vont donc réagir en permettant l'activation de signaux menant notamment à la production de facteurs de croissance comme l'IGF (Insulin growth factor) ou le VEGF (Vascular endothelial growth factor). Ces facteurs de croissance joueront donc un rôle dans la survie et la croissance de la tumeur (130).

- Enfin, les cancers de type IV présentent une activation paracrine inverse (147). En clair, les cellules tumorales seront activées par le morphogène hedgehog produit par le stroma. C'est notamment le cas dans les leucémies et les lymphomes où la protéine hedgehog secrétée par le stroma est indispensable à la survie des cellules tumorales grâce à l'augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 (151, 152).

C - La peau

1) Généralités et structure

D'une surface de près de 2 m² et d'un poids variant de 4 à 10kg, la peau est l'organe à la fois le plus étendu et le plus lourd du corps humain (153). Selon l'endroit du corps, elle ne présente pas la même morphologie ; elle peut être plus ou moins élastique, moite ou sèche, plus ou moins consistante, poreuse, pâle ou hâlée. Elle constitue toutefois la première barrière naturelle contre les agressions extérieures (chocs, pollution, microbes...). La peau joue également de nombreux autres rôles dont la photoprotection, la régulation thermique, la synthèse hormonale (notamment de vitamine D) et un rôle d'informateur sensoriel grâce à la présence de nombreux récepteurs et à ses multiples innervations (154).

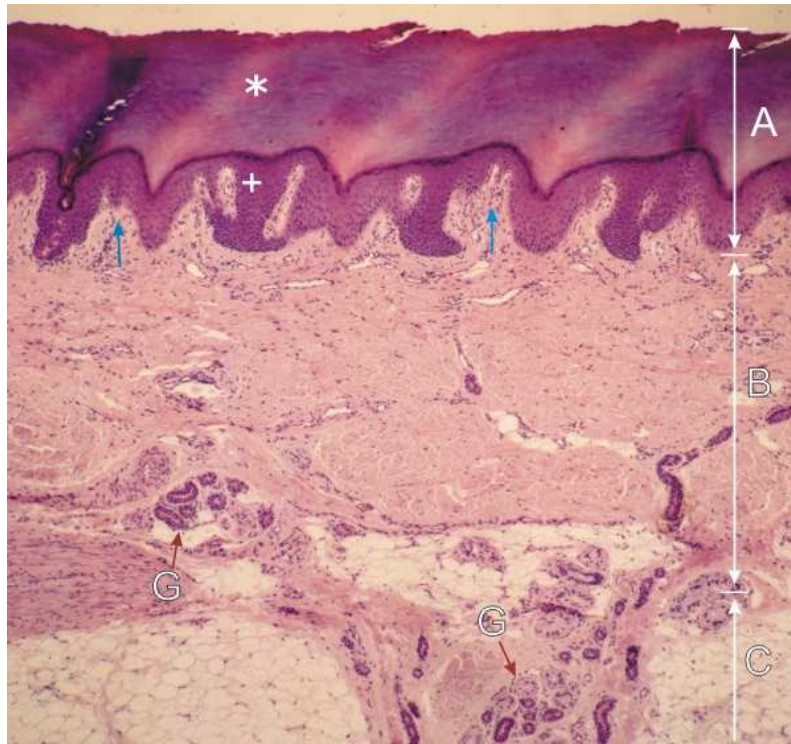


Figure 18 : Coupe de peau de la main au microscope optique. On retrouve les trois couches composant la peau : A) l'épiderme ; B) le derme et C) l'hypoderme. La lettre G représente les coupes de glandes sudoripares situées à la limite entre le derme et l'hypoderme.
http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/skin_1_F.html

Malgré ces nombreuses fonctions, la peau est un organe souple et très résistant qui doit ces propriétés aux trois couches tissulaires qui la composent (Figuer 18) :

- L'épiderme est la couche la plus externe et la plus mince avec une épaisseur variant de 0,05 mm à 1,5 mm. Assurant l'imperméabilité et la résistance de la peau, cette couche n'est irriguée par aucun vaisseau sanguin ; les cellules le composant étant alimentées par diffusion depuis le derme. En revanche, on retrouve de nombreuses terminaisons nerveuses responsables de la douleur ressentie en cas de lésions superficielles.

Représentant près de 80% des cellules épithéliales, les cellules principales de l'épiderme sont les kératinocytes. Ces cellules squameuses sont remplies de kératines (protéines entrant dans la composition des cheveux et des ongles) et de lipides. Leur production a lieu dans la strate la plus interne de l'épiderme, le *stratum germinativum*. Ils diffusent ensuite jusqu'à la strate la plus externe, le *stratum corneum*. Au niveau de cette couche, les kératinocytes morts, maintenant appelés cornéocytes, sont éliminés par desquamation. Le renouvellement de ces kératinocytes est assuré par l'activité permanente de la couche basale. L'épiderme est ainsi renouvelé en moyenne toutes les 4 semaines.

Cette couche basale de la peau est aussi constituée de mélanocytes, produisant la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau. Ces cellules permettent de protéger les tissus des effets du soleil et s'intercalent entre les cellules basales.

On y retrouve aussi les cellules de Langerhans qui sont produites dans la moelle osseuse et diffusent jusqu'à l'épiderme où elles assureront la protection immunitaire de la peau.

Enfin, les cellules de Merkel servent de mécanorécepteur permettant de ressentir les pressions.

- Le derme possède une épaisseur variant de 5 à 9 mm. C'est dans cette couche que l'on retrouve les vaisseaux sanguins, les fibres nerveuses, les follicules pileux, les fibres de collagène et d'élastine, les glandes sudoripares et les glandes sébacées. Le derme est principalement constitué de différentes cellules comme les lymphocytes et les mastocytes jouant un rôle dans les réactions immunitaires de cet organe. Synthétisant l'ensemble de la matrice extracellulaire dont le collagène indispensable à l'élasticité de la peau, les fibroblastes interviennent également dans le métabolisme des lipoprotéines et du cholestérol.

- L'hypoderme est la couche la plus profonde. C'est un tissu riche en graisse et en vaisseaux sanguins dont les cellules principales sont les adipocytes. Il joue donc le rôle de réserve énergétique. Sa taille varie en fonction de la zone du corps : épaisse au niveau des talons et des fesses, beaucoup plus fine dans le dos par exemple. C'est donc un matelas protecteur

permettant d'amortir les chocs auxquelles l'organisme peut être soumis. Enfin, il joue aussi le rôle d'isolant thermique.

2) Les cancers cutanés

C'est à partir des cellules de l'épiderme que se développent la plupart des cancers de la peau. On distingue la plupart du temps deux grands groupes : les mélanomes et les autres cancers cutanés.

Le premier est donc comme son nom l'indique le cancer se développant aux dépens des mélanocytes présents au niveau de l'épiderme. Au total, ils représentent moins de 10% de ces tumeurs mais un peu plus de 75% des décès liés à ces cancers. Souvent considéré à raison comme étant le plus agressif, il peut évoluer très rapidement sous forme de métastases touchant principalement la peau, les poumons et le cerveau. Parmi les causes expliquant l'apparition de ces tumeurs, on retrouve une forte exposition aux rayons UV accompagnée de coups de soleil répétés (155). Toutefois, d'autres facteurs endogènes comme un grand nombre de grains de beauté présents sur la peau du patient ou la présence de grain de beauté atypique entrent aussi en compte dans l'apparition des mélanomes.

Les 90% restant regroupent donc les autres cancers cutanés. Parmi eux, on retrouve les carcinomes épidermoïdes (CE) et les carcinomes basocellulaires (BCC). Les deux sont des tumeurs se développant aux dépens des cellules principales de l'épiderme : les kératinocytes. Toutefois, le BCC se développera aux dépens de la couche la plus interne de l'épiderme, tandis que le CE lui se développera à partir des strates plus superficielles de cette couche cutanée (156). Ces deux cancers épithéliaux ont beau être considérés comme proches, ils présentent toutefois des caractéristiques épidémiologiques et biologiques différentes.

Le carcinome basocellulaire est la tumeur maligne la plus fréquente chez l'Homme (157). Touchant le plus souvent les zones photo-exposées comme le visage ou le cou, les rayonnements ultraviolets et plus particulièrement les UVB, sont considérés comme l'un des facteurs de risque les plus importants (158). Ces tumeurs ont une très faible faculté à métastaser (157), offrant un diagnostic vital favorable aux patients.

D'un point de vue moléculaire, près de 70% des BCC sporadiques (159) comportent des mutations inactivatrices de *PTCH1* (147, 160, 161), ou dans une moindre mesure, des mutations activatrices de *SMO* (147, 161, 162). Dans les deux cas, le résultat reste le même : la voie sonic

hedgehog est altérée dans ces tumeurs cutanées. Une autre preuve de la suractivation de la voie SHH est la surexpression de GLI1 et GLI2 que l'on retrouve au niveau cellulaire (159). Il est à noter qu'un accroissement du risque de BCC peut être associé à une réduction de la capacité de réparation de l'ADN (159, 163). En effet, des résultats génétiques ont permis d'apporter la preuve que PARP1 et PTCH1 coopéraient pour inhiber la survenue des BCC (164). Le lien mécanistique entre ces deux protéines reste à explorer mais aucune délétion du locus de *PARP1* n'a été rapporté dans les cancers humains (165). Toutefois, un autre exemple du lien étroit entre BCC et réparation de l'ADN est la présence de nombreuses études démontrant une modulation de ces cancers cutanés par les différents variants de gènes de réparation et notamment par XRCC1 (166, 167).

Afin de mieux comprendre le rôle capital de cette voie de signalisation dans l'apparition des BCC, des modèles murins ont été créés. C'est le cas notamment des souris SHH, SMO ou même GLI transgénique. Toutefois, l'un des modèles les plus étudiés est celui des souris hétérozygotes PTCH +/- modélisant le syndrome de Gorlin. Ces souris exhibent un phénotype NBCCS quasiment identique à celui des humains avec l'apparition de multiples BCC, de médulloblastomes et d'aberrations développementales, comme la polydactyly (147). Ces études sur les animaux ont permis de confirmer l'importance de l'environnement tissulaire sur la croissance de ces tumeurs. En effet, un carcinome basocellulaire prélevé chez une souris transgénique pour SHH et transplanté sur une souris scid (Severe combined immunodeficiency) arrêtera sa croissance et ne se métastasera pas démontrant donc le rôle essentiel de la présence du stroma spécifique des kératinocytes pour le développement de cette tumeur (168, 169).

3) Cas des fibroblastes issus des patients Gorlin

La mutation d'un acteur de la voie SHH étant congénital chez les patients atteints du syndrome de Gorlin, elle est retrouvée dans toutes les cellules de ces patients : du kératinocytes aux fibroblastes. L'importance des fibroblastes dans la forte prédisposition à développer des BCC chez les patients Gorlin a été démontrée par Valin *et al.* (170). Il a en effet été montré que les fibroblastes possédaient une influence sur la transformation de l'épithélium en produisant des facteurs paracrines comme TGF- β jouant un rôle à la fois sur les cellules saines et sur les cellules cancéreuses (171). De plus, de nombreuses évidences ont maintenant démontré que des

mutations au niveau des fibroblastes pouvait entraîner le développement des carcinomes au travers du microenvironnement (171, 172).

De nombreuses études ont cherché à savoir si le phénotype radiosensible de ces patients était aussi retrouvé au niveau cellulaire. Les résultats de ces études sont contradictoires. Certains comme Featherstone *et al.* (173) ont démontré l'absence de la radiosensibilité des fibroblastes issus de patients Gorlin suite à une irradiation ionisante (à l'aide de rayons X ou de rayons γ). La même année, Chan *et al.* (174) établissent au contraire, une hyper-radiosensibilité des fibroblastes Gorlin aux rayons X en utilisant pourtant le même test de survie clonale. Toutefois, leurs résultats se rejoignent sur l'absence de problème dans la réparation de l'ADN dans ces cellules après une irradiation aux rayons X. En revanche, Arlett *et al.* (175) démontrent dans leur étude que les cellules Gorlin possèdent des défauts dans la réparation des dommages créés par les rayons X.

Par la suite, d'autres études se sont intéressées à la réponse de ces cellules aux rayonnements ultraviolets. A nouveau, les résultats obtenus sont contradictoires. Lehmann *et al.* (176) démontrent l'absence de sensibilité des cellules Gorlin aux UVC. Ce résultat est aussi retrouvé par Applegate *et al.* (177), Little *et al.* (178) et Brellier *et al.* (179). En revanche, Nagasawa *et al.* (180) retrouvent dans leur étude une sensibilité des cellules Gorlin aux UVC par rapport aux cellules normales. Après une irradiation aux UVB, à nouveau, certains trouvent une sensibilité (177) d'autres non. Il est toutefois intéressant de noter que la lampe UVB utilisée dans le cadre de l'étude prouvant une sensibilité émet aussi dans les UVA (177)...

Enfin, il a été montré que ces cellules, contrairement aux cellules de personnes saines, possèdent une forte instabilité génomique (181).

III - La radiosensibilité

Qu'elle provienne de sources naturelles comme les rayonnements cosmiques ou des expositions artificielles à travers notamment les irradiations médicales, l'exposition aux rayonnements ionisants est inévitable. Dans un premier paragraphe, nous présenterons ces rayonnements ionisants et leurs conséquences. Excepté lors des grands accidents nucléaires, la population est le plus souvent seulement exposée à de faibles doses d'irradiations dont l'impact sera décrit ici. Enfin, nous terminerons ce chapitre par la description plus détaillée de la radiosensibilité humaine et de son lien aux systèmes de réparation de l'ADN.

A - Les rayonnements ionisants

1) Définitions et généralités

De manière simplifiée, l'atome est composé d'électrons chargés négativement gravitant autour du noyau composé de neutrons de charges nulles et de protons chargés positivement. Chacun de ces composants est en interaction avec les autres à travers des énergies de liaisons. Parmi les atomes existants naturellement, on distingue les atomes stables et les atomes instables, aux propriétés radioactives. Cette instabilité peut être due à un trop grand nombre de particules ; un écart trop important entre le nombre de protons et de neutrons ou même à un trop-plein d'énergie.

Dans tous les cas, afin de corriger ces anomalies, un atome instable aussi nommé radionucléide va se désintégrer et émettre un rayonnement afin de se stabiliser. Il existe trois types de rayonnements :

- Le rayonnement α est émis par les atomes possédant trop de protons ou de neutrons.

Une simple feuille de papier est suffisante pour arrêter un rayonnement alpha.

- Le rayonnement β est émis par des atomes ayant un écart trop important entre le nombre de protons et de neutrons. Il peut correspondre à deux types d'émissions suivant la transformation nécessaire : soit un électron chargé négativement ; soit un anti-électron chargé positivement. Dans tous les cas, une feuille d'aluminium suffit pour arrêter un rayonnement beta.

- Le rayonnement émis par les atomes possédant un trop plein d'énergie. On retrouve ici le rayonnement γ composé de photons de haute énergie issus du noyau et les rayons X

composé de photons issus du nuage électronique. Ce rayonnement pénètre davantage l'organisme que les deux autres, mais entraîne moins de modifications au niveau des particules qu'il rencontre. Une forte épaisseur de plomb est nécessaire pour le stopper.

Finalement, ces trois types de rayonnement sont des rayonnements ionisants (RI), susceptible d'arracher un électron à la matière grâce à l'énergie qu'ils contiennent.

Très rapidement après sa découverte en 1895 par Röntgen (182), l'homme comprend l'intérêt médical de ces rayonnements invisibles : c'est le début de la radiologie. Les praticiens les utilisent alors à forte dose et sans protection... Il faudra attendre quelques années avant que les scientifiques ne perçoivent la dangerosité de ces rayonnements et la nécessité de s'en protéger. Depuis, les données se sont accumulées permettant de mettre en évidence des doses néfastes pour l'organisme. Mais avant cela, il a fallu déterminer des unités permettant d'apprécier l'action de ces rayonnements sur la matière. L'une des plus utilisées en radiobiologie est le Gray (Gy). Cette unité permet de quantifier l'impact des rayonnements ionisants sur la matière en évaluant l'énergie reçue par unité de masse (J/Kg). D'autres unités sont aussi employées comme le becquerel (Bq) qui mesure le niveau de radioactivité d'une source, ou encore le sievert (Sv) qui évalue les effets biologiques des rayonnements sur l'homme.

2) Conséquences : de la cellule à l'organisme

De manière générale, l'état de l'organisme d'une personne irradiée dépend des dommages subis au niveau cellulaire. En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre sur les sources de dommages à l'ADN, l'énergie générée par les rayonnements ionisants va entraîner l'apparition de diverses lésions au niveau de l'ADN comme des cassures double brin et des lésions oxydatives. La réponse aux dommages de l'ADN va prendre en charge l'apparition de ces défauts et réparer la molécule d'ADN lésée. Toutefois, certains systèmes de réparation peuvent induire des erreurs dans la séquence d'ADN entraînant des mutations. Enfin, si la dose reçue est trop forte, les systèmes de réparation seront dépassés et ne pourront plus jouer leur rôle de gardien de l'intégrité du génome.

Si ces lésions au niveau de l'ADN persistent, elles peuvent avoir des conséquences à l'échelle des tissus, des organes voire du corps entier. Ces effets sur l'organisme dépendent de plusieurs facteurs comme le type de rayonnement, la dose absorbée, le débit et la durée de l'exposition.

A l'échelle de l'organisme, les rayonnements ionisants peuvent avoir trois types d'effets (Figure 19):

- Un effet nul.

- Un effet déterministe résultant de dommages irréparables de l'ADN et entraînant une forte mortalité cellulaire. Cet effet est dose-dépendant : l'apparition de l'effet est certaine à partir d'un seuil limite de rayonnements sur un organe donné. L'importance et la gravité des symptômes augmentent ensuite avec la dose reçue. Ces derniers apparaissent le plus souvent précocement mais ils peuvent être accompagnés d'effets secondaires observables des années après une irradiation.

- Un effet stochastique dû à l'apparition de mutations persistantes dans l'ADN et pouvant mener à une augmentation de la survenue des cancers après plusieurs années. La gravité de cet effet est identique quelle que soit la dose. En revanche, la fréquence d'apparition de ce risque augmente avec la dose reçue. En d'autres termes, le pourcentage de sujets exposés chez qui on observe ce type d'effet, augmente avec la dose. Cet effet a pour conséquence l'apparition de cancers et d'effets héréditaires.

3) Cas des faibles doses d'irradiation

En radiobiologie, les faibles doses d'irradiation sont des expositions à des rayonnements ionisants qui se situent à un niveau inférieur à 0,1 Gy. C'est ce domaine de doses, très largement en dessous de celle où l'on commence à voir apparaître les premiers effets déterministes et inférieure aux limites actuelles de détections des effets stochastiques, que reçoit la plus grande partie de la population.

A l'heure actuelle, les effets sur la santé humaine d'une exposition aux faibles doses de rayonnements ionisants sont estimés en extrapolant les études épidémiologiques, dont celles menées après les bombardements d'Hiroshima et Nagasaki (183). Cette dernière a permis de mettre en évidence un seuil en deçà duquel aucune réponse de l'organisme n'est décelable. En effet, au-delà de 100 mSv (soit environ 0,1 Gy chez l'Homme pour un rayonnement γ), le risque de cancers solides et de leucémies augmente significativement chez les personnes exposées (184).

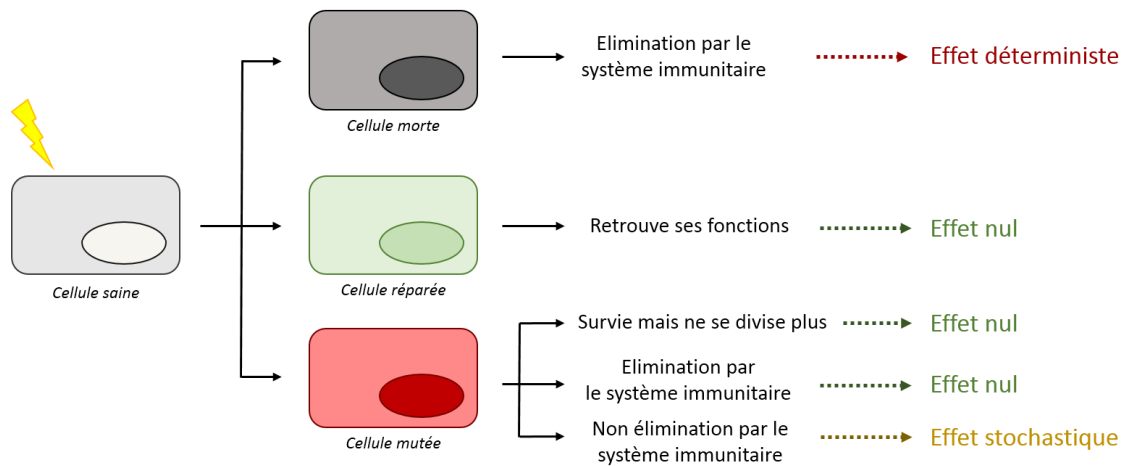


Figure 19 : Conséquences des rayonnements ionisants sur la cellule et leurs effets au niveau de l'organisme. Une irradiation peut entraîner la mort cellulaire résultant en un effet déterministe. Elle peut aussi mener à des lésions de l'ADN qui seront réparées résultant en un effet nul au niveau de l'organisme. Enfin, les irradiations ionisantes peuvent entraîner des mutations au niveau de l'ADN. La cellule peut survivre tout en perdant ses capacités prolifératives, ou elle peut être éliminé par le système immunitaire résultant en un effet nul au niveau de l'organisme. La dernière possibilité est la non élimination de la cellule mutée pouvant mener à un effet stochastique à long terme.

<http://www.cea.fr/jeunes/themes/les-sciences-du-vivant/l-essentiel-sur-les-effets-des-rayonnements-ion%20>

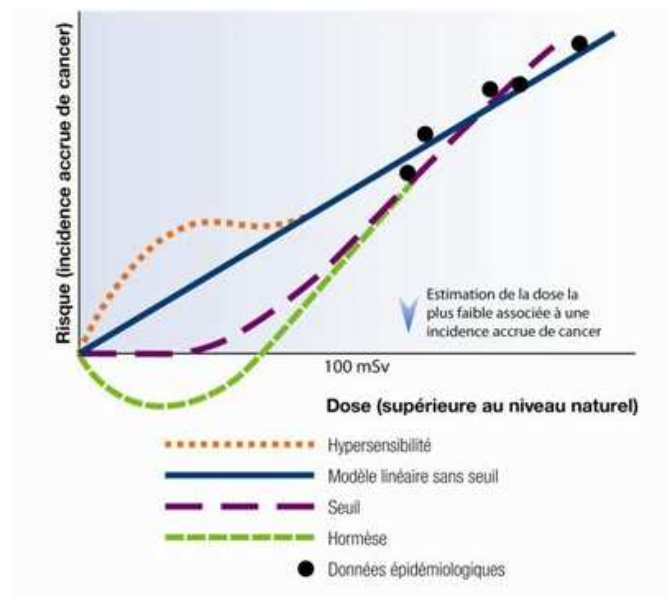


Figure 20 : Représentation des modèles de relation dose-effet après irradiation à des faibles doses. On retrouve donc le modèle d'hypersensibilité correspondant à une augmentation du risque aux faibles doses d'irradiations. Au contraire, le modèle de l'hormèse suggère un effet bénéfique des faibles doses. Entre les deux, on retrouve le modèle de la relation linéaire sans seuil (LNT), ainsi que le modèle fondé sur l'existence d'un seuil.

<http://nuclearsafety.gc.ca/fra/resources/health/linear-non-threshold-model/index.cfm>

Dans la famille des consortiums internationaux, le projet européen RISC-RAD (Radiosensitivity of Individuals and Susceptibility to Cancer Induced by Ionizing Radiations) a permis de démontrer qu'il n'existe pas de forme unique de relation dose d'irradiation reçue/effet biologique. Le modèle le plus utilisé est la relation linéaire sans seuil (ou LNT pour linear non-threshold relationship), dans lequel le risque de cancer est proportionnel à la dose d'irradiation reçue. Un autre modèle suggère un risque plus important à des faibles doses, tandis qu'un troisième fondé sur l'hormèse suggère que de faibles doses de rayonnement peuvent même avoir un effet protecteur et bénéfique. Enfin, le dernier modèle est fondé sur l'existence d'un seuil au-dessous duquel l'irradiation n'a pas d'effet (Figure 20).

Le risque d'apparition de cancers radioinduits reste particulièrement difficile à mesurer du fait de l'apparition spontanée de mutations chez l'Homme et de sa variabilité individuelle à la radiosensibilité. C'est pourquoi, encore maintenant, c'est la LNT qui est le modèle utilisé par les instances officielles pour déterminer les normes d'exposition.

B - La radiosensibilité humaine

1) Définition et généralités

Le phénomène de radiosensibilité humaine individuelle aux rayonnements ionisants est connu des radiothérapeutes depuis bien longtemps. En effet, l'étude des complications survenues après une radiothérapie en l'absence d'erreur de dose a montré que 5 à 15% des patients développent des effets secondaires néfastes (185).

La technique standard de détermination de cette radiosensibilité a longtemps été le test clonogénique dans lequel on mesurait le nombre de colonies cellulaires résistantes à une irradiation (186). Après avoir analysé des centaines de courbes de survie de cellules humaines, Fertil et Malaise ont réussi à établir une corrélation entre la radiosensibilité cellulaire et la curabilité *in vitro* des cancers. De plus, ils démontrent dans cette étude que chaque lignée cellulaire peut être caractérisée par sa propre valeur de survie cellulaire à 2 Gy ou SF2 (survival fraction at 2 Gy) (187). Enfin, cette étude révèle que la radiosensibilité n'est pas un phénomène de tout-ou-rien. Toutes les valeurs sont possibles : de l'hyper-radiosensibilité à l'hyper-radiorésistance.

Quatre groupes (188) ont été déterminés afin de classer les maladies radiosensibles :

- Le groupe I, dans lequel les patients présentent une radiorésistance et pas de prédisposition au développement de cancers. Il correspond aux SF2 supérieur à 45%.

- Le groupe II, dans lequel les patients présentent une radiosensibilité modérée et une prédisposition au développement de cancers radioinduits comme les patients atteints du syndrome de Werner. Il correspond aux SF2 compris entre 7 et 45%.

- Le groupe IIIa, dans lequel les patients présentent une hyper-radiosensibilité et une prédisposition au développement de cancers radioinduits. Dans ce groupe, on retrouve les maladies comme les progeria. La SF2 est ici inférieur à 7%.

- Le groupe IIIb, dans lequel les patients présentent une hyper-radiosensibilité. Ce sont les lignées AT issues de patients atteints d'ataxie télangiectasie qui présente la plus faible SF2 et donc la plus forte radiosensibilité (189). A nouveau, la SF2 est inférieur à 7%.

2) Radiosensibilité et réparation de l'ADN

La publication de la première liste des maladies génétiques radiosensibles (190) a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de la signalisation et de la réparation de l'ADN comme facteur déterminant dans la radiosensibilité (189).

Globalement, toutes les études recherchant un lien entre réparation de l'ADN et radiosensibilité font ressortir deux voies majeures de la réparation. La première est la voie de réparation par suture non homologue (NHEJ) (191) qui peut mener à des défauts de sutures entraînant la mort cellulaire. Les défauts dans cette voie de réparation conduisent à une forte radiosensibilité. La NHEJ étant aussi impliquée dans la recombinaison V(D)J nécessaire à la formation des immunoglobulines, une forte immunodéficiences peut aussi toucher les patients atteints de troubles dans cette voie de réparation.

La deuxième voie de réparation de l'ADN jouant un rôle dans la radiosensibilité est la voie de recombinaison homologue (191). Des défauts dans la HR auront un impact plus faible sur la survie cellulaire. Toutefois, un manque de contrôle de la recombinaison peut entraîner une instabilité génomique et donc une forte prédisposition aux cancers. Un dysfonctionnement de la recombinaison homologue peut aussi parfois induire une chimiosensibilité ou même une photosensibilité due à la redondance des acteurs protéiques du HR et de la conversion de dommages de bases en cassure simple brin.

Plus récemment, le système MMR a lui aussi été décrit comme étant impliqué dans la

radiosensibilité cellulaire (192, 193).

D'un point de vue moléculaire, la protéine Ku70, appartenant à la voie NHEJ joue un rôle fondamentale dans la radiocurabilité des tumeurs rectales (191). Un autre exemple a été apporté par Soderlund *et al.* (194) qui a démontré l'importance de l'intégrité du complexe MRN pour une bonne radiosensibilité cellulaire des tumeurs du sein. Des études récentes ont mis en évidence une association entre augmentation de l'expression de la protéine Ape1, ADN endonucléases bifonctionnelles du BER et radiorésistance. A l'inverse, une diminution de l'expression de cette protéine entraîne une sensibilisation aux rayonnements ionisants des cellules des cancers colorectaux, du poumon et des ostéosarcomes (195).

Enfin, il a aussi été décrit que certains variant de XRCC1 pouvaient conférer une hyper-radiosensibilité (196, 197). Les variants de PARP1 quant à eux entraînent une radiosensibilité anormale. Une autre étude de ces SNPs (single nucleotid polymorphism) sur des patients traités en radiothérapie pour un cancer de la prostate a mis en évidence un lien entre polymorphisme et gravité des effets déterministes à long terme (198).

Objectifs

Soixante-deux ans après la découverte de la structure de l'acide désoxyribonucléique (2), les nombreuses études toujours en cours démontrent plus que jamais le rôle central de cette molécule. Porteuse de l'information génétique nécessaire à la cellule pour son développement et son bon fonctionnement, la molécule d'ADN doit donc être protégée des attaques perpétuelles d'origines endogènes ou exogènes subies par l'organisme. Afin de contrer ces effets potentiellement dévastateurs, nos cellules ont développé un système de réponses aux lésions de l'ADN : la réponse aux dommages de l'ADN qui comprend l'activation des checkpoints du cycle cellulaire, la modulation de la transcription, l'apoptose et l'activation de la réparation de l'ADN. Chaque type de dommage mènera à l'activation d'une voie spécifique de réparation.

Laissant place à des dommages pouvant être convertis en mutations dans le génome, les déficiences au niveau des systèmes de réparation de l'ADN sont, bien souvent, associées à la cancérogenèse. De rares syndromes héréditaires associant forte prédisposition aux cancers et hypersensibilité tissulaire lors d'expositions à des agents génotoxiques, tels que les ultraviolets et les irradiations ionisantes, sont caractérisés par un défaut de gestion des lésions induites à l'ADN. C'est le cas de l'ataxie télangiectasie, une maladie génétique rare, se traduisant par une sensibilité extrême aux rayonnements ionisants. Causée par la mutation d'un gène clé dans la signalisation des réparations des cassures double brin de l'ADN, les cellules endommagées ne sont plus capables de restaurer leur ADN entraînant un nombre accru de cancer.

Une autre maladie génétique rare à transmission autosomale dominante caractérisée par une hyper-radiosensibilité des cellules est le syndrome de Gorlin, aussi appelé nævomatose basocellulaire. Ce syndrome dont la prévalence est estimée à un individu sur 60000, est caractérisé par des anomalies du développement, une hyper-radiosensibilité et une prédisposition élevée à développer différents cancers dont les carcinomes basocellulaires. D'un point de vue génétique, ce syndrome est dû à une mutation du gène suppresseur de tumeur *PTCH1*, entraînant une activation aléatoire de la voie de signalisation sonic hedgehog, cruciale pour le développement.

L'objectif principal de ce projet de thèse est donc d'étudier l'effet de la dérégulation de la voie sonic hedgehog sur la réponse aux dommages de l'ADN afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à une hyper-radiosensibilité et à une prédisposition élevée aux divers cancers chez les patients Gorlin.

Afin de répondre à cette question, nous avons travaillé avec des fibroblastes primaires issus de patients atteints du syndrome de Gorlin et de personnes saines. Dans un premier temps, nous avons testé les caractéristiques de résistance de ces cellules à plusieurs stress afin d'évaluer

leurs pertinences en tant que modèle d'étude. Nous avons poursuivi ce travail par l'analyse transcriptomique de l'expression de certains gènes appartenant à la voie SHH afin de vérifier l'effet de la mutation du gène *PTCH1*.

Après l'étape de caractérisation du modèle, nous avons décidé d'analyser la réponse de ces cellules à la voie de réparation des lésions oxydatives, le BER, au niveau basal et après des doses croissantes de rayonnements ionisants. L'expression des principaux gènes de cette voie sera étudiée et comparée à l'activité d'excision-resynthèse des petites lésions associées au BER. Enfin, cette voie étant notamment activée en réponse à la présence des espèces réactives de l'oxygène (ROS), nous avons décidé de tester le statut de la production de l'anion superoxyde, l'un des ROS les plus abondamment formés dans la cellule.

Dans un troisième temps, le symptôme de l'hyper-radiosensibilité étant dû la plupart du temps à des défaillances dans les systèmes de réparation des cassures double brin, nous avons décidé d'évaluer le statut de ces derniers, ainsi que du NER, dans les fibroblastes de notre étude. Nous avons donc comparé la modulation de l'expression des gènes du NHEJ, du HR et du NER entre la lignée normale et les lignées de fibroblastes Gorlin à un niveau basal et après l'application de différentes doses de rayonnements ionisants. La voie NER a aussi été analysée à l'aide d'une autre technique permettant l'étude de la réparation des dimères de pyrimidines.

D'autre part, après l'analyse des différentes voies de réparation, nous avons décidé de nous intéresser aux autres paramètres de la réponse aux dommages de l'ADN dont la signalisation des dommages ainsi que l'induction de la mort cellulaire programmée.

Enfin, une étude protéomique comparant la lignée normale à une lignée de fibroblaste Gorlin a été menée afin de comparer les différences d'expressions protéiques sans irradiations.

Résultats

I - Caractérisation des fibroblastes Gorlin

Les patients atteints du syndrome de Gorlin présentent diverses caractéristiques phénotypiques spécifiques de la maladie comme notamment la présence de multiples carcinomes basocellulaires, ou encore la présence d'anomalies squelettiques. De nombreuses études ont aussi apporté la preuve de l'hyper-radiosensibilité de ces patients (173). Ainsi, Wallin *et al.* (91) démontrent une augmentation significative de nombre de BCC chez les enfants Gorlin après une radiothérapie. Même si ces cancers cutanés se développent aux dépens des kératinocytes présents au niveau de l'épiderme, le rôle fondamental des cellules stromales et notamment des fibroblastes, a été confirmé (171, 172). Malgré un phénotype avéré au niveau de l'organisme, le phénotype cellulaire ne semble pas être si clair. En effet, les différentes études menées sur des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin ont donné à des résultats contradictoires quant à leurs radiosensibilités (173-175) et à leurs photosensibilités aux rayonnements ultraviolets B et C (176-180).

Bien que nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN et J. LARMARTINE) aient confirmé la présence de mutations dans le gène *PTCH1* au sein des lignées de fibroblastes primaires Gorlin que nous étudions (Tableau 3), nous avons décidé dans un premier temps de nous assurer du statut de l'expression génique de certains des acteurs de cette voie dans les cellules de notre étude. En effet, toutes les cellules issues de patients Gorlin possèdent une mutation au niveau du gène *PTCH1* (93, 94) (ou plus rarement, d'un des autres acteurs de la voie SHH). Ce gène code pour un récepteur transmembranaire jouant un rôle clé dans la voie sonic hedgehog rappelée en Figure 21. L'activation de cette voie par l'interaction du ligand sonic hedgehog et du récepteur PTCH1 va mener à la translocation de l'un des facteurs GLI à l'intérieur du noyau où il pourra jouer son rôle d'activateur de transcription. Parmi ces facteurs GLI, on retrouve notamment le facteur GLI2 dont l'une des cibles transcriptionnelles est la cycline D1, responsable du passage à la phase S du cycle cellulaire.

Dans un second temps, nous avons décidé de caractériser le statut des quatre lignées de fibroblastes primaires que nous utilisons dans cette étude à l'aide de tests de survie clonogénique. Ainsi, nous avons testé des doses croissantes de stress : rayonnement ionisant, UVB, UVA et bléomycine sur ces cellules. Chacun de ces génotoxiques induit l'apparition de lésions différentes au niveau de la molécule d'ADN et de ce fait, mobilise des voies de réparation distinctes. Cette première étude permet la caractérisation de la réponse différentielle des fibroblastes Gorlin à différents agents génotoxiques.

Nom	Sexe	Age (année)	Origine	Exon affecté	Changement de nucléotide	Effet sur transcrit/ protéine	Séquence de référence
GM00730	F	45	Institut Coriell				
GM01552	M	27	Institut Coriell	Exon1 5' UTR	c 91 del T * -258 del T	Décalage du cadre de lecture	NM1083603 NM108602
GM02098	M	31	Institut Coriell	Intron	ISV 17 +1 G>C	Erreur d'épissage	NM_000263
GM03300	F	11	Institut Coriell	Exon 8	c1168 G>A c1170 delC	Décalage du cadre de lecture	NM_000263

Tableau 3 : Caractéristiques des lignées primaires utilisées lors de cette étude.

Toutes les cellules de cette étude proviennent de l'institut Coriell. Les trois lignées Gorlin possèdent une mutation au niveau du gène *PTCH1*. C'est la lignée GM01552 qui possède la mutation la plus précoce. Puis, par ordre croissant vient la lignée GM03300 et enfin, la lignée GM02098.

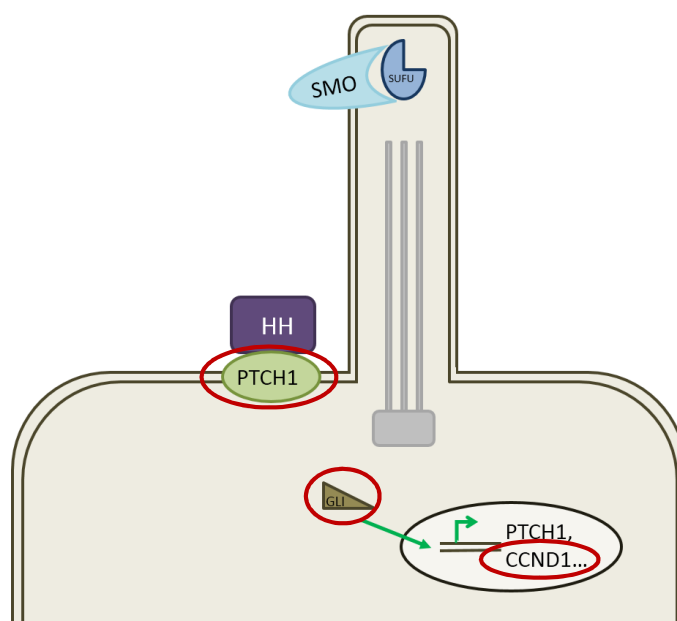


Figure 21 : La voie de signalisation sonic hedgehog et ses principaux acteurs.

L'interaction entre le ligand hedgehog (HH) et le récepteur transmembranaire protein patched homolog 1 (PTCH1) va entraîner l'activation de la voie SHH. Smoothened (SMO), jusque-là réprimé, va pouvoir interagir avec le complexe SUFU-GLI entraînant la libération de ce dernier. GLI, sera alors activé et transloqué dans le noyau où il pourra agir en tant qu'activateur de transcription. Parmi les gènes cibles, on retrouve le récepteur PTCH1, mais aussi la cycline D1 (CCND1).

Les principaux acteurs de la voie testée au regard de leur expression génique sont entourés en rouge.

A - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur l'expression des gènes de la voie de signalisation SHH

Afin de vérifier l'impact des mutations retrouvées par nos collaborateurs au niveau du gène *PTCH1* des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin, nous avons étudié par PCR en temps réel l'expression génique de trois acteurs de la voie de signalisation SHH : *PTCH1*, *GLI2* et la cycline D1 (Figure 22). Cette technique permet la quantification relative de l'expression d'un gène par rapport à un autre.

Nous avons ainsi comparé l'expression de ces gènes entre la lignée de fibroblastes normaux et les trois lignées de fibroblastes primaires Gorlin à un niveau basal. L'expression du gène *PTCH1* a été retrouvée significativement sous-exprimé dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale GM00730. En effet, les valeurs obtenues sont de $0,33 \pm 0,04$ ($p = 1,332E^{-05}$) pour la lignée GM01552, de $0,42 \pm 0,04$ ($p = 2,5549E^{-05}$) pour la lignée GM02098 et de $0,23 \pm 0,04$ ($p = 6,1483E^{-06}$) pour la lignée GM03300 par rapport à la lignée GM00730 sans irradiation.

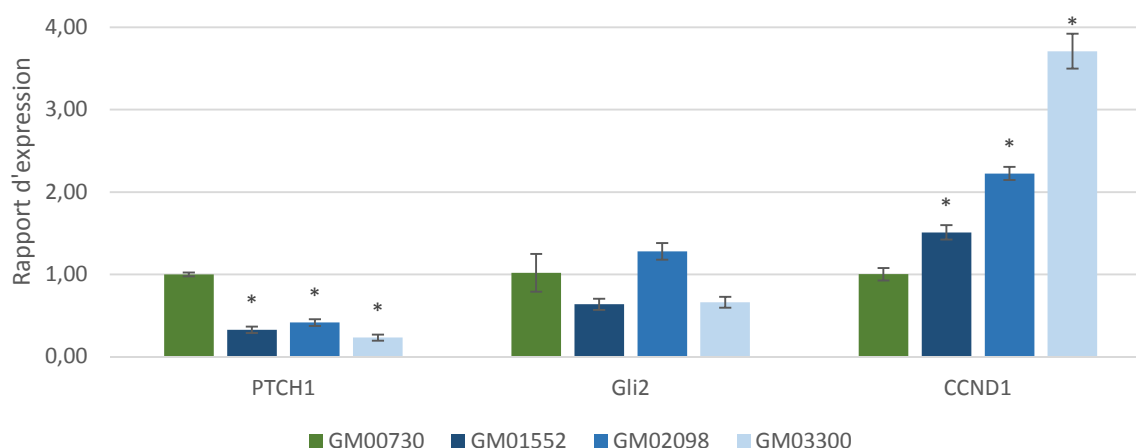


Figure 22 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie SHH de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

On retrouve ici une diminution de l'expression des ARN messagers de *PTCH1* chez les Gorlin ; ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de la cycline D1 (CCND1). En revanche, aucune différence d'expression n'est retrouvée concernant le gène *GLI2*.

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

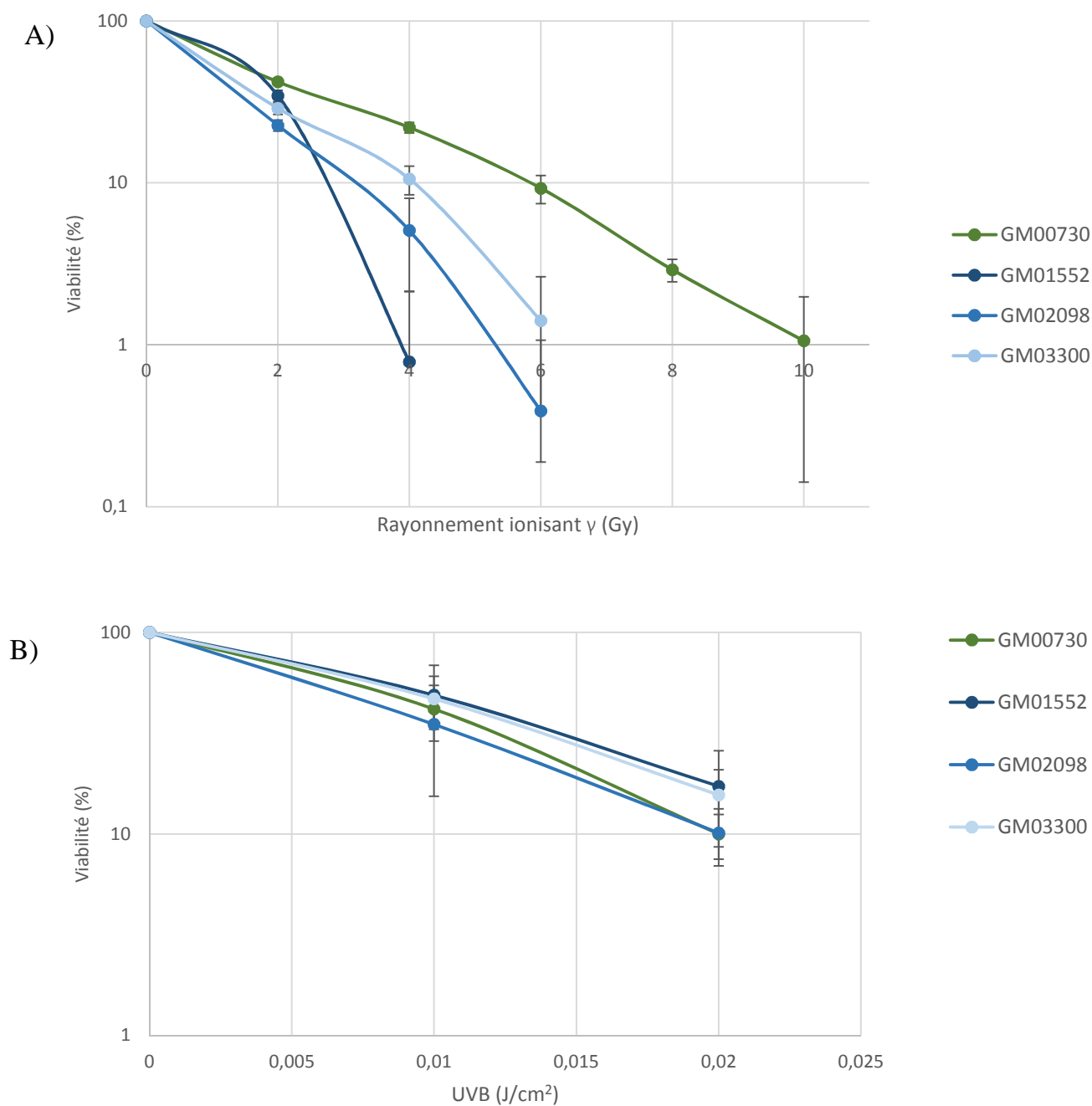


Figure 23 : Courbes de survie de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) après exposition à des doses croissantes de **A) rayonnement ionisant γ** et **B) rayonnement ultraviolet B**. Les lignées primaires Gorlin et normale sontensemencées à très faible densité (20 cellules/cm²) puis sont exposées à des doses croissantes de A) RI allant de 0 Gy à 10 Gy ou B) UVB allant de 0 J/cm² à 0,03 J/cm². Elles sont ensuite cultivées pendant 2 semaines avant révélation des colonies formées à l'aide de cristal violet. Le test statistique Anova à un facteur a été utilisé afin de déterminer la sensibilité individuelle des trois lignées Gorlin aux RI, et non aux UVB, par rapport à la lignée témoin. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chacun des stress étudiés (n = 3).

Une différence significative dans l'expression du gène de la cycline D1, un effecteur de la voie SHH, est retrouvée pour les 3 lignées Gorlin. En revanche cette fois ci, il s'agit d'une surexpression des ARN messagers par rapport à la lignée normale. La lignée GM01552 présente une valeur de $1,51 \pm 0,09$ ($p = 0,0016$), tandis que la valeur de la lignée GM02098 est de $2,23 \pm 0,08$ ($p = 4,20745E^{-05}$). Finalement, la lignée GM03300 présente une valeur de $3,71 \pm 0,21$ ($p = 3,11094E^{-05}$).

En ce qui concerne l'expression de l'ARN messenger du gène codant pour la protéine GLI2, aucune différence n'a pu être mise en évidence à l'aide de cette expérience.

B - Evaluation de la survie clonale à long terme après exposition à différents stress

1) Effet des rayonnements ionisants

Nous avons donc testé en premier lieu la réponse des fibroblastes Gorlin et des fibroblastes normaux à des doses croissantes de rayonnement ionisant γ (Figure 23-A). Comme nous l'avons vu durant l'étude bibliographique, ce stress induit essentiellement au niveau de l'ADN des cassures double brin ainsi que des lésions oxydatives. Il entraînera donc la mobilisation des voies de réparation des cassures double brin (NHEJ et HR) et de la réparation par excision de bases (BER).

Pour ce stress, nous nous sommes intéressés à la valeur de la D0 représentant la dose nécessaire pour l'obtention de 37% de survie cellulaire.

Nos collaborateurs, travaillant sur les mêmes lignées cellulaires, se sont penchés plus finement sur ces données et ont obtenu une valeur de D0 de 1,9 Gy pour la lignée normale. Les lignées Gorlin quant à elles présentent une D0 de 1,4 Gy pour GM02098 et GM03300 et de 1,1 Gy pour GM01552. Les résultats de notre étude vont dans le même sens. Ces données démontrent une hyper-radiosensibilité différentielle des lignées Gorlin par rapport à la lignée normale. Il est à noter que les valeurs de D0 obtenues peuvent être corrélées avec la position des mutations au sein du gène *PTCH1*. Plus le gène est tronqué, plus la lignée est hyper-radiosensible.

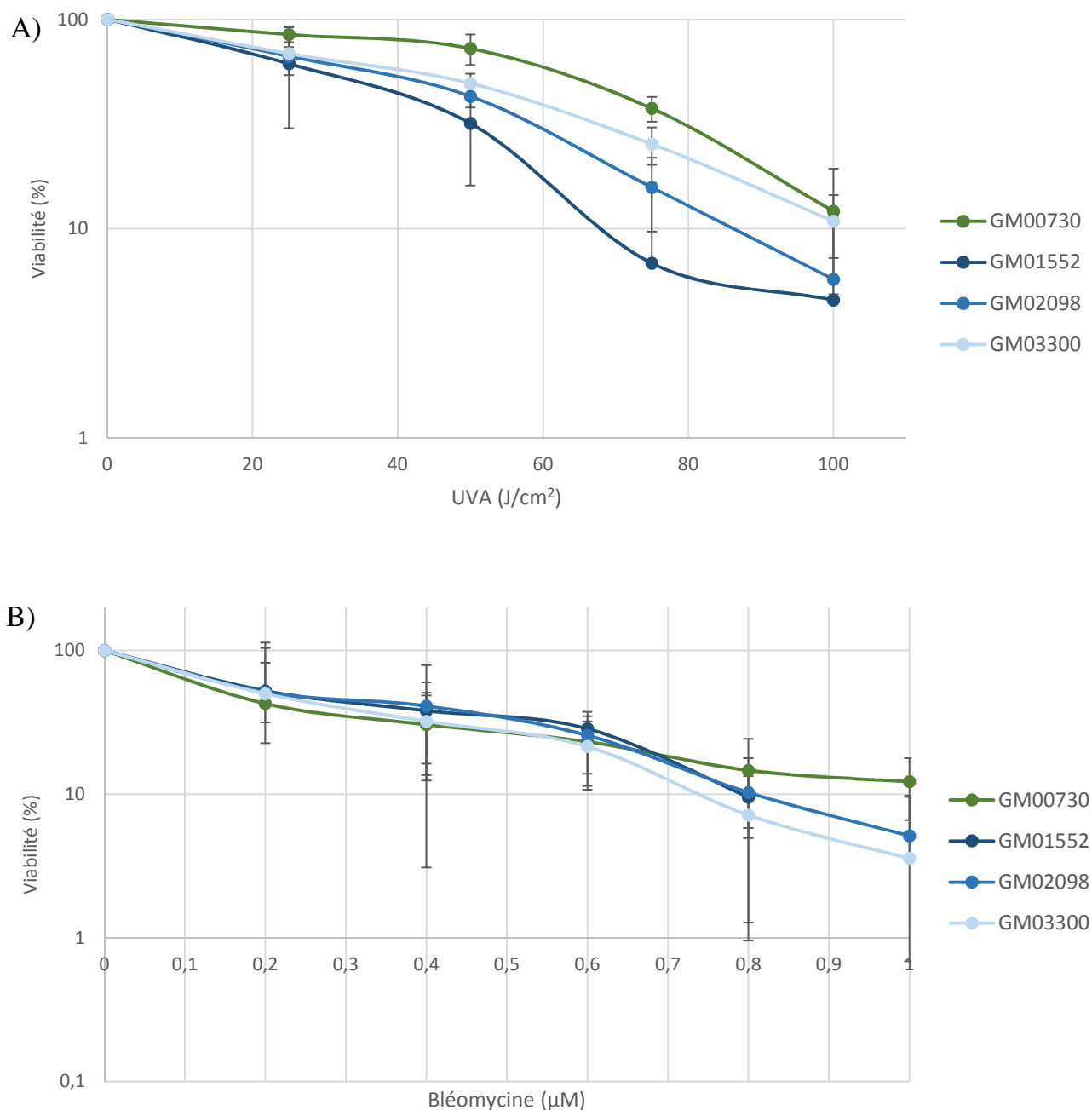


Figure 24 : Courbes de survie de la lignée normale (GM00730) et des lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) après exposition à des doses croissantes de A) rayonnement ultraviolet A et B) bléomycine. Les lignées primaires Gorlin et normale sontensemencées à très faible densité (20 cellules/cm²) puis sont exposées à des doses croissantes de A) UVA allant de 0 J/cm² à 100 J/cm² ou B) bléomycine allant de 0 μM à 1 μM. Elles sont ensuite cultivées pendant 2 semaines avant révélation des colonies formées à l'aide de cristal violet. Le test statistique Anova à un facteur a été utilisé afin de démontrer la sensibilité individuelle des trois lignées Gorlin aux UVA, et non à la bléomycine par rapport à la lignée témoin. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chacun des stress étudiés (n = 3).

2) Effet des UVB

Nous avons ensuite testé la réponse des fibroblastes Gorlin et des fibroblastes normaux à des doses croissantes de rayonnements ultraviolets B (UVB) (Figure 23-B). Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, les UVB vont principalement engendrer des lésions volumineuses au niveau de l'ADN qui entraîneront la mobilisation de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER).

Les résultats de nos expériences montrent que la lignée normale possède un IC_{50} de 0,0082 J/cm^2 . Nous nous sommes ensuite intéressés aux lignées issues de patients atteints du syndrome de Gorlin, les IC_{50} varient de 0,0070 J/cm^2 (pour la lignée GM02098) à 0,0076 J/cm^2 (pour la lignée GM03300) en passant par 0,0097 J/cm^2 (pour la lignée GM01552). Cette étude des courbes de survie clonogénique n'a pas permis de mettre en évidence de différence statistiquement significative entre la lignée normale et les lignées Gorlin.

3) Effet des UVA

Les rayonnements solaires arrivant à la surface terrestre étant composés à la fois des rayonnements UVB et UVA, nous avons donc poursuivi la caractérisation cytotoxique par ces derniers. Ainsi, des doses croissantes d'UVA ont été imposées aux fibroblastes primaires utilisés dans cette étude (Figure 24-A). Ces rayonnements génèrent principalement des radicaux libres menant à la mobilisation conjointe des voies de réparation par excision de nucléotides et par excision de bases.

Cette étude montre que la lignée normale possède un IC_{50} de 68,03 J/cm^2 . Les trois lignées Gorlin présentent quant à elles une sensibilité statistiquement significative aux UVA. En effet, leurs IC_{50} est de 32,28 J/cm^2 pour la lignée GM01552 ; 40,15 J/cm^2 pour la lignée GM02098 et de 46,33 J/cm^2 pour la lignée GM03300.

4) Effet de la bléomycine

Enfin, nous nous sommes intéressés à la réponse des fibroblastes Gorlin et des fibroblastes normaux à des doses croissantes de bléomycine (Figure 24-B). Bien que le mécanisme ne soit pas totalement résolu, ce radiomimétique permet la création de cassures double brin pur

permettant la mobilisation des voies de réparation de ces lésions : NHEJ ou HR, en fonction de la phase du cycle cellulaire.

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre la lignée de fibroblastes primaires normaux et les trois lignées de fibroblastes primaires issues de patients atteints du syndrome de Gorlin. En effet, les expériences que nous avons mené montrent un IC₅₀ de 0,243 µM pour la lignée GM00730, 0,285 µM pour la lignée GM01552, 0,297 µM pour la lignée GM02098 et 0,263 µM pour la lignée GM03300.

C - Conclusion

Le premier pan de ce chapitre sur la validation des fibroblastes Gorlin en tant que modèle de la NBCCS nous a mené à tester le statut de l'expression génique de certains des acteurs de la voie de signalisation SHH dans ces cellules. Comme nous pouvions nous y attendre au vu des résultats obtenus par nos collaborateurs montrant une mutation du gène *PTCH1* dans les lignées primaires Gorlin, l'expression de l'ARN messager de ce récepteur transmembranaire est significativement diminuée dans les cellules Gorlin. Cette diminution a donc probablement un impact au niveau de l'activation de la voie. Les anticorps permettant une reconnaissance de la protéine PTCH1 existent mais sont cependant peu fiables, nous n'avons donc pas pu vérifier ces résultats au niveau protéique.

Toutefois, nous avons testé l'expression génomique de *GLI2* et de la cycline D1, deux autres acteurs de la voie sonic hedgehog. Aucune différence d'expression n'est retrouvée en ce qui concerne le transcrite de *GLI2*. Cela peut s'expliquer par la présence d'autres facteurs de transcription GLI, GLI1 et GLI3, qui sont peut être eux différenciellement régulés chez ces patients. En revanche, la dérégulation de la voie sonic hedgehog entraînée par la mutation présente sur le gène *PTCH1* mène à une augmentation significative de la production des ARN messagers de la cycline D1. Cette cycline joue un rôle très important au niveau du cycle cellulaire et notamment au niveau du passage de la phase G1 à S. Or, nos collaborateurs ayant travaillé plus finement sur les possibles dérégulations du cycle cellulaire présentes au niveau de ces fibroblastes Gorlin démontrent plutôt une modulation au niveau du passage de la phase G2 à M. Toutefois, cette dérégulation de l'expression de la cycline D1 démontre bien une dérégulation de l'activation de la voie SHH.

Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser la réponse des fibroblastes Gorlin et normaux à différents stress induisant différents types de lésions au niveau de l'ADN : rayonnement ionisant, UVB, UVA et bléomycine. Les patients atteints du syndrome de Gorlin étant hyper-radiosensibles, nous avons donc décidé dans un premier temps, de tester la réponse des fibroblastes aux RI afin de savoir si ils étaient capables de reproduire le même phénotype *in vitro*. Le test de survie clonogénique à long terme nous a permis de mettre en évidence une forte sensibilité aux rayonnements ionisants des fibroblastes Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Chan *et al.* (174) qui ont démontré cette hyper-radiosensibilité des fibroblastes Gorlin. Cependant, Featherstone *et al.* (173) n'ont pas réussi à retrouver ces conclusions. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences méthodologiques ou plus probablement par les différences individuelles observées entre les fibroblastes provenant de plusieurs patients atteints par le syndrome de Gorlin. En effet, nos résultats démontrent l'importance de la position de la mutation au niveau du gène *PTCH1* dans la radiosensibilité. Plus la mutation apparaît au début du gène, plus la cellule sera hyper-radiosensible. Ainsi, la lignée GM01552 est donc la lignée la plus hyper-radiosensible avec laquelle nous travaillons. Nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN et Equipe J. LAMARTINE) ont décrit le même phénomène (Publication à paraître). Nous avons vu lors de l'étude bibliographique que les rayonnements ionisants entraînaient l'apparition de cassures double brin et de lésions oxydatives. Ces dernières sont prises en charge par les voies de réparation NHEJ et HR (pour les cassures double brin) et BER (pour les lésions oxydatives).

De nombreuses études se sont intéressées au statut photosensible des lignées issues de patients atteints du syndrome de Gorlin. Par conséquent nous avons décidé d'examiner la réponse des cellules que nous étudions. D'un point de vue global, les tests statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence une sensibilité des lignées Gorlin aux UVB par rapport à la lignée normale. Certaines études et notamment celle de Brellier *et al.* (179) ont mis en évidence le même résultat. En revanche, Applegate *et al.* (177) ont décrit une hypersensibilité des fibroblastes Gorlin à ce stress générateur de photo-produits et de dimères de pyrimidines. Toutefois, ils mentionnent dans leur publication la possibilité que leur lampe UVB puisse aussi émettre dans les longueurs d'ondes correspondant aux UVA. Nous avons donc testé la réponse des fibroblastes de notre étude au regard des UVA et avons réussi à démontrer leurs sensibilités. Les UVA sont connus pour générer des dommages oxydatifs, ainsi que des dimères de pyrimidines (17, 20). Ils entraîneront donc préférentiellement la mobilisation des voie de réparation BER et NER, tandis que les dommages créés par les UVB mèneront plutôt à celle de

la voie NER. Or, ces derniers n'entraînent pas de sensibilités au niveau des fibroblastes Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux.

Lors de cette étude, nous n'avons pas testé les rayonnements UVC pourtant habituellement étudiés. En effet, ceux-ci étant stoppés par l'atmosphère, ils n'atteignent pas la surface terrestre et ne jouent donc pas de rôle au niveau du phénotype des patients Gorlin.

Après les différents stress physiques, nous avons testé un dernier stress chimique : la bléomycine. Après une exposition des cellules à des doses croissantes de ce générateur de cassures double brin purs, aucune différence significative dans la survie cellulaire à long terme n'a pu être observée entre les trois lignées Gorlin et la lignée normale. Ce radiomimétique entraîne la mobilisation des voies de réparation des cassures double brin de l'ADN.

Finalement, cette étude de survie clonogénique à long terme nous permet d'observer une sensibilité des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin aux agents induisant des lésions oxydatives (RI et UVA) prises en charge par la voie BER. Elle démontre que la mutation présente au niveau du gène *PTCH1* dans les fibroblastes atteints du syndrome de Gorlin entraîne une augmentation de la radiosensibilité de ces derniers et que cette augmentation est directement corrélable avec la position de la mutation. Plus la protéine sera tronquée, plus la cellule sera hyper-radiosensible.

Ainsi, ces résultats démontrent que les fibroblastes Gorlin utilisés lors de cette étude représentent un bon modèle cellulaire pour la modélisation du syndrome de Gorlin.

II - Caractérisation de la réparation par la voie BER et stress oxydant

L'observation d'une sensibilité des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin aux agents induisant des lésions oxydatives prises en charge par la voie BER nous a conduit à vérifier l'état de ce système de réparation, dont les principes généraux et les acteurs principaux sont rappelés en Figure 25. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés à préciser l'impact de la mutation du gène *PTCH1* sur la modulation de la voie BER et l'effet de l'irradiation sur cette dernière.

Nous avons ainsi comparé la réparation entre la lignée de fibroblastes normaux et les trois lignées de fibroblastes primaires Gorlin à un niveau basal et après différentes doses d'irradiations aux rayonnements γ . Dans un premier temps, nous avons étudié la modulation du BER au niveau de l'expression génique des acteurs majoritaires de cette voie. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux activités enzymatiques de réparation de cette voie. Enfin, la voie BER étant notamment activée en réponse à la présence des espèces réactives de l'oxygène (ROS), nous avons décidé de tester le statut de la production de l'anion superoxyde, l'un des ROS les plus abondamment formé dans la cellule.

A - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur l'expression des gènes de la voie BER

1) Statut de la voie BER au niveau basal

L'étude de l'expression génique des acteurs principaux de la voie BER a été effectuée à l'aide de la technique de RT-qPCR. Cette technique permet la quantification relative de l'expression d'un gène par rapport à un autre.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'expression des gènes du BER entre les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin et la lignée de fibroblastes normal, pris en tant que référence, à un niveau basal (Figure 26).

De nombreux gènes de la voie BER sont retrouvés sous-exprimés dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale. Ainsi, le gène *UNG* codant pour l'uracil DNA glycosylase est drastiquement sous exprimé chez les Gorlin : de $0,20 \pm 0,05$ (GM01552, $p = 0,0113$) à $0,29 \pm 0,04$ (GM03300, $p = 0,0141$). Le niveau des ARN messagers de *MYH*, une ADN glycosylase

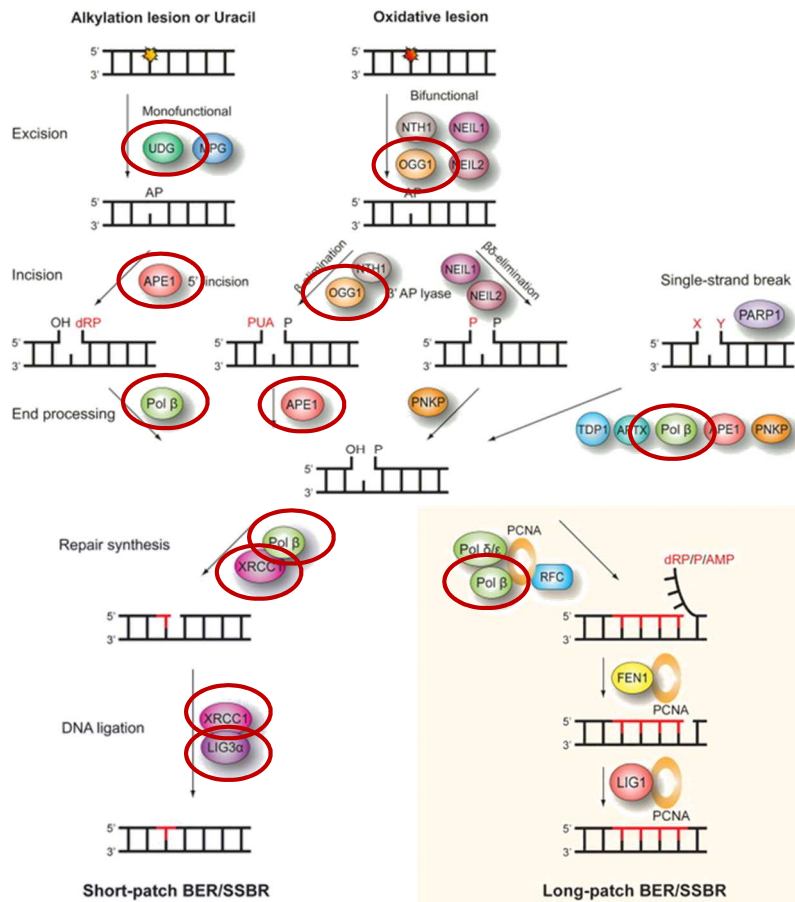


Figure 25 : La voie de réparation par excision de base (BER), la voie de réparation des cassures simple brin (SSBR) et leurs principaux acteurs. Ces voies de réparations peuvent se décomposer en quatre grandes étapes : 1) la reconnaissance de la lésion par une ADN glycosylase ou par PARP1 dans le cas d'une cassure ; 2) le clivage de la liaison phosphodiester grâce à une AP endonucléase (cette étape n'a pas lieu dans le SSBR) ; 3) la repolymérisation à l'aide de différentes protéines selon la voie courte ou longue ; 4) la ligation des nucléotides nouvellement synthétisés.

Les principaux acteurs de la voie testés au regard de leur expression génique sont entourés en rouge.

Issu de Jeppesen et al. (51)

permettant le retrait des adénines appariées à une 8-oxoG durant la réplication, est aussi réduit dans les lignées Gorlin : de $0,39 \pm 0,05$ (GM01552, $p = 0,0012$) à $0,59 \pm 0,14$ (GM02098, $p = 0,0187$). Le rapport d'expression est aussi retrouvé significativement à la baisse chez les Gorlin par rapport à la lignée normale en ce qui concerne le gène *OGGI*, l'ADN glycosylase spécifique des 8-oxoG. Les valeurs varient de $0,42 \pm 0,08$ pour la lignée GM01552 ($p = 0,0012$) à $0,60 \pm 0,17$ pour la lignée GM02098 ($p = 0,0223$). L'expression de l'endonucléase apurinique 1 (*APE1*) est aussi réduite chez les Gorlin avec des valeurs allant de $0,12 \pm 0,03$ (GM03300, $p = 9,9205E-05$) à $0,33 \pm 0,04$ (GM01552, $p = 0,0003$). L'expression de l'ARN messager de la polymérase β n'est pas retrouvée statistiquement différente entre chacune des lignées Gorlin et la lignée normale. Toutefois, l'expression du gène de la *XRRC1*, une autre protéine nécessaire à cette étape de repolymérisation est trouvée sous exprimée au niveau de toutes les lignées Gorlin. Les valeurs vont de $0,36 \pm 0,01$ (GM01552, $p = 0,0880$) à $0,70 \pm 0,03$ (GM02098, $p = 0,00067$). Enfin, l'expression du gène de la ligase III est statistiquement réduite dans la lignée GM01552 ($0,43 \pm 0,03$, $p = 5,766E^{-06}$) ainsi que dans la lignée GM03300 ($0,61 \pm 0,05$, $p = 0,0001$), mais pas dans la lignée GM02098.

2) Etude de la réponse de la voie BER par différentes doses de rayonnements

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la régulation de ces mêmes gènes après un stress aux rayonnements γ de plusieurs doses : 0,1 Gy, considérée en tant que faible dose d'irradiation ; 2 Gy, la dose standard d'irradiation en radiothérapie et 6 Gy, utilisée en tant que forte dose d'irradiation. Un test MTT de cytotoxicité à court terme nous a permis de nous assurer que ce stress, même à très fortes doses, mènait à moins de 20% de mortalité 24 h après irradiation pour la lignée normale, mais aussi pour les trois lignées Gorlin. La réponse de la voie BER après irradiation est étudiée par la mesure du rapport lignée irradiée/lignée normal non irradiée.

a. Effet d'une faible dose de rayonnement ionisant

Nous avons donc poursuivi l'étude de la modulation de l'expression des gènes du BER au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une faible dose de rayonnement γ (0,1 Gy) (Figure 27-A).

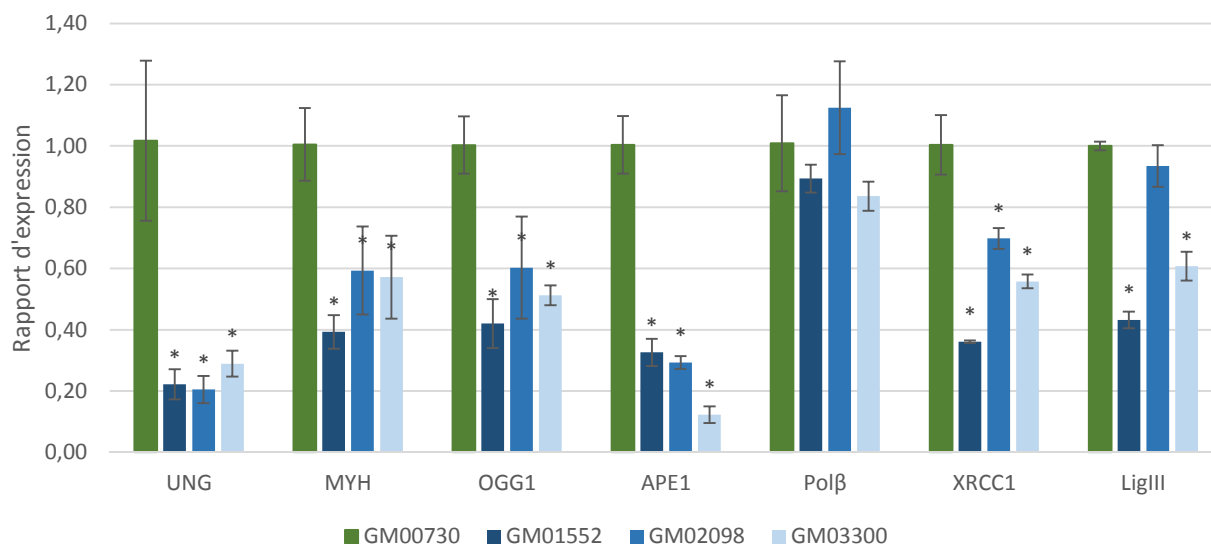


Figure 26 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie BER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

On retrouve ici une diminution de l'expression des ARN messagers des ADN glycosylases et de XRCC1 au niveau des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin. Le gène codant pour la ligase III est statistiquement sous-exprimé dans les lignées GM01552 et GM03300, mais pas dans la lignée GM02098. Enfin, aucune différence d'expression n'est retrouvée concernant le gène de la polymérase β .

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

A nouveau, l'étude de la réponse des ADN glycosylases montrent une sous-expression chez les Gorlin par rapport à la lignée normale ayant subi la même dose d'irradiation. On peut citer en exemple les résultats obtenus pour l'expression du gène *UNG* qui apparaissent significativement réduits dans la lignée GM01552 ($0,23 \pm 0,06$, $p = 0,0013$) ou même dans la lignée GM02098 ($0,29 \pm 0,07$, $p = 0,0024$). A nouveau, le taux d'expression de *MYH* est modulé à la baisse dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale à la même dose d'irradiation (par exemple, $0,53 \pm 0,07$, $p = 0,0002$ pour la lignée GM01552). En revanche, les autres résultats ne montrent pas de réponse globale des lignées Gorlin. En effet, une différence individuelle apparaît concernant l'expression de certains gènes. C'est notamment le cas pour l'expression du gène *APE1* où seule la lignée GM03300 montre une diminution d'expression ($0,09 \pm 0,01$, $p = 0,0258$). C'est aussi le cas de l'expression de l'ARN messager de *XRCC1* qui est uniquement réduite dans les lignées GM01552 ($0,60 \pm 0,03$, $p = 0,0005$) et GM03300 ($0,51 \pm 0,01$, $p = 3,9112E^{-06}$). Enfin, on peut aussi citer la diminution de l'expression du gène de la polymérase β dans la lignée GM01552 ($0,01 \pm 0,09$, $p = 0,0094$). Il est à noter ici que les valeurs obtenues pour l'expression du gène de la ligase III montrent aussi bien une sous-expression (GM01552, $0,58 \pm 0,06$, $p = 0,0059$; GM03300, $0,57 \pm 0,01$, $p = 0,0003$), qu'une sur-expression (GM02098, $0,91 \pm 0,07$, $p = 0,0315$).

b. Effet d'une dose standard de rayonnement ionisant utilisée en radiothérapie

Nous avons ensuite étudié l'impact de la présence d'une mutation dans le gène *PTCH1* sur la réponse de la voie BER après une dose d'irradiation de 2 Gy considérée comme dose standard en radiothérapie (Figure 27-B).

A cette dose d'irradiation, aucune différence significative n'est retrouvée dans l'expression de la glycosylase *UNG* ($p = 0,0938$ pour GM01552 ; $p = 0,1181$ pour GM02098 et $p = 0,1262$ pour GM03300). L'expression de *MYH* est retrouvée diminuée dans les lignées GM01552 ($0,49 \pm 0,03$, $p = 0,0477$) et GM03300 ($0,45 \pm 0,02$, $p = 0,0178$) mais pas dans la lignée GM02098 ($p = 0,2470$). Seule l'expression de la glycosylase bifonctionnelle *OGGI* et de l'endonucléase *APE1* apparaît comme étant significativement sous régulées dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale à la même dose d'irradiation. On citera en exemple les résultats obtenus pour la lignée GM01552 : $0,52 \pm 0,03$, $p = 0,0001$ pour *OGGI* et $0,35 \pm 0,05$, $p = 0,0294$ pour *APE1*.

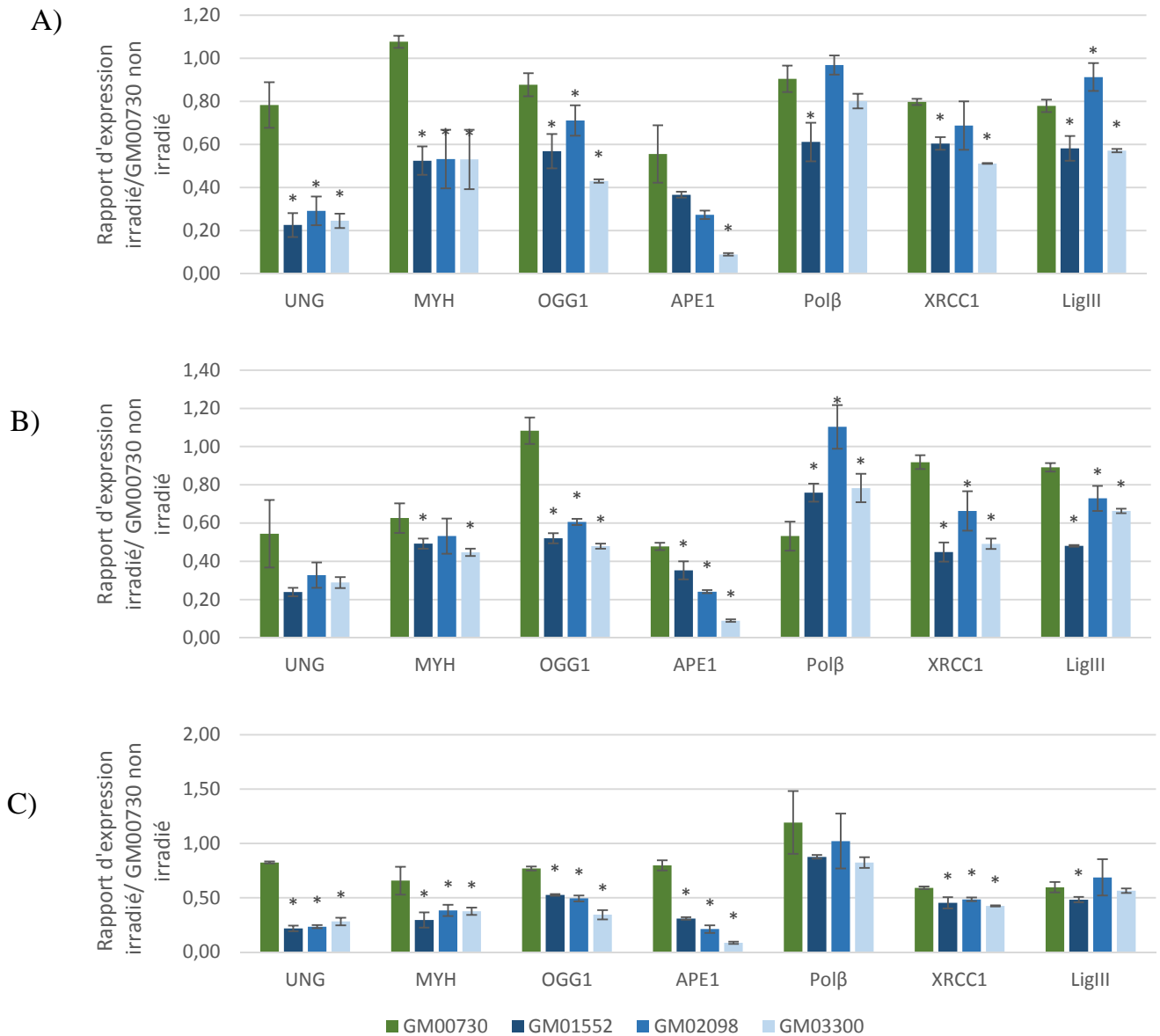


Figure 27 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la voie BER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

A) On retrouve ici à nouveau une diminution de l'expression des ARN messagers des ADN glycosylases au niveau des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin. Les autres résultats montrent une hétérogénéité de la réponse des cellules Gorlin face à une faible dose d'irradiation.

B) On retrouve ici une diminution de l'expression des ARN messagers d'*OGG1* et d'*APE1* au niveau des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin. Les autres résultats concernant les glycosylases montrent une hétérogénéité de la réponse des cellules Gorlin face à une faible dose d'irradiation. Enfin, l'expression des gènes de la polymérase β , de *XRCC1* et de la ligase III est significativement dérégulée par rapport à la lignée normale.

C) On retrouve ici à nouveau une diminution de l'expression des ARN messagers des ADN glycosylases au niveau des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin. Les autres valeurs obtenues démontrent une expression comparable entre les fibroblastes Gorlin et la lignée de fibroblastes normaux pour les gènes *Polβ*, *XRCC1* et *LigIII*.

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

En revanche, cette fois ci, on retrouve une augmentation de l'expression de la polymérase β pour les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale à la même dose d'irradiation ($0,76 \pm 0,05$, $p = 0,0119$ pour GM01552 ; $1,10 \pm 0,11$, $p = 0,0019$ pour GM02098 et $0,78 \pm 0,07$, $p = 0,0148$ pour GM03300). L'expression de l'ARN messager de *XRCCI* est réduite pour les trois lignées Gorlin ($0,45 \pm 0,05$, $p = 0,0002$ pour GM01552 ; $0,66 \pm 0,10$, $p = 0,0152$ pour GM02098 et $0,49 \pm 0,03$, $p = 8,0887E^{-05}$ pour GM03300). Enfin, il en va de même pour les résultats obtenus concernant l'expression du gène de la ligase III ($0,48 \pm 0,01$, $p = 6,2417E^{-06}$ pour GM01552 ; $0,73 \pm 0,07$, $p = 0,0158$ pour GM02098 et $0,66 \pm 0,01$, $p = 9,3317E^{-05}$ pour GM03300).

c. Effet d'une forte dose de rayonnement ionisant

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une forte dose de 6 Gy de rayonnement ionisant sur la réponse des gènes du BER dans chacune des lignées Gorlin 4 h après irradiation (Figure 27-C).

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur les réponses statistiquement significatives entre chaque lignée Gorlin irradiée à 6 Gy et la lignée normale ayant reçue la même dose de RI. Ainsi, l'expression du gène *UNG* est fortement diminuée dans les fibroblastes Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux avec des valeurs allant de $0,22 \pm 0,03$ (GM01552, $p = 2,56E^{-06}$) à $0,28 \pm 0,03$ (GM03300, $p = 1,27E^{-05}$). Le niveau d'ARN messager du gène *MYH* est aussi réduit dans les lignées primaires Gorlin par rapport à la lignée GM00730. Les valeurs varient de $0,30 \pm 0,07$ pour la lignée GM01552 ($p = 0,0127$) à $0,38 \pm 0,03$ pour la lignée GM03300 ($p = 0,0213$). En ce qui concerne l'expression d'*OGG1*, elle varie de $0,34 \pm 0,04$ (GM03300, $p = 0,0008$) à $0,53 \pm 0,01$ (GM01552, $p = 0,0164$) pour les lignées Gorlin. Le niveau d'expression du gène *APE1* diminue drastiquement dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale après une irradiation de 6 Gy (de $0,09 \pm 0,01$ (GM03300, $p = 1,386E^{-05}$) à $0,31 \pm 0,01$ (GM01552, $p = 6,34E^{-05}$)). Comme pour les résultats obtenus au niveau basal, aucune différence significative n'est retrouvée en ce qui concerne l'expression de la polymérase β . En revanche, une forte diminution est observée dans l'expression de *XRCCI* pour toutes les lignées Gorlin. Les valeurs varient de $0,43 \pm 0,01$ pour la lignée GM03300 ($p = 3,1918E^{-05}$) à $0,49 \pm 0,02$ pour la lignée GM02098 ($p = 0,0009$). Enfin, aucune différence n'est retrouvée dans l'expression du gène de la ligase III exceptée pour la lignée GM01552 ($0,48 \pm 0,03$; $p = 0,0208$).

Gène	GM00730			GM01552			GM02098			GM03300		
	0,1Gy	2Gy	6Gy	0,1Gy	2Gy	6Gy	0,1Gy	2Gy	6Gy	0,1Gy	2Gy	6Gy
	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy	/0Gy
<i>MYH</i>												
<i>OGG1</i>												
<i>APE1</i>												
<i>Polβ</i>												
<i>XRCC1</i>												
<i>LigIII</i>												

Tableau 4 : Rapports entre les expressions des principaux gènes du BER : 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement. Ce rapport permet d'analyser la réparation absolue. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). Le test de Student a été réalisé afin de déterminer les différences statistiquement significative. Les cases vertes correspondent à une sous-expression. A l'inverse, les cases rouges correspondent à une sur-expression. Enfin, les cases jaunes correspondent à une absence de modulation de l'expression des gènes. Nous avons choisi de représenter dans ce tableau uniquement les gènes présentant un intérêt de par leurs modulations. Les autres gènes étudiés, non présent ici, ne montrent aucune différence d'expression après irradiation.

On s'aperçoit que la sous-expression des acteurs du BER après irradiation touche principalement la lignée normale. Ainsi, les lignées Gorlin paraissent être moins affecté par une exposition aux rayonnements γ .

3) Etude de la stimulation de la voie BER par différentes doses de rayonnements

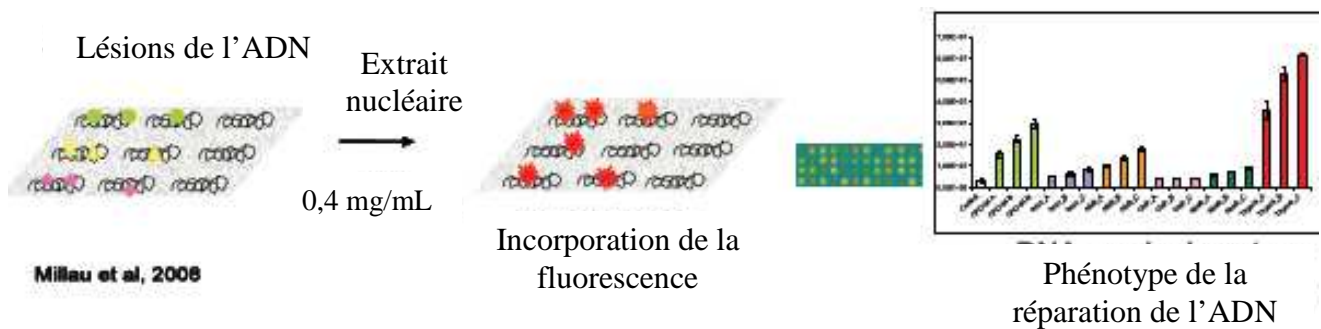
Nous avons ensuite utilisé ces mêmes données afin d'étudier la stimulation de la voie BER dans chacune des lignées en analysant cette fois-ci le rapport lignée irradiée/même lignée non irradiée. A nouveau, nous nous sommes intéressés à trois doses de rayonnements ionisants : 0,1 Gy ; 2 Gy et 6 Gy.

L'impact d'une faible dose d'irradiation de 0,1 Gy a donc été analysé (Tableau 4). Ainsi, *APE1* ($p = 0,0089$), *XRCC1* ($p = 0,0220$) et *LigIII* ($p = 0,0003$) sont réduits après irradiation dans la lignée normale. De la même manière, l'expression de la *Polβ* ($p = 0,0081$), de *XRCC1* ($p = 0,0042$) et de la *LigIII* ($p = 0,0152$) sont réduits après irradiation dans la lignée GM01552. Enfin, l'expression d'*OGGI* est significativement diminuée après une faible dose de RI dans la lignée GM03300 ($p = 0,0127$).

Dans un deuxième temps, l'effet d'une dose standard de 2 Gy a été analysé (Tableau 4). Les gènes *MYH* ($p = 0,0098$), *APE1* ($p = 0,0077$), *Polβ* ($p = 0,0089$) et *LigIII* ($p = 0,0019$) sont réduits après irradiation dans la lignée normale. De la même manière, l'expression de *MYH* ($p = 0,0474$), de la *Polβ* ($p = 0,0238$) et de *XRCC1* ($p = 0,0380$) est réduite après irradiation dans la lignée GM01552. L'expression de *APE1* ($p = 0,0153$) et de la *LigIII* ($p = 0,0198$) est significativement diminuée dans la lignée GM02098 après une irradiation de 2 Gy. Enfin, *XRCC1* ($p = 0,0309$) est sous exprimé après irradiation dans la lignée GM03300.

Enfin, nous avons étudié l'impact d'une forte dose d'irradiation en comparant le résultat obtenu après une dose de 6 Gy par rapport au résultat de la même lignée à un niveau basal (Tableau 4). Ainsi, *MYH* ($p = 0,0263$), *OGGI* ($p = 0,0434$), *APE1* ($p = 0,0280$), *XRCC1* ($p = 0,0019$) et *LigIII* ($p = 0,0001$) sont réduits après une forte dose d'irradiation dans la lignée GM00730 considéré comme saine. En ce qui concerne la lignée GM01552, les résultats permettent de mettre en évidence la diminution de l'expression de *XRCC1* ($p = 0,0363$). De la même manière, l'expression de *APE1* ($p = 0,0267$) et de *XRCC1* ($p = 0,0006$) est réduite après irradiation dans la lignée GM02098. Enfin, la lignée GM03300 présente une diminution de *OGGI* ($p = 0,0054$) ainsi que de *XRCC1* ($p = 0,0006$) après exposition à une dose de 6 Gy de rayonnement γ .

De manière globale, le Tableau 4 dénote une réponse à l'irradiation plus importante au niveau



Millau et al, 2008

Figure 28 : Le principe de la biopuce plasmide. Des plasmides contenant des quantités contrôlées de lésions de l'ADN sont incubés en présence d'extrait nucléaire à 0,4 mg/mL et de nucléotides fluorescents. Plus les protéines de réparation spécifiques à un dommage seront présentes, plus ce dernier pourra être réparé et donc mené à l'incorporation de nucléotides fluorescents. Ce test miniaturisé permet la lecture facile du phénotype réparation de l'ADN.

D'après Millau *et al.* (199).

de la lignée normale GM00730. Ainsi, les lignées Gorlin, possédant déjà une défense très faible au niveau basal, paraissent être moins affectées par une exposition aux rayonnements γ .

B - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCHI* sur l'activité d'excision-resynthèse des petites lésions associées au BER

Afin de déterminer si cette dérégulation de la voie BER au niveau de l'expression des gènes se retrouve aussi au niveau de l'activité enzymatique de réparation de l'ADN, nous avons utilisé la biopuce plasmide développée par la start-up LX-Repair. Ce test miniaturisé permet la quantification du potentiel d'excision-resynthèse notamment des petites lésions associées au BER. Le test implique la quantification de la réparation des plasmides déposés sur la biopuce et portant chacun une classe spécifique de dommage. Parmi les lésions, on retrouve les lésions 8-oxoG qui mettent en évidence la capacité de reconnaissance et d'excision de la glycosylase OGG1 (8-oxoguanine glycosylase) suivi de l'étape de resynthèse. Les lésions AlkB permettent de mettre en exergue la capacité d'excision de l'ADN glycosylase alkyladénine (AAG) et des étapes de resynthèse qui suivent. Enfin, les lésions thymine glycol permettent l'observation de la capacité de reconnaissance et d'excision de l'ADN glycosylase Thymine (TDG) suivi de l'étape de resynthèse.

Le principe de la biopuce plasmide est schématisé en Figure 28.

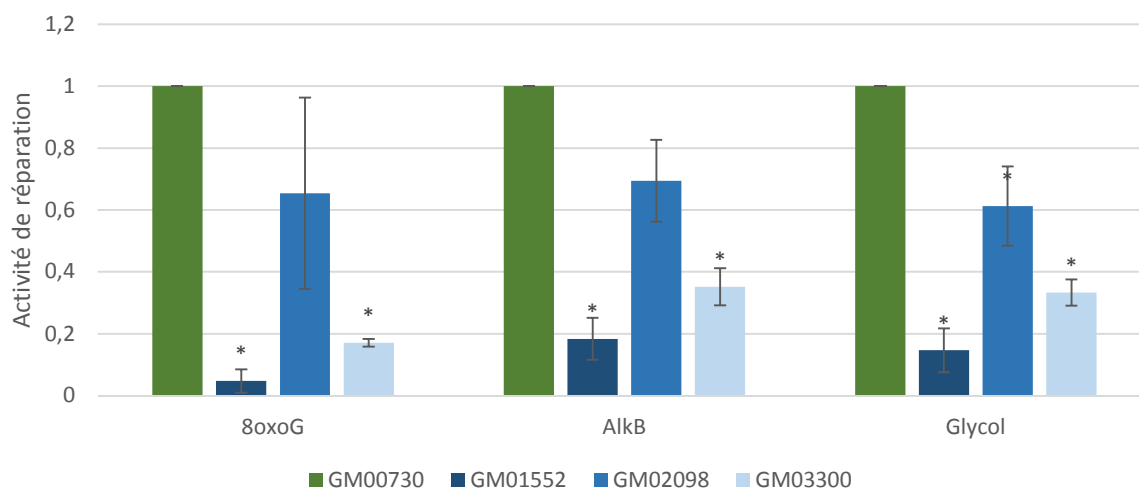


Figure 29 : Mesure de l'activité d'excision-resynthèse à l'aide de la biopuce plasmide dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal. 8oxoG correspond à la mise en évidence de la capacité de reconnaissance et d'excision de la glycosylase OGG1 suivi de l'étape de resynthèse. AlkB correspond à l'étude de la capacité d'excision de l'AAG et des étapes de resynthèse qui suivent. Enfin, Glycol correspond à l'étude de la capacité de reconnaissance et d'excision de la TDG suivi de l'étape de resynthèse. Le rapport a été effectué par rapport à la valeur de la lignée normale sans irradiation. Deux expériences indépendantes ont été réalisées (n = 2).

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) non irradié (Test de Student).

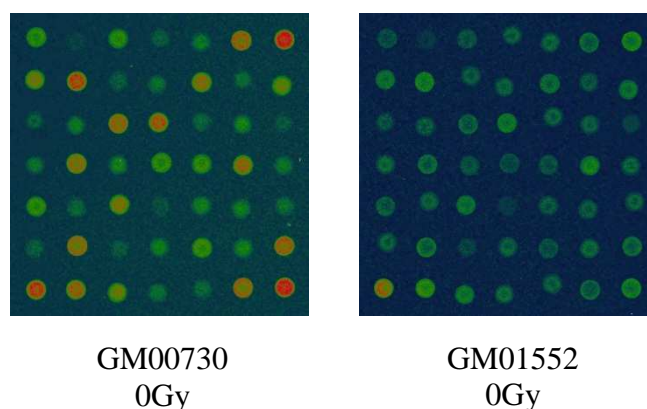


Figure 30 : Exemple de résultats obtenus sur biopuce plasmide. Chaque spot correspond à une lésion particulière. Chaque lésion est présente en trois doses différentes, chacune en duplicat technique. L'incorporation de nucléotides fluorescents permet de quantifier l'activité d'excision-resynthèse de différentes glycosylases spécifiques.

On s'aperçoit que les spots sont plus fluorescents pour la lignée normale que pour la lignée GM01552, indiquant un phénotype réparation diminué dans cette dernière.

1) Activité enzymatique de la voie BER au niveau basal

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'activité d'excision-resynthèse des fibroblastes Gorlin et de la lignée de fibroblastes normaux à un niveau basal (Figures 29 et 30). Il apparaît que cette activité pour les lésions associées à la reconnaissance par la glycosylase OGG1 est statistiquement régulée à la baisse dans la lignée GM01552 ($0,05 \pm 0,03$, $p = 5,033E^{-06}$), ainsi que dans la lignée GM03300 ($0,17 \pm 0,01$, $p = 7,339E^{-05}$) par rapport à la lignée normale. A nouveau, ces deux lignées de fibroblastes Gorlin présentent une réduction de leurs activités d'excision-resynthèse des lésions associées à la reconnaissance par la protéine AAG : $0,18 \pm 0,07$, $p = 0,0016$ pour la lignée GM01552 et $0,35 \pm 0,06$, $p = 0,0358$ pour la lignée GM03300. La valeur obtenue pour la lignée GM02098 ($0,69 \pm 0,13$, $p = 0,0557$) n'est pas statistiquement différente de celle observée pour la lignée GM00730. Enfin, concernant l'activité d'excision-resynthèse des lésions glycols, les trois lignées Gorlin présentent une diminution statistiquement différente (de $0,15 \pm 0,07$, $p = 0,0015$ pour la lignée GM01552 à $0,61 \pm 0,13$, $p = 0,0329$ pour la lignée GM02098) par rapport à la lignée normale.

2) Activité enzymatique de la voie BER après exposition à une forte dose de rayonnement ionisant

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité d'excision-resynthèse de ces lignées cellulaires 24 h après une dose d'irradiation de 6 Gy (Figure 31). Cette dose a été choisie afin de modéliser l'impact d'une forte dose d'irradiation sur les fibroblastes Gorlin.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rapport lignée irradiée/lignée normale irradiée afin d'étudier la réponse de l'activité d'excision-resynthèse. La réparation de la lésion 8-oxoG a été considérablement réduite dans la lignée cellulaire GM01552 ($0,05 \pm 0,05$, $p = 0,0097$) par rapport à la lignée cellulaire GM00730 après une forte dose d'irradiation. Aucune différence statistique n'a été observée pour les deux autres lignées cellulaires Gorlin ($0,50 \pm 0,12$, $p = 0,54$ pour GM02098 et $0,29 \pm 0,17$, $p = 0,20$ pour GM03300). En ce qui concerne l'activité d'excision-resynthèse associées aux lésions AlkB, elle est réduite dans la lignée cellulaire GM01552 ($0,15 \pm 0,09$, $p = 0,0139$) par rapport à la lignée cellulaire GM00730 après une irradiation à 6 Gy. Une nouvelle fois, aucune différence n'a été mise en évidence pour les deux autres lignées cellulaires Gorlin ($0,63 \pm 0,10$, $p = 0,72$

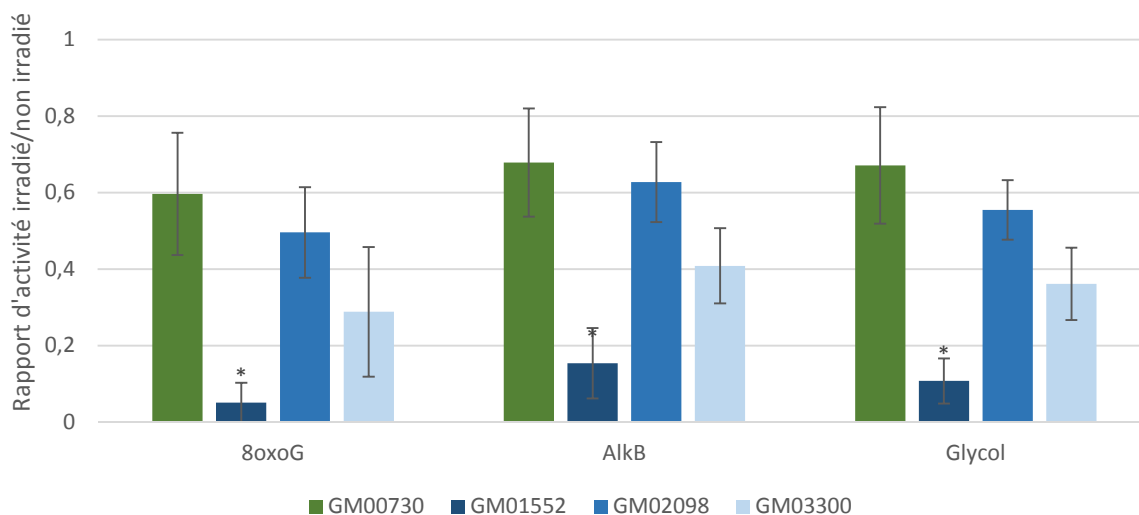


Figure 31 : Mesure de la réponse de l'excision-resynthèse à l'aide de la biopuce plasmide dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 24h après une irradiation de 6 Gy. 8oxoG correspond à la mise en évidence de la capacité de reconnaissance et d'excision de la glycosylase OGG1 suivi de l'étape de resynthèse. AlkB correspond à l'étude de la capacité d'excision de l'AAG et des étapes de resynthèse qui suivent. Enfin, Glycol correspond à l'étude de la capacité de reconnaissance et d'excision de la TDG suivi de l'étape de resynthèse. Le rapport a été effectué par rapport à la valeur de la lignée normale non irradiée. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) irradiée à la même dose (6 Gy) (Test de Student).

pour GM02098 et $0,41 \pm 0,10$, $p = 0,17$ pour GM03300). Il semble que GM02098 ($0,56 \pm 0,08$, $p = 0,46$) et GM03300 ($0,36 \pm 0,09$, $p = 0,15$) possèdent une capacité de reconnaissance et d'excision de la TDG suivi de l'étape de reconnaissance comparable à celle de la lignée normale après une forte dose d'irradiation. En revanche, l'activité de réparation des lésions glycol est statistiquement diminuée dans la lignée GM01552 ($0,11 \pm 0,06$, $p = 0,0085$) par rapport à la lignée cellulaire normale après exposition aux rayonnements γ .

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rapport lignée irradié/même lignée non irradiée afin d'étudier la stimulation. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les valeurs de chaque lignée Gorlin au niveau basal et après une forte dose de rayonnement ionisant. En revanche, la lignée normale présente une forte diminution de l'activité d'excision-resynthèse de ces trois dommages après une irradiation γ .

C - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur la production de l'anion superoxyde

Enfin, tous ces résultats allant dans le sens d'un effondrement de l'activité de la voie BER souvent considérée comme la gardienne principale des dommages induits par le métabolisme cellulaire et notamment par le stress oxydant, nous avons donc décidé de tester le statut de la production de l'anion superoxyde par cytométrie en flux. Cet anion superoxyde est le ROS le plus abondant dans la mitochondrie (200). De plus, il est le premier ROS produit en présence d'oxygène. Enfin, il est aussi le précurseur de toutes les autres espèces réactives de l'oxygène.

Afin d'étudier sa production dans la lignée de fibroblastes normaux et dans les trois lignées de fibroblastes Gorlin de notre étude, nous avons utilisé le MitoSOXTM, un colorant fluorogénique ciblant spécifiquement l'anion superoxyde produit au niveau mitochondrial. L'oxydation induite par la présence du radical $O_2^{\cdot-}$ va entraîner l'activation de la fluorescence de la sonde et donc rendre possible sa quantification à l'aide de la cytométrie en flux. Cette propriété nous a aussi permis de vérifier nos résultats à l'aide de la microscopie de fluorescence.

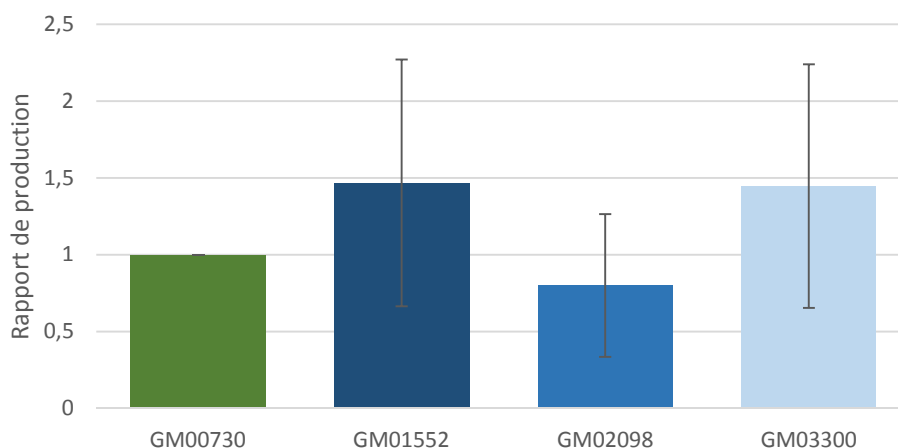


Figure 32 : Mesure de la production de l'anion superoxyde par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) au niveau basal. La production de l'anion superoxyde est étudiée à l'aide du MitoSOX™ à une concentration finale de 5 µM. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux avec les conditions d'excitation/émission suivantes : 510/580 nm. Aucune différence significative n'est retrouvée entre les données obtenues pour les trois lignées Gorlin et la lignée normale. Le rapport a été effectué par rapport à la valeur de la lignée normale non irradiée. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) non irradiée (Test de Student).

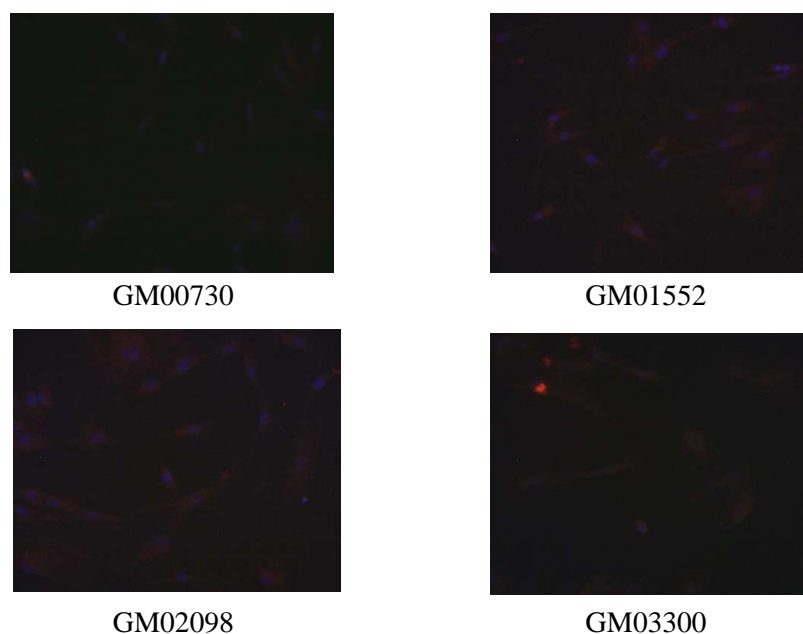


Figure 33 : Vérification par microscopie de fluorescence de la production de l'anion superoxyde dans la lignée normale (GM00730) et les trois lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300). La production de l'anion superoxyde est étudiée à l'aide du MitoSOX™ à une concentration finale de 5 µM. Les cellules sont ensuite montées sur lame de microscopie et observée à un grossissement de x400. Ces résultats confirment ceux obtenus par cytométrie en flux.

1) Statut de la production de l'anion superoxyde au niveau basal

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la production de l'anion superoxyde dans les trois lignées de fibroblastes Gorlin ainsi que dans la lignée de fibroblastes normaux à un niveau basal (Figures 32 et 33). Les tests statistiques de student ($p = 0,3052$ pour GM01552 ; $p = 0,4706$ pour GM02098 et $p = 0,3201$ pour GM3300), mais aussi l'anova à un paramètre ($p = 0,37$) mettent en évidence une absence de différence significative de production entre ces lignées à l'état basal et sans stress exogène.

2) Effet de différentes doses de rayonnements ionisants

Dans un second temps, nous avons analysé la production de cet anion superoxyde, après un stress aux rayonnements γ de plusieurs doses : 0,1 Gy, considéré comme une faible dose d'irradiation ; 2 Gy, la dose standard d'irradiation en radiothérapie et 6 Gy, utilisé en tant que forte dose d'irradiation (Figure 34).

L'anion superoxyde est donc significativement plus produit dans la lignée GM01552 par rapport à la lignée normale après un stress aux rayonnements ionisants et ceux dès la plus faible doses d'irradiations ($5,26 \pm 0,49$, $p = 0,0207$ à 0,1 Gy ; $8,35 \pm 1,68$, $p = 0,0043$ à 2 Gy et $5,10 \pm 0,35$, $p = 0,0349$ à 6 Gy). Les résultats obtenus pour la lignée GM03300 montrent une tendance similaire. Toutefois, la production est significativement augmentée uniquement à partir d'une irradiation de 2 Gy ($2,03 \pm 0,45$, $p = 0,0389$ à 2 Gy et $2,19 \pm 0,72$, $p = 0,0426$ à 6 Gy). En revanche, la lignée GM02098 semble posséder la même habilité à produire l'anion superoxyde que la lignée GM00730 après un stress aux RI ($p = 0,1739$ pour 0,1Gy ; $p = 0,5655$ pour 2 Gy et $p = 0,2873$ pour 6 Gy).

Nous nous sommes ensuite intéressés au rapport lignée irradiée/même lignée non irradiée afin de tester l'effet de l'irradiation sur la production de ce ROS. Seule la lignée GM01552 présente un effet significatif de l'irradiation ($p = 0,0036$ pour 0,1Gy ; $p = 0,0072$ pour 2 Gy et $p = 0,0030$ pour 6 Gy).

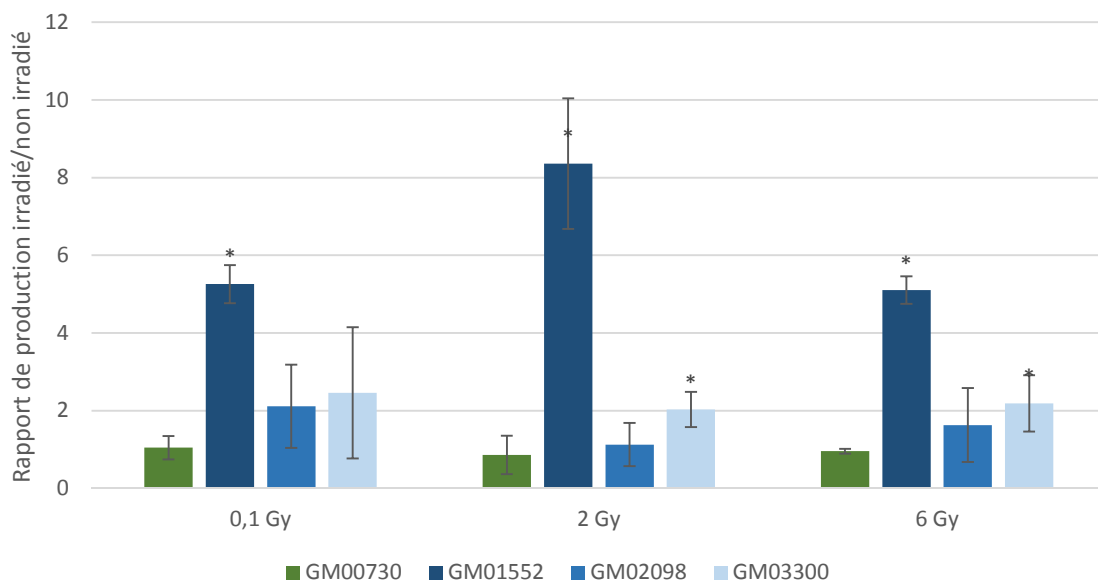


Figure 34 : Mesure de la production de l'anion superoxyde par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 25 minutes après un rayonnement γ de 0,1 Gy, 2 Gy ou 6Gy. Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre la lignée GM00730 et la lignée GM02098 pour la production de ce ROS. En revanche, la lignée GM01552, ainsi que la lignée GM03300 possède un fort accroissement de cette production après un stress aux RI. Le rapport a été effectué par rapport à la valeur de la lignée normale non irradiée. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) irradiée à la même dose (Test de Student).

D - Conclusion

Afin de déterminer si la sensibilité des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin aux rayonnements ionisants et aux UVA est due à un défaut de réparation de l'ADN induit par ces agents génotoxiques, nous avons décidé d'évaluer l'expression des ARN messagers du BER des quatre lignées primaires de notre étude au niveau basal et après différentes doses d'irradiations. Cette étude s'est poursuivie par une étude de l'activité d'excision-resynthèse à l'aide d'une biopuce développée par la start-up LX repair. Enfin, afin de vérifier nos hypothèses, nous avons étudié la production de l'un des ROS les plus produits au niveau cellulaire : l'anion superoxyde.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de la mutation *PTCH1* sur la voie de réparation par excision de bases. Une sous expression globale de la plupart des gènes du BER est retrouvée. On peut noter un effondrement particulièrement marquant au niveau de l'étape de reconnaissance de ces lésions par les glycosylases au niveau basal. En effet, les deux glycosylases impliquées dans la réparation des lésions 8-oxoguanine, OGG1 et MYH, sont toutes les deux significativement réduites. Des études ont démontré qu'une faible expression d'OGG1 pouvait entraîner une accumulation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) menant à l'augmentation des lésions 8-oxoG (201, 202). Il en va de même pour la glycosylase UNG et l'endonucléase APE1, toutes les deux impliquées dans la radiosensibilité (203, 204). Sobol *et al.* (205) démontrent dans leur étude qu'une délétion de la polymérase β peut mener à des défauts de réparation par excision de bases et une hypersensibilité aux agents alkylants. Nos expériences de PCR en temps réel n'ont pas réussi à mettre en évidence la modulation de l'expression de ce gène à un niveau basal. Enfin, l'expression du gène codant pour *XRCC1* est elle aussi significativement diminuée dans les cellules Gorlin. Il est intéressant de noter que ce gène a lui aussi été décrit comme jouant un rôle dans la radiosensibilité des lignées cellulaires (206). En revanche, le lien entre l'expression de la ligase 3 et la radiosensibilité a été très peu étudié. Toutefois, deux lignées Gorlin sur les trois étudiées présentent une diminution de l'expression de cette ligase.

Suite à ces études d'expression génique, nous avons décidé de vérifier si cette dérégulation était aussi retrouvée au niveau de l'activité enzymatique. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé la biopuce plasmide développée par la start-up LX repair. Ce test miniaturisé permet d'étudier notamment l'activité d'excision-resynthèse de la voie de réparation BER. Nos résultats démontrent une diminution globale de cette activité dans les cellules Gorlin par rapport

aux cellules normales sans irradiation. Au niveau basal, les activités AAG et TDG sont réduites. En ce qui concerne la réparation des lésions 8-oxoG, deux des trois lignées primaires Gorlin étudiées présentent une diminution de cette activité d'excision-resynthèse. Ces résultats peuvent être corrélés avec la diminution globale de l'expression des gènes *MYH* et *OGG1*. Enfin, les études à l'aide du MitoSOXTM n'ont pas mis en évidence de différence de production de l'anion superoxyde entre la lignée normale et les trois lignées Gorlin étudiées à un niveau basal. Cette espèce réactive de l'oxygène, précurseurs des autres ROS, mène notamment à l'apparition de lésions 8-oxoG.

Toutes ces données assemblées mènent à la conclusion d'une déficience de la voie BER dans les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin. Les cellules de ces patients sont donc moins équipées pour faire face aux dommages oxydatifs induits par le métabolisme cellulaire de base ou par des agents exogènes générateurs de stress oxydant.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'irradiation sur la stimulation de la voie BER. Globalement, on retrouve le même effondrement de l'expression des gènes de glycosylases *UNG*, *MYH*, *OGG1* et *APE1* après les différentes doses de rayonnements ionisants testées. Toutefois, l'impact de l'irradiation semble être plus fort au niveau des cellules normales que des cellules Gorlin. De plus, il semble que l'expression de la polymérase β ne soit pas impactée par les doses faibles et fortes d'irradiations que ce soit dans les cellules Gorlin ou les cellules normales. Ce gène semble toutefois être sous-régulé après une irradiation de 2 Gy. En ce qui concerne les gènes *XRCC1* et *Lig3*, ils sont globalement tous les deux sous-régulés après une exposition au rayonnement ionisant et ceux dès une dose considérée comme faible.

L'étude des activités d'excision-resynthèse après une forte dose d'irradiation nous apprend que l'effet de l'irradiation impacte fortement la lignée normale, GM00730 mais pas les lignées Gorlin. Il est à noter qu'une nouvelle fois la lignée GM01552 présente une très faible activité d'excision-resynthèse des lésions associées au BER.

Enfin, on retrouve un accroissement de la production de l'anion superoxyde dans deux des trois lignées Gorlin après une exposition aux rayonnements ionisants après une dose standard et une forte dose d'irradiation. Il est intéressant de remarquer que la lignée GM01552 présente une augmentation significative de la production de ce ROS après exposition aux RI.

Il est important de noter ici que l'effet de l'irradiation semble être plus faible que l'impact de la mutation au niveau basal.

Enfin, à la lumière des résultats de cette partie, nous pouvons penser que l'augmentation de la production de l'anion superoxyde conduira à l'augmentation des dommages de l'ADN. Couplé au défaut de la voie de réparation par excision de bases au niveau basal, ces résultats pourraient expliquer la prédisposition aux cancers des patients atteints du syndrome de Gorlin. Cette hypothèse sera approfondie dans la partie Discussions.

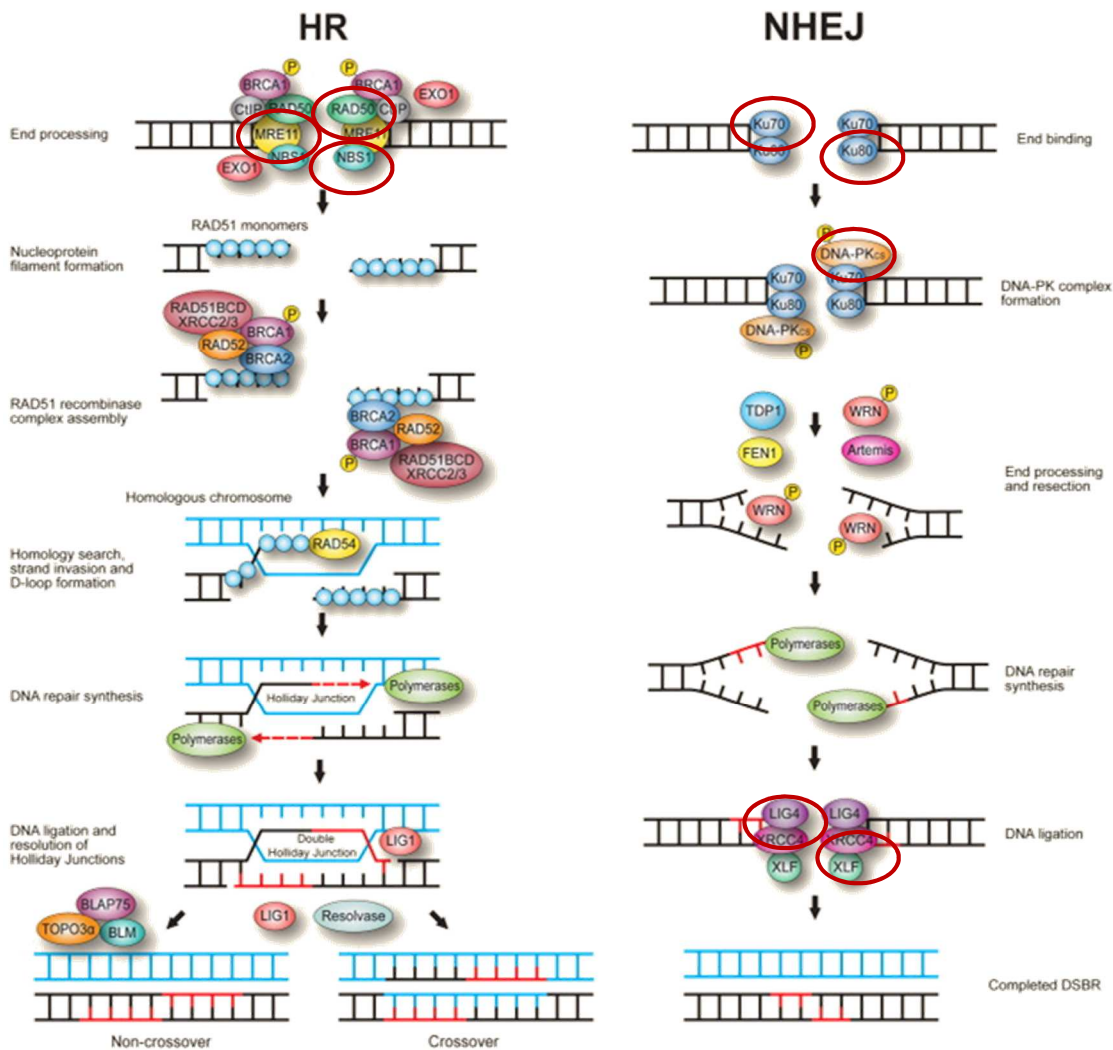


Figure 35 : Les voies de réparation des cassures double brin et leurs principaux acteurs : à gauche, la voie de recombinaison homologue (HR) et à droite, la voie de réparation par suture non homologue (NHEJ). Cette première voie nécessite la reconnaissance de la lésion par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Suite à la création d'une longue extrémité simple brin protégée par RPA, la protéine RAD51 sera recrutée afin de rechercher la séquence homologue au niveau de la chromatide sœur. Il y aura alors formation d'une jonction Holliday autorisant l'action d'une ADN polymérase puis de l'ADN ligase I afin d'obtenir un néobrin d'ADN exempt de lésion. En ce qui concerne la voie NHEJ, les extrémités libres vont être reconnues par le complexe Ku70-Ku80. Ce dernier va permettre le recrutement de la DNA-PKcs qui en s'autophosphorylant va induire un changement conformationnel laissant libre les extrémités pour les protéines nécessaires à la gestion de la cassure. Enfin, la ligase IV et le facteur XRCC4 seront recrutés afin de mener à bien la ligature des deux brins.

Les principaux acteurs de ces voies testés au regard de leur expression génique sont entourés en rouge.

Issu de Jeppesen *et al.* (51).

III - Etat des autres systèmes de réparations (NHEJ, HR, NER)

La majorité des maladies menant à un phénotype radiosensible présente un défaut au niveau des voies de réparation des cassures double brin. C'est notamment le cas du syndrome de Nijmegen qui est dû à la présence de mutations dans le gène NBS1 empêchant ainsi la formation du complexe MRN responsable de la reconnaissance des cassures double brin. Cette hyper-radiosensibilité est aussi retrouvée chez les patients atteints du syndrome de Gorlin ainsi que dans les fibroblastes de cette étude. Dans cette partie, nous nous sommes donc intéressés au statut des systèmes de réparation des cassures double brin : la réparation par suture non homologue et la recombinaison homologue dont les acteurs majeurs sont rappelés en Figure 35.

Afin de compléter cette étude transcriptomique, nous avons dans un deuxième temps, étudié la réparation des dimères de pyrimidine induits par les UVB à l'aide d'un spectromètre de masse en tandem couplé à une HPLC.

A - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur l'expression des gènes des autres voies de réparation (NHEJ, HR, NER)

1) Statut au niveau basal

L'étude de l'expression génique des acteurs principaux des voies de réparation des cassures double brin a été effectuée à l'aide de la technique de RT-qPCR. Cette technique permet la quantification relative de l'expression d'un gène par rapport à un autre.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'expression des gènes du NHEJ, du HR et du NER entre les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin et la lignée de fibroblastes normale, pris en tant que référence, à un niveau basal (Figure 36).

Les gènes codant pour des protéines nécessaires à la reconnaissance des cassures double brin sont globalement sous exprimés chez les Gorlin par rapport à la lignée normale. C'est notamment le cas du gène *Ku70* ($0,81 \pm 0,06$, $p = 0,0476$ pour GM01552 et $0,20 \pm 0,01$, $p = 0,0046$ pour GM03300), ou encore du gène *Ku80* ($0,44 \pm 0,20$, $p = 0,0104$ pour GM01552 ;

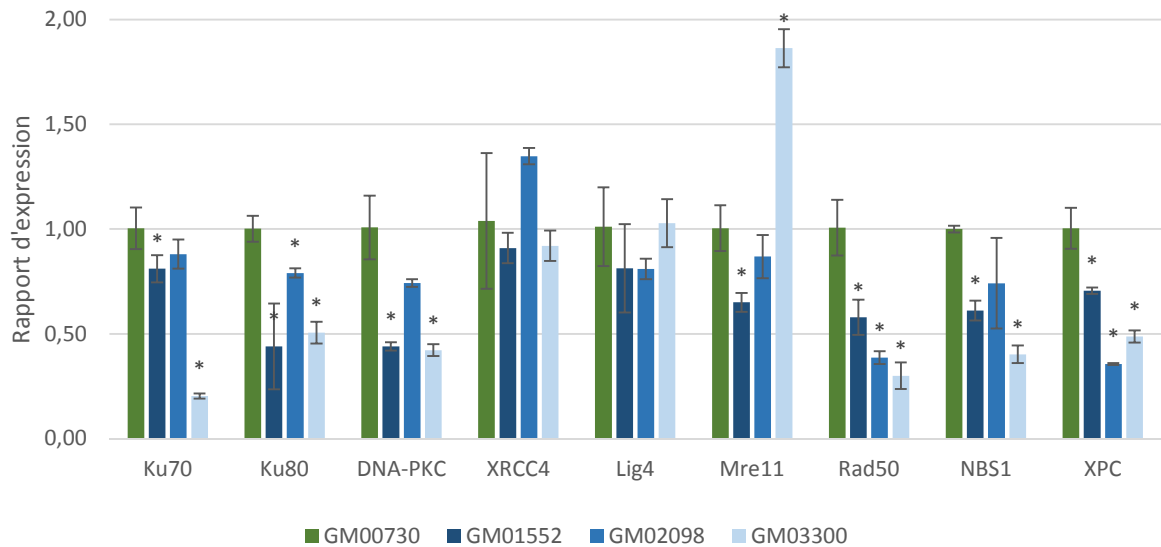


Figure 36 : Mesure de l'expression des principaux acteurs des voies NHEJ, HR et NER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

0,79 ± 0,02, p = 0,0053 pour GM02098 et 0,51 ± 0,05, p = 0,0005 pour GM03300) retrouvé dans la voie de réparation par suture non homologue. L'expression des gènes *MRE11*, *RAD50* et *NBS1* nécessaires à la formation du complexe MRN permettant l'activation de la voie de recombinaison homologue est aussi globalement réduite. Les valeurs varient de 0,58 ± 0,08 pour la lignée GM01552 (p = 0,0094) à 0,30 ± 0,06 pour la lignée GM03300 (p = 0,0012) pour le gène *RAD50*. En ce qui concerne le gène *NBS1*, cette sous régulation est retrouvée au niveau des lignées GM01552 (0,61 ± 0,05, p = 0,0411) et GM03300 (0,40 ± 0,04, p = 0,0001) mais pas GM02098 (p = 0,1078). Enfin, le niveau des ARN messagers de *MRE11*, est réduit pour la lignée GM01552 (0,65 ± 0,05, p = 0,0065) et augmenté dans la lignée GM03300 (1,86 ± 0,09, p = 0,0005). Les rapports d'expression obtenus pour le gène codant pour la *DNA-PKC* varient de 0,44 ± 0,02 pour la lignée GM01552 (p = 0,0030) à 0,74 ± 0,02 pour la lignée GM02098 (p = 0,0398). L'expression des gènes codant pour *XRCC4* et la ligase 4 ne sont pas significativement dérégulées dans les fibroblastes issus de patients Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux. Enfin, l'expression du gène *XPC* jouant un rôle dans la reconnaissance des dommages pour la voie NER est significativement diminuée dans les cellules Gorlin par rapport aux cellules normales (0,71 ± 0,01, p = 0,0066 pour GM01552 ; 0,36 ± 0,01, p = 0,0074 pour GM02098 et 0,49 ± 0,03, p = 0,0009 pour GM03300).

2) Effet de différentes doses de rayonnements ionisants

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la régulation de ces mêmes gènes après un stress aux rayonnements γ de plusieurs doses : 0,1 Gy, considéré en tant que faible dose d'irradiation ; 2 Gy, la dose standard d'irradiation et 6 Gy, utilisé en tant que forte dose d'irradiation. La réponse des voies de réparation après irradiation est étudiée par la mesure du rapport lignée irradiée/lignée normale non irradiée.

a. Effet d'une faible dose de rayonnement ionisant

Nous avons donc poursuivi l'étude de la modulation de l'expression des gènes du BER au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une faible dose de rayonnement γ (0,1 Gy). (Figure 37-A).

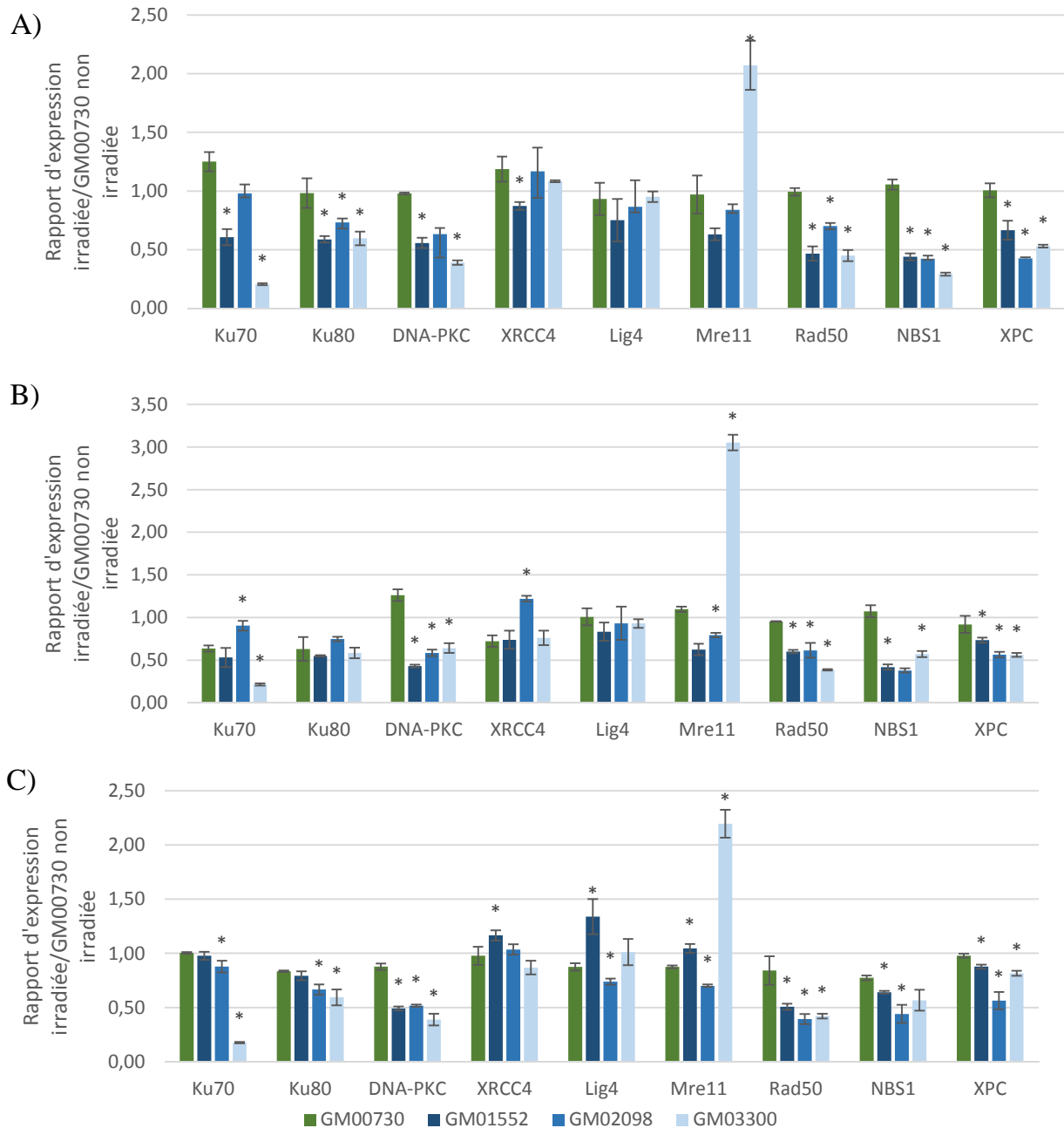


Figure 37 : Mesure de l'expression des principaux acteurs des voies NHEJ, HR et NER dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

* : valeur significativement différente (p < 0,05) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

A nouveau, l'expression des gènes codant pour les protéines *Ku80*, *RAD50* et *NBS1* est réduite dans les trois lignées Gorlin après irradiation à 0,1 Gy par rapport à la lignée normale irradiée à la même dose démontrant une baisse de la stimulation de ces gènes après irradiation. Citons par exemple les valeurs obtenues pour le gène *Ku80* : $0,59 \pm 0,03$, $p = 0,0063$ pour GM01552 ; $0,73 \pm 0,03$, $p = 0,0300$ pour GM02098 et $0,60 \pm 0,06$, $p = 0,0087$ pour GM03300. Le rapport d'expression des gènes *Ku70*, *DNA-PKC*, *XRCC4* et *MRE11* ne présente pas de profil identique entre les trois lignées Gorlin : certaines démontrent une diminution significative de l'expression tandis que d'autres présentent une expression similaire à la lignée normale au sein du même gène. Toutefois, l'expression du gène *MRE11* est sur-exprimée dans la lignée GM03300 ($2,07 \pm 0,21$, $p = 0,0020$). La production de l'ARN messenger de *Lig4* n'est pas significativement dérégulée entre les fibroblastes Gorlin et la lignée normale. Enfin, l'expression du gène *XPC* est réduite dans les cellules Gorlin par rapport aux cellules normales avec des valeurs variant de $0,67 \pm 0,08$, $p = 0,0042$ pour GM01552 à $0,43 \pm 0,01$, $p = 0,0001$ pour GM02098.

b. Effet d'une dose standard de rayonnement ionisant

Nous avons donc poursuivi l'étude de la modulation de l'expression des gènes de réparation des cassures double brin et du NER au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une dose standard de 2 Gy de rayonnement γ (Figure 37-B).

Après une irradiation de 2 Gy, seuls les gènes *DNA-PKC*, *RAD50* et *XPC* présentent une homogénéité des résultats pour les trois lignées Gorlin : ces trois gènes sont significativement sous-exprimés. Pour le gène *DNA-PKC*, les valeurs varient de $0,43 \pm 0,02$ pour la lignée GM01552 ($p = 0,0001$) à $0,64 \pm 0,06$ pour la lignée GM3300 ($p = 0,0003$). En ce qui concerne, le gène *RAD50*, les valeurs varient de $0,60 \pm 0,02$ pour la lignée GM01552 ($p = 0,0001$) à $0,39 \pm 0,01$ pour la lignée GM3300 ($p = 0,0052$). L'expression du gène *XPC* varie de $0,74 \pm 0,03$, $p = 0,0388$ pour GM01552 à $0,56 \pm 0,02$, $p = 0,0039$ pour GM03300. Le rapport d'expression de *NBS1* est aussi retrouvé réduite dans les Gorlin. Les autres gènes *Ku70*, *XRCC4*, *MRE11* présentent une hétérogénéité des réponses entre chaque lignée Gorlin après une dose standard de RI. Toutefois, l'expression du gène *MRE11* est à nouveau sur-régulée dans la lignée GM03300 ($3,05 \pm 0,09$, $p = 0,0001$). C'est aussi le cas du gène *XRCC4* pour la lignée GM02098 ($1,22 \pm 0,03$, $p = 0,0003$). Enfin, aucune différence d'expression entre les lignées Gorlin et la lignée normale n'a pu être mise en évidence pour les gènes *Ku80* et *Lig4*.

c. Effet d'une forte dose de rayonnement ionisant

Finalement, nous avons étudié la modulation de l'expression des gènes du NHEJ, du HR et du NER au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une forte dose de rayonnement γ (6 Gy) (Figure 37-C).

L'impact de la mutation *PTCH1* sur l'expression des gènes des voies du NHEJ, du HR et du NER n'est pas homogène au niveau des lignées Gorlin que nous étudions après une irradiation de 6 Gy. En effet, seul l'expression des gènes *DNA-PKC*, *RAD50* et *XPC* présentent une diminution pour les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale après irradiation. Pour le gène *DNA-PKC*, les valeurs varient de $0,52 \pm 0,01$ pour la lignée GM02098 ($p = 0,0001$) à $0,39 \pm 0,05$ pour la lignée GM3300 ($p = 0,0002$). En ce qui concerne le gène *RAD50*, les valeurs varient de $0,39 \pm 0,09$ pour la lignée GM02098 ($p = 0,0050$) à $0,51 \pm 0,02$ pour la lignée GM01552 ($p = 0,0123$). L'expression du gène *XPC* jouant un rôle dans la reconnaissance des dommages pour la voie NER est significativement diminuée dans les cellules Gorlin par rapport aux cellules normales ($0,88 \pm 0,02$, $p = 0,0026$ pour GM01552 ; $0,56 \pm 0,08$, $p = 0,0010$ pour GM02098 et $0,82 \pm 0,02$, $p = 0,0007$ pour GM03300). A nouveau, l'expression du gène *MRE11* est sur-réglée dans la lignée GM03300 ($2,20 \pm 0,13$, $p = 0,0001$). C'est aussi le cas du gène *XRCC4* ($1,17 \pm 0,16$, $p = 0,0280$) et du gène *Lig4* ($1,34 \pm 0,04$, $p = 0,0082$) pour la lignée GM01552.

3) Etude de la stimulation des autres voies de réparation après différentes doses de rayonnements

Nous avons ensuite utilisé ces mêmes données afin d'étudier la stimulation dans chacune des lignées étudiées en analysant cette fois ci le rapport lignée irradiée/même lignée non irradiée. A nouveau, nous nous sommes intéressés à trois doses de rayonnements ionisants : 0,1 Gy ; 2 Gy et 6 Gy.

En ce qui concerne la stimulation entraînée par une faible dose d'irradiation sur l'expression des gènes des voies de réparation des cassures double brin, il apparaît comme étant faible (Tableau 5). Ainsi, seul *Ku70* ($p = 0,0294$) est réduit après irradiation dans la lignée normale. De la même manière, l'expression de *Ku70* ($p = 0,0206$) et de *DNA-PKC* ($p = 0,0129$) est réduite après irradiation dans la lignée GM01552. Enfin, l'expression de *XPC* ($p = 0,0016$) est significativement augmentée dans la lignée GM02098 après une irradiation de 0,1 Gy par rapport à la même lignée sans irradiation.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la stimulation après une dose d'irradiation de 2 Gy (Tableau 5). L'expression de *Ku70* ($p = 0,0038$) et de *Ku80* ($p = 0,0133$) est réduite après irradiation dans la lignée normale. De la même manière, l'expression de *Ku70* ($p = 0,0206$) et *Rad50* ($p = 0,0370$) est réduite après irradiation dans la lignée GM01552. En ce qui concerne la lignée GM02098, l'irradiation impacte l'expression des gènes *DNA-PKC* ($p = 0,0028$), *XRCC4* ($p = 0,0131$) et *XPC* ($p = 0,0070$). Enfin, l'expression de *DNA-PKC* ($p = 0,0036$), de *MRE11* ($p = 0,0001$) et de *XPC* ($p = 0,0254$) est significativement diminuée dans la lignée GM03300 après une irradiation de 2 Gy.

Enfin, l'effet d'une forte dose de rayonnement ionisant a été étudié (Tableau 5). L'expression des gènes *Ku80* ($p = 0,0427$) et *NBS1* ($p = 0,0001$) est impactée par une forte dose d'irradiation dans la lignée normale GM00730. Pour la lignée GM01552, l'expression de *Ku70* ($p = 0,0177$), *DNA-PKC* ($p = 0,0277$), *XRCC4* ($p = 0,0069$), *Lig4* ($p = 0,0266$), *MRE11* ($p = 0,0045$) et de *XPC* ($p = 0,0002$) est significativement diminuée après une irradiation de 6 Gy. De la même manière, l'expression de *Ku80* ($p = 0,0138$), *DNA-PKC* ($p = 0,0001$), *XRCC4* ($p = 0,0009$) et de *MRE11* ($p = 0,0482$) est réduite après irradiation dans la lignée GM02098. A nouveau, *XPC* ($p = 0,0455$) présente une sur-expression après irradiation dans la lignée GM02098. Pour finir, une forte dose d'irradiation impacte l'expression des gènes *Ku70* ($p = 0,0327$), *MRE11* ($p = 0,0218$), *RAD50* ($p = 0,0351$) et *XPC* ($p = 9,9881E-05$) dans la lignée GM03300.

B - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur l'efficacité de réparation du NER

Le rôle de la mutation *PTCH1* sur la cinétique de réparation des dimères de pyrimidines à l'issue d'une irradiation de $0,025 \text{ J/cm}^2$ d'UVB a été évalué dans les cellules de notre étude (Figure 38). Cette analyse a été faite à l'aide de la technique de séparation HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem permettant l'analyse et la quantification notamment des CPD.

Le taux de CPD résiduel 24 h après l'irradiation UVB n'est pas significativement différent entre la lignée normale et les lignées Gorlin. En effet, ce taux est de 96% dans la lignée normale et de 92% dans les lignées Gorlin. A nouveau, 36 h après irradiation, aucune différence n'est retrouvée entre la lignée normale et les trois lignées Gorlin. Le pourcentage de CPD résiduel étant de 66% dans la lignée normale et de 60% dans les lignées Gorlin.

Gène	GM00730			GM01552			GM02098			GM03300		
	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy
<i>Ku70</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>Ku80</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>DNA-PKC</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>XRCC4</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>Lig4</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>MRE11</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>Rad50</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert
<i>XPC</i>	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Vert	Rouge	Rouge	Rouge	Vert	Vert	Vert

Tableau 5 : Rapports entre les expressions de certains gènes du NHEJ, du HR et du NER à 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement. Ce rapport permet d'analyser la réparation absolue. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). Le test de Student a été réalisé afin de déterminer les différences statistiquement significative. Les cases vertes correspondent à une sous-expression. A l'inverse, les cases rouges correspondent à une sur-expression. Enfin, les cases jaunes correspondent à une absence de modulation de l'expression des gènes. Nous avons choisi de représenter dans ce tableau uniquement les gènes présentant un intérêt de par leurs modulations. Les autres gènes étudiés, non présent ici, ne montrent aucune différence d'expression après irradiation.

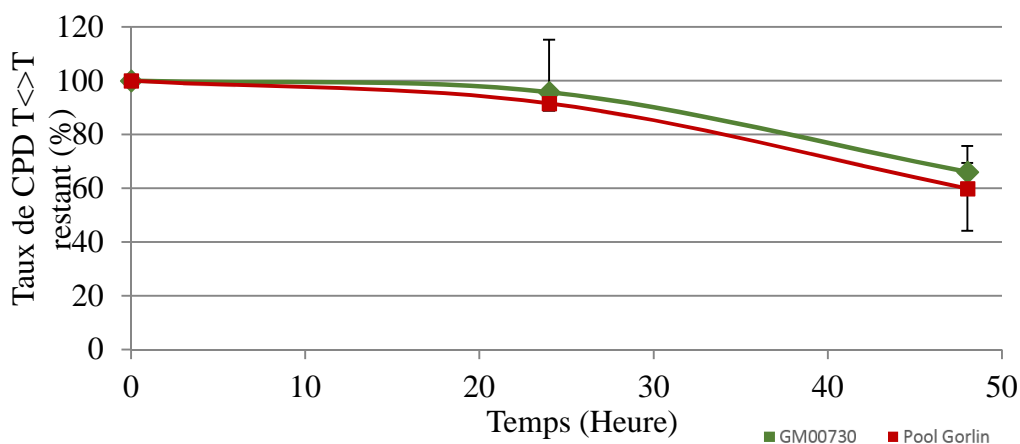


Figure 38 : Etude de la cinétique de réparation par la voie NER par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les cellules sont cultivées jusqu'à subconfluence puis exposées à 0,025 J/cm² d'UVB. Elles sont ensuite récoltées à différents temps post-irradiation : 0 h, 24 h et 48 h. Puis, l'ADN est extrait et hydrolysé afin de détecter les nucléosides par HPLC-MS/MS et quantifier le taux de lésions (CPD) par rapport aux nucléosides normaux. Pour cette étude, les 3 lignées Gorlin ont été poolées. Des triplicats biologiques ont été réalisés (n = 3). Le test de Student a été réalisé afin de déterminer les statistiques.

C - Conclusion

La deuxième partie ayant révélé un défaut dans le système de réparation des bases endommagées résultant de petites altérations chimiques comme les bases oxydées ou les cassures simple brin, nous avons décidé de nous intéresser ici aux autres systèmes de réparation de la cellule : les systèmes de réparation des cassures double brin (NHEJ et HR) et le système de réparation par excision de nucléotides (NER). Pour ce faire, nous avons évalué l'expression des ARN messagers de certains gènes clés des quatre lignées primaires de notre étude au niveau basal et après différentes doses d'irradiations. Une deuxième technique d'analyse a été utilisée afin d'étudier l'efficacité de réparation du NER des cellules de notre étude à l'issue d'une irradiation aux rayonnements ultraviolets.

Dans un premier temps, il est intéressant de noter que, contrairement aux résultats obtenus au niveau de la transcription des gènes du BER, l'expression des ARN messagers étudiée ici ne présente globalement pas d'homogénéité entre les trois lignées de fibroblastes Gorlin que ce soit au niveau basal ou bien après les différentes doses de rayonnements ionisants. Toutefois, trois gènes sont statistiquement régulés à la baisse dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale : *Ku80*, *RAD50* et *XPC*. *Ku80*, impliquée dans le complexe hétérodimérique Ku contenant aussi la sous-unité *Ku70*, se lie aux extrémités des cassures double brin et permet d'initier la voie de réparation par suture non homologue. La sous-régulation de l'expression de *Ku80* a été liée à une augmentation de la sensibilité cellulaire aux rayonnements ionisants (207). La plupart des études portant sur le lien entre le système de réparation par recombinaison homologue et l'hyper-radiosensibilité s'intéresse au complexe MRN et non à la protéine *RAD50* seule. Toutefois, ces études ont mis en évidence une augmentation de la radiosensibilité lorsque l'on inhibe le complexe MRN (208).

En revanche, le lien entre l'expression de *XPC*, acteur du NER et la radiosensibilité a été très peu étudié. En effet, les études portant sur *XPC* étudient le plus souvent le lien entre un défaut de cette protéine et une potentielle hyper-photosensibilité.

De la même manière, après différentes doses de rayonnements ionisants, une diminution globale de l'expression des gènes étudiés est retrouvée avec à nouveau une réponse individuelle de chaque lignée Gorlin.

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier si la différence d'expression obtenue au niveau transcriptomique se retrouvait aussi au niveau de la capacité de réparation effective du système de réparation par excision de nucléotides. L'expérience conduite pour répondre à cette

question a permis de mettre en évidence une absence de différence entre les trois lignées Gorlin de notre étude et la lignée considérée comme saine. La diminution significative de l'expression du gène *XPC* dans les fibroblastes Gorlin, pourtant responsable de l'étape de reconnaissance de la lésion du GG-NER, n'entraîne donc pas de différence dans la réponse de ces cellules après un rayonnement ultraviolet B. Vallin *et al.* (170) avaient eux aussi dans leur étude de 2009 montré que la voie de réparation par excision de nucléotides n'était pas affectée dans des fibroblastes issus de patients Gorlin. Enfin, il est à noter que nos collaborateurs (Equipe M. Martin et Equipe J. LAMARTINE) ont démontré l'absence de différence de réparation des cassures double brin pur à l'aide de la mesure de la cinétique de la disparition des foci γ H2AX.

IV - Etat des autres paramètres de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR)

La quatrième partie de l'exploration des mécanismes cellulaires de la radiosensibilité des fibroblastes Gorlin a mené à l'étude de la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN et aux autres réponses de cette DDR. Nous avons porté notre attention sur la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier par transcriptomique quelques acteurs essentiels à la signalisation des lésions de l'ADN dans la lignée normale et les lignées de fibroblastes Gorlin à un niveau basal et après l'application de différentes doses de rayonnements ionisants. Un autre paramètre de la DDR est la modulation de la transcription de certains gènes. Les résultats que nous avons obtenus au niveau de l'expression des gènes de la réparation de l'ADN ainsi que ceux de la signalisation de la DDR après un stress aux RI attestent de cette modulation.

Enfin, lorsque la cellule n'est pas capable de gérer correctement la réparation de son ADN, cette dernière va être conduite vers la mort cellulaire programmée. C'est donc la deuxième étape de cette partie où nous avons étudié l'apoptose au niveau des fibroblastes Gorlin, ainsi que des fibroblastes normaux à un niveau basal et après induction de dommages à l'ADN à l'aide de rayonnements γ .

A - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur l'expression des gènes de signalisation du DDR

1) Statut au niveau basal

L'étude de l'expression génique des acteurs principaux des gènes de signalisation du DDR a été effectuée à l'aide de la technique de RT-qPCR. Cette technique permet la quantification relative de l'expression d'un gène par rapport à un autre.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la modulation de l'expression des gènes de la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN entre les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin et la lignée de fibroblastes normale, pris en tant que référence, à un niveau basal (Figure 39).

L'expression des trois gènes étudiés *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)*, *ATM* and *Rad3 Related (ATR)* et *p53* est retrouvée significativement réduite dans les trois lignées Gorlin

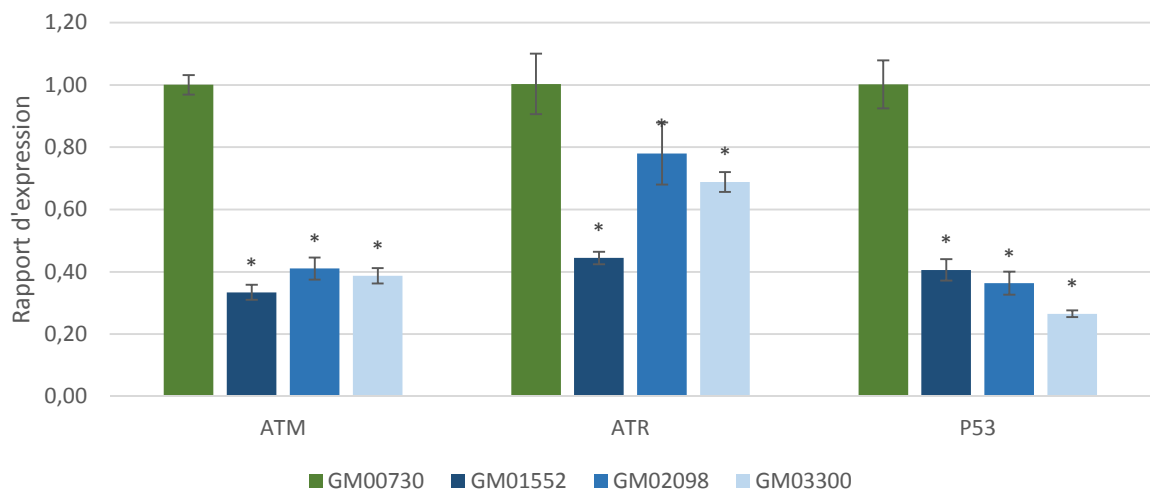


Figure 39 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la signalisation de la DDR dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) à un niveau basal. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

Une diminution de l'expression des ARN messagers est retrouvée pour les quatre lignées cellulaires étudiées.

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à l'aide du test de Student.

étudiées par rapport à la lignée normale. Ainsi, le gène codant pour *ATM* connu pour être le transducteur des cassures double brin varie de $0,33 \pm 0,02$ (GM01552, $p = 0,0001$) à $0,41 \pm 0,04$ (GM02098, $p = 0,0001$). En ce qui concerne le gène *ATR*, activé suite à la présence de cassures simple brin ou d'un blocage de fourche de réplication, il varie lui de $0,44 \pm 0,02$ (GM01552, $p = 0,0006$) à $0,78 \pm 0,10$ (GM02098, $p = 0,0499$). Finalement, l'expression du gène *p53* considéré comme la protéine gardienne du génome varie de $0,41 \pm 0,03$ (GM01552, $p = 0,0003$) à $0,27 \pm 0,01$ (GM03300, $p = 0,0001$).

2) Effet de la réponse de la signalisation par différentes doses de rayonnements ionisants

Nous nous sommes par la suite intéressés à la régulation de ces mêmes gènes après un stress aux rayonnements γ de trois doses différentes : une faible dose d'irradiation : 0,1 Gy ; une dose standard : 2 Gy et une forte dose d'irradiation : 6 Gy. La réponse après irradiation est étudiée par la mesure du rapport lignée irradiée/lignée normale non irradiée.

a. Effet d'une faible dose de rayonnement ionisant

Dans un premier temps, nous avons étudié la modulation de l'expression des gènes de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une faible dose de rayonnement γ (0,1 Gy) (Figure 40-A).

A nouveau, tous les gènes étudiés apparaissent sous-exprimés chez les Gorlin par rapport à la lignée normale ayant subi la même dose d'irradiation. On peut citer en exemple les résultats obtenus pour l'expression du gène *ATM* qui apparaissent significativement réduit dans la lignée GM01552 ($0,38 \pm 0,02$, $p = 0,0001$) ou même dans la lignée GM02098 ($0,32 \pm 0,01$, $p = 0,0001$). Le rapport d'expression du gène *ATR* varie quant à lui de $0,54 \pm 0,02$ (GM01552, $p = 0,0002$) à $0,68 \pm 0,04$ (GM03300, $p = 0,0009$). Enfin, l'expression de *p53* est aussi réduite de $0,45 \pm 0,01$ (GM01552, $p = 0,0001$) à $0,25 \pm 0,01$ (GM03300, $p = 0,0001$) par rapport à la lignée normale à la même dose d'irradiation.

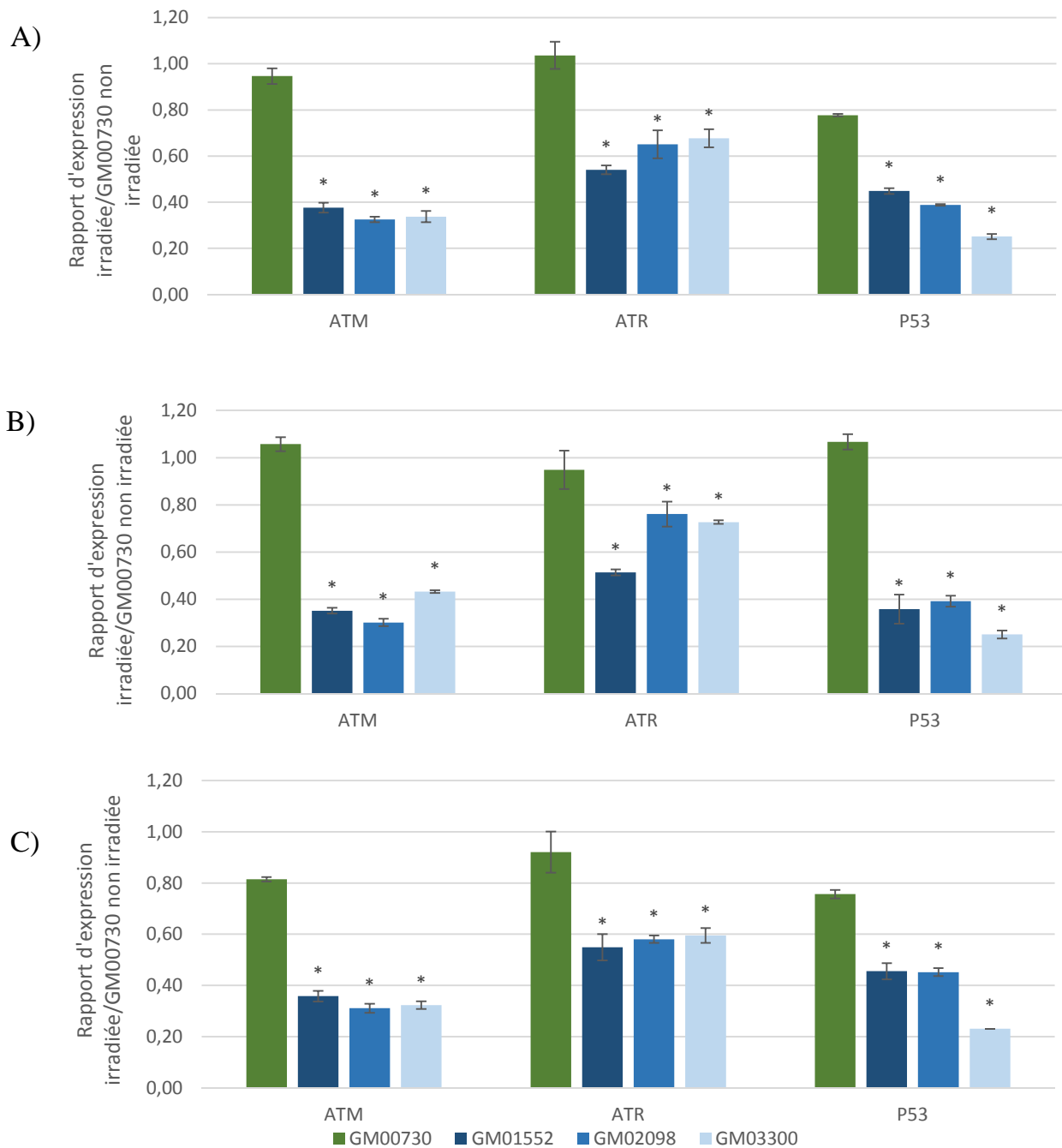


Figure 40 : Mesure de l'expression des principaux acteurs de la signalisation de la DDR dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) 4 h après une irradiation de A) 0,1 Gy ; B) 2 Gy et C) 6 Gy. Après extraction des ARN totaux de chacune des lignées primaires de cette étude, ces derniers ont été retro-transcrit en ADN complémentaire. Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifiques par RT-qPCR. Le calibrateur utilisé ici est la lignée GM00730 non irradiée. Le gène de référence est celui de la *GAPDH*. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3).

Une diminution de l'expression des ARN messagers est retrouvée pour les quatre lignées cellulaires étudiées à toutes les doses de rayonnements γ .

* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) à la même dose d'irradiation à l'aide du test de Student.

b. Effet d'une dose standard de rayonnement ionisant

Nous nous sommes ensuite intéressés à cette modulation de l'expression des gènes de signalisation de la DDR au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une irradiation à une dose de 2 Gy considérée comme standard en radiobiologie (Figure 40-B).

Encore une fois, *ATM*, *ATR* et *p53* sont significativement réduits dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale à la même dose d'irradiation. Ainsi, l'expression du gène codant pour *ATM* varie de $0,30 \pm 0,02$ (GM02098, $p = 0,0001$) à $0,43 \pm 0,01$ (GM03300, $p = 0,0001$). Le gène *ATR* apparaît significativement réduit dans la lignée GM01552 ($0,51 \pm 0,01$, $p = 0,0101$) ou même dans la lignée GM02098 ($0,76 \pm 0,05$, $p = 0,0286$). Enfin, le rapport d'expression du gène *p53* varie de $0,25 \pm 0,02$ (GM03300, $p = 0,0001$) à $0,39 \pm 0,02$ (GM02098, $p = 0,0001$).

c. Effet d'une forte dose de rayonnement ionisant

Finalement, nous avons analysé la modulation de l'expression des gènes de signalisation de la DDR au sein de chacune des lignées Gorlin 4 h après une irradiation à une dose de 6 Gy (Figure 40-C).

La même sous-expression est à nouveau retrouvée au niveau de tous les gènes étudiés pour toutes les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale après avoir subi la même dose d'irradiation. Le rapport d'expression du gène *ATM* varie de $0,31 \pm 0,02$ (GM02098, $p = 0,0001$) à $0,36 \pm 0,02$ (GM01552, $p = 0,0001$). De même, l'expression d'*ATR* varie de $0,55 \pm 0,05$ (GM01552, $p = 0,0082$) à $0,59 \pm 0,03$ (GM03300, $p = 0,0107$). En ce qui concerne l'expression de *p53*, elle varie de $0,46 \pm 0,03$ (GM01552, $p = 0,0001$) à $0,23 \pm 0,01$ (GM03300, $p = 0,0003$).

3) Etude de l'effet de l'irradiation sur l'expression des gènes de signalisation du DDR

Dans un second temps, nous avons utilisé ces mêmes données en analysant cette fois ci le rapport lignée irradiée/même lignée non irradiée. A nouveau, nous nous sommes intéressés à trois doses de rayonnements ionisants : 0,1 Gy ; 2 Gy et 6 Gy (Tableau 6).

En ce qui concerne le rapport irradiée/non irradiée pour la dose de 0,1 Gy, seule l'expression du gène *p53* est réduite dans la lignée GM00730 ($p = 0,0073$). En ce qui concerne la lignée

Gène	GM00730			GM01552			GM02098			GM03300		
	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy	0,1Gy /0Gy	2Gy /0Gy	6Gy /0Gy
ATM												
ATR												
p53												

Tableau 6 : Rapports entre les expressions des gènes de signalisation de la DDR à 0,1Gy/0Gy ; 2Gy/0Gy et 6Gy/0Gy pour chacune des lignées étudiées respectivement. Ce rapport permet d'analyser l'effet de l'irradiation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). Le test de Student a été réalisé afin de déterminer les différences statistiquement significative. Les cases vertes correspondent à une sous-expression. A l'inverse, les cases rouges correspondent à une sur-expression. Enfin, les cases jaunes correspondent à une absence de modulation de l'expression des gènes. Nous avons choisi de représenter dans ce tableau uniquement les gènes présentant un intérêt de par leurs modulations. Les autres gènes étudiés, non présent ici, ne montrent aucune différence d'expression après irradiation.

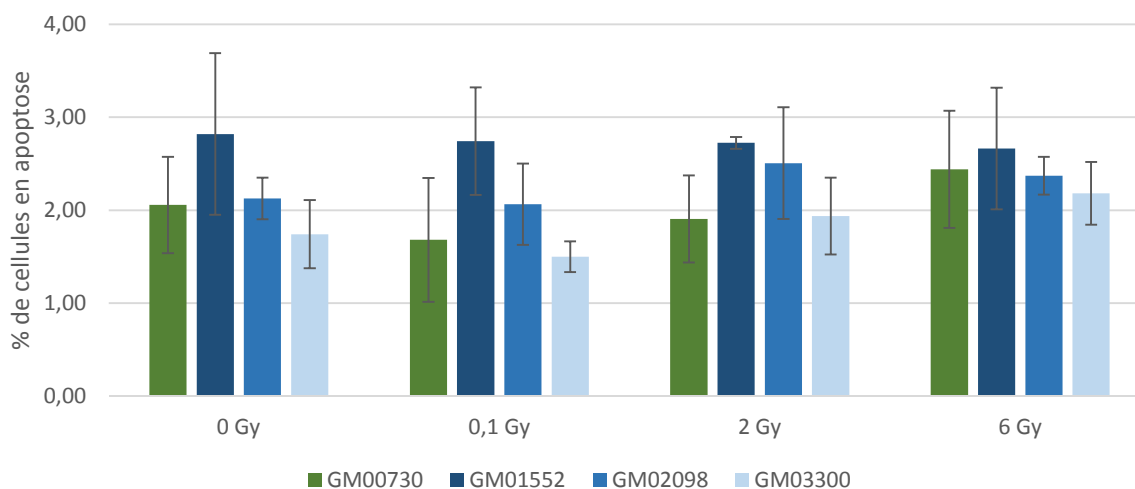


Figure 41 : Mesure de l'apoptose par FACS dans la lignée normale (GM00730) et les lignées Gorlin (GM01552, GM02098 et GM03300) au niveau basal. Les cellules ont été marqué à l'aide de l'Annexin V et de l'iodure de propidium permettant de quantifier les cellules en apoptose. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)
* : valeur significativement différente ($p < 0,05$) de la lignée normale (GM00730) irradiée à la même dose (Test de Student).

GM01552, on retrouve une différence significative pour les gènes *ATM* et *ATR*. Aucune différence n'est retrouvée pour les deux autres lignées Gorlin après une faible dose d'irradiation.

Si l'on s'intéresse ensuite à la dose 2 Gy, seul le gène *ATM* est impacté dans la lignée GM02098 ($p = 0,0081$). De même, seul le gène *ATR* est impacté par cette dose d'irradiation dans la lignée GM01552 ($p = 0,0073$).

Enfin, l'analyse de l'impact de l'irradiation à 6 Gy montre une sous-régulation au niveau du gène *ATM* pour les lignées GM00730 ($p = 0,0006$) et GM02098 ($p = 0,0121$). De même, cette irradiation entraîne une diminution significative de l'expression de *p53* dans les lignées GM00730 ($p = 0,0057$), GM02098 ($p = 0,0188$) et GM03300 ($p = 0,0326$).

B - Evaluation du rôle de la mutation de *PTCH1* sur la mort cellulaire programmée

L'impact sur l'apoptose de la mutation du gène *PTCH1* présente dans les fibroblastes Gorlin de notre étude a été étudié à l'aide d'un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Dans une cellule en vie, les phosphatidylsérines membranaires sont situées au niveau de la face interne de la membrane. L'entrée en apoptose d'une cellule entraîne la délocalisation de ces derniers qui se retrouvent donc exposés des deux côtés de la membrane. Possédant une forte affinité pour ces structures, l'annexine V va alors pouvoir marquer ces cellules en état de mort programmée. Toutefois, toutes les cellules mortes présentent cette dérégulation de la localisation des phosphatidylsérines membranaires. Ainsi, il est important de pouvoir discriminer les cellules en apoptose des autres cellules mortes grâce au marquage à l'iodure de propidium. En effet, ce dernier ne pénètre que dans les cellules en mort cellulaire programmée.

La cytométrie en flux ainsi que la microscopie de fluorescence ont été utilisées pour respectivement quantifier et vérifier l'apoptose des lignées Gorlin et normale que nous avons utilisées durant cette étude. Nous avons étudié l'impact de cette mutation à un niveau basal et après l'application de différentes doses de rayonnements ionisants.

Ainsi, comme le montre la Figure 41 aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les lignées Gorlin et la lignée normale sans irradiation. Les résultats obtenus 24 h après des doses croissantes d'irradiations n'indiquent toujours aucune différence entre les

lignées Gorlin et la lignée normale ou même entre chaque lignées. Enfin, une expérience similaire a été conduite 48 h après irradiation et permet l'obtention des mêmes conclusions.

Tous ces résultats ont été confirmés par microscopie de fluorescence.

C - Conclusion

La quatrième partie de ce travail a consisté à vérifier le statut de la signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN ainsi que de celui de l'apoptose au niveau des fibroblastes primaires Gorlin.

Nous avons donc débuté par étudier l'expression des gènes *ATM*, *ATR* et *p53* sans irradiation. Les deux premiers sont des médiateurs clés de la DDR permettant à travers leurs activations l'initiation de voie de signalisation permettant notamment la régulation de la progression des cellules à travers le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN (209). *p53* est quant à elle aussi une protéine cellulaire clé permettant la régulation de la mitose ou de la mort cellulaire programmée. Elle peut notamment être activée par les facteurs *ATM* et *ATR*. L'étude de l'expression des ARN messagers de ces trois protéines présentent une forte diminution dans les trois lignées Gorlin étudiées au niveau basal. Quelque soit la dose d'irradiation appliquée aux cellules, cette sous-expression est systématiquement retrouvée dans les lignées porteurs de la mutation *PTCH1*.

Des études sur des souris ont montré que la perturbation d'*ATR* peut conduire à une fragmentation chromosomique et à une létalité embryonnaire précoce (210, 211). De plus, Barzilai *et al.* (212) ont mis en évidence un lien entre une déficience en *ATM* et la régulation des ROS au sein de la cellule. En plus de cela, *ATM* et *ATR* sont des régulateurs clés de la réponse aux dommages de l'ADN dont dépend la stabilité du génome (213). Ainsi, la dérégulation des gènes *ATM* et *ATR* retrouvée ici pourrait entraîner une instabilité génomique dans les fibroblastes Gorlin.

Nous avons poursuivi cette étude en analysant le statut de la mort cellulaire programmée dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale. Nos résultats n'ont pas mis en évidence de différence significative que ce soit avec ou sans irradiation. La mutation présente au niveau du gène *PTCH1* ne semble donc pas jouer un rôle sur l'aptitude de la cellule à entrer en apoptose.

V - La protéomique, un générateur d'hypothèse

Enfin, une analyse protéomique en collaboration avec le Pr Michel SEVE de l'Institut de Biologie et de Pathologie (IBP) de Grenoble a été menée dans le but d'élargir notre vision sur les voies de signalisation responsables du phénotype des patients atteints du syndrome de Gorlin. Cette technique permet la caractérisation du protéome des fibroblastes Gorlin et des fibroblastes normaux et leur comparaison que ce soit au niveau basal ou après une irradiation. Une autre étude de protéomique a déjà été menée par l'équipe de Wright *et al.* (214). Toutefois, cette étude s'attardait sur les différences d'expression des protéines thiols entre des lignées de fibroblastes issus de patients Gorlin et des lignées de fibroblastes issus de patients sains considérés comme témoins. Ces protéines thiols, possédant un atome de soufre, jouent un rôle important dans la médiation des réactions redox. Elles permettent l'élimination des radicaux libres en s'oxydant. Ainsi, une diminution du taux de thiols est un marqueur de stress oxydant. Il a été montré qu'une défaillance dans l'équilibre de la balance oxydation/réduction pouvait être impliquée dans la radiorésistance cellulaire (215). L'étude de Biaglow *et al.* (216) démontre qu'une altération du statut des protéines thiols peut impacter la survie cellulaire *in vitro* après exposition aux rayonnements ionisants. Finalement, l'étude de Wright *et al.* (214) rapporte plusieurs modifications d'expression de protéines thiols entre les fibroblastes normaux et les fibroblastes Gorlin. Parmi celles-ci, on retrouve des différences dans l'expression des protéines ayant déjà démontré un rôle dans la réponse aux rayonnements ionisants comme les annexines, ou encore des enzymes permettant la régulation de la carcinogénèse comme la LaminA/C ou l'Aldehyde Dehydrogenase 1A1.

Nous avons décidé de centrer notre étude sur la dérégulation globale des protéines entre Gorlin et normal, au niveau basal. Pour les besoins de l'expérimentation, nous avons dû limiter notre étude à une seule lignée Gorlin. La lignée GM01552 étant celle présentant la plus forte différence avec la lignée normale GM00730 dans la majorité de nos expériences que ce soit au niveau basal ou après irradiation, c'est donc celle qui a été choisie. En effet, cette lignée est la plus radiosensible de toutes celles que nous étudions. Nous avons aussi dû restreindre notre étude à une seule dose d'irradiation.

Après extraction des protéines et obtention des peptides par digestion enzymatique à la trypsine de chacune des conditions, des marqueurs iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) sont greffés à chacune des conditions. L'analyse par MALDI TOF-TOF permettra ensuite de quantifier chacune des protéines d'une condition par rapport aux autres.

Au total, cette étude protéomique a permis d'identifier et de quantifier 1060 protéines à partir des 16212 peptides identifiés par Mascot et Ppilot.

Dans un premier temps, nous vous présentons les résultats de cette étude en définissant quelques voies de métabolisation et de signalisation impactée par la mutation *PTCH1* présente au niveau de la lignée cellulaire GM01552. Puis, nous nous attarderons sur la validation par western blot de deux protéines retrouvées différentiellement régulées.

A - Etude au niveau basal

Nous nous intéressons donc aux protéines différentiellement exprimées entre la lignée de fibroblastes Gorlin GM01552 et la lignée de fibroblastes normaux GM00730 sans irradiation. Soixante-dix-neuf protéines sont retrouvées sous-exprimées avec des ratios Gorlin/Normal variant de 0,287 à 0,758 (Annexe 1). Inversement, 42 protéines sont retrouvées sur-exprimées dans les lignées Gorlin avec des ratios Gorlin/Normal variant de 1,373 à 4,136 (Annexe 2).

Parmi toutes ces protéines, l'analyse de l'ontologie des gènes permet d'étudier les propriétés des produits géniques en fonction de leurs localisations, de leurs fonctions et des processus biologiques dans lesquels ils entrent en jeu. Ainsi, à chaque gène sera attribué plusieurs mots clés le définissant. Une analyse globale permettant de mettre en lien les résultats de l'analyse protéomique et ces descriptions autorise alors de trouver les termes de gene ontology sur-représentés.

On retrouve ainsi une baisse de régulation des protéines jouant un rôle au niveau du stress oxydant à travers la sous-régulation de l'expression de trois protéines : la superoxyde dismutase [Cu-Zn] (SOD1 ; ratio G/N = 0,689 ; $p = 1,96E^{-2}$), la thioredoxine (TXN ; ratio G/N = 0,589 ; $p = 1,34E^{-2}$) ainsi que la phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4 ; ratio G/N = 0,47 ; $p = 7,04E^{-3}$). Le rôle de la première protéine est de catalyser la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. C'est donc l'une des enzymes clés du système de défense cellulaire contre les radicaux libres. La thioredoxine, retrouvée dans le cytoplasme, est une enzyme agissant comme un antioxydant. Elle permet en effet de créer des ponts disulfures entre résidus cystéine afin de faciliter la réduction des protéines. Enfin, la GPX4 catalyse la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène et permet donc la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. La sous-expression de ces protéines dans les

cellules Gorlin par rapport aux cellules normales laisse donc sous-entendre une défaillance des fibroblastes Gorlin dans la réponse au stress oxydant.

Une autre voie dérégulée est celle de la signalisation de la voie WnT. Cette voie de signalisation joue un rôle important dans l'embryogenèse et la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération. La protéine caténine $\beta 1$ (CTNNB1 ; ratio G/N = 1,402 ; $p = 2,98E^{-2}$) est surexprimée dans les fibroblastes Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux étudiés. Cette protéine fait partie d'un complexe de protéines constituant les jonctions adhérentes, nécessaires à la régulation de l'adhésion et de la croissance cellulaire. Des dérégulations dans l'expression de cette protéine sont retrouvées au niveau de certains cancers comme les médulloblastomes ou les cancers ovariens. Une autre protéine de cette voie retrouvée surexprimée est la S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1 ; ratio G/N = 1,564 ; $p = 8,90E^{-3}$). Cette protéine appartient au complexe SCF impliqué dans la régulation de l'ubiquitination de protéines spécifiques permettant par la suite leurs dégradations par le protéosome. Parmi les substrats de ce complexe, on retrouve de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et du développement. Enfin, la protéine WnT-2b (WNT2B ; ratio G/N = 0,504 ; $p = 1,05E^{-2}$) est sous-exprimée dans la lignée de fibroblastes Gorlin par rapport à la lignée normale. Cette protéine appartient à la famille des protéines WnT et est donc impliquée dans le processus de développement comme la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation. De nombreuses études démontrent un lien entre cette voie de signalisation WnT et la voie de signalisation SHH (217, 218).

Enfin, un dernier exemple de voie dérégulée dans la lignée Gorlin étudiée par rapport à la lignée normale à un niveau basal est celle du métabolisme du glutathion. Le glutathion est un anti-oxydant très puissant permettant de neutraliser les radicaux libres et donc de protéger l'intégrité cellulaire. L'isocitrate déhydrogénase [NADP] est une protéine cytoplasmique (IDH1 ; ratio G/N = 0,547 ; $p = 8,31E^{-3}$) qui est sous-exprimé dans la lignée Gorlin par rapport à la lignée normale sans irradiation. Cette protéine permet de catalyser la décarboxylation oxydative de l'isocitrate 2-oxoglutarate. Il existe cinq isoformes localisés dans des compartiments différents. L'isocitrate déhydrogénase cytoplasmique retrouvée ici joue un rôle dans la production de NADPH, un coenzyme d'oxydoréduction. Or, le NADPH est nécessaire à l'oxydation du glutathion par la glutathion réductase.

D'autres voies sont retrouvées dérégulés dans la lignée Gorlin GM01552 par rapport à la lignée normale GM00730 en absence d'exposition à des rayonnements ionisants. C'est notamment le cas de la voie du métabolisme du pyruvate, de la glycogénèse ou de la voie de signalisation des MAPK.

B - Validation par western blot

Afin de valider les résultats obtenus par protéomique, nous avons décidé de tester la quantité de deux protéines par western blot. De par leur rôle important dans la défense anti-oxydante, nous avons choisi de nous attarder sur la superoxyde dismutase [Cu-Zn] et la GPX4. La quantité de ces deux protéines dans la lignée normale GM00730 et la lignée Gorlin GM01552 a été évaluée sans irradiation (Figure 42-A et B).

Ces résultats préliminaires permettent de confirmer ceux retrouvés grâce à l'étude de protéomique. En effet, à nouveau, les gènes SOD [Cu-Zn] et GPX4 semblent être sous-exprimés dans la lignée GM01552 par rapport à la lignée GM00730.

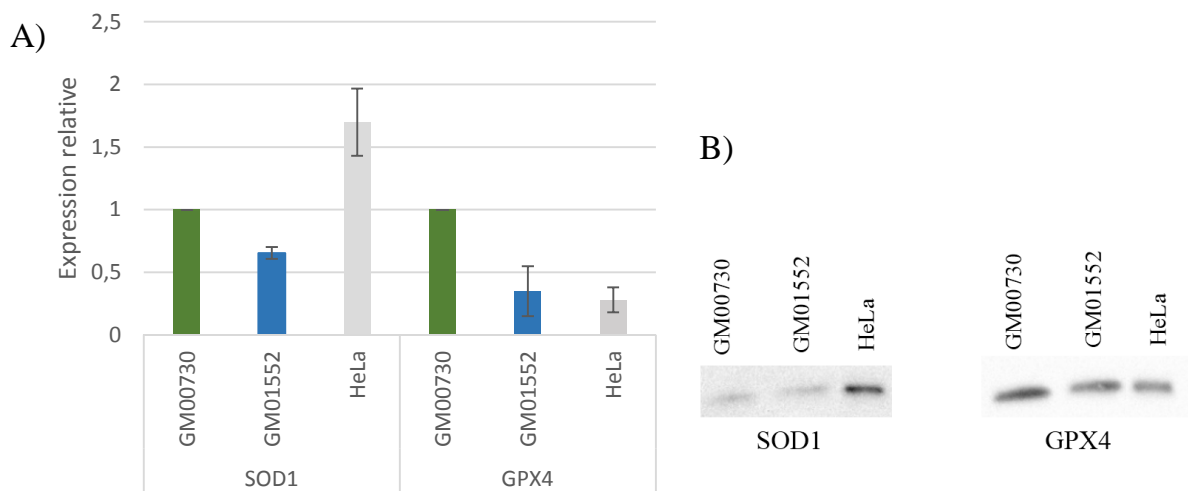


Figure 42 : Etude de l'expression protéique de la superoxyde dismutase [Cu-Zn] et de la GPX4 dans la lignée normale GM00730, la lignée Gorlin GM01552 et la lignée HeLa, sans irradiation : A) quantification et B) images caractéristiques. Cette étude a été réalisée par western blot. La normalisation a été effectuée grâce à l'utilisation d'un gel stain free permettant la quantification des protéines totales dans chaque dépôt. Deux expériences indépendantes ont été réalisées (n = 2).

Discussion

Le syndrome de Gorlin est une maladie génétique peu connue du grand public. En effet, avec une prévalence estimée à 1 pour 60000 individus en moyenne, ce syndrome est classé parmi les maladies rares. Aussi nommé nævomatose basocellulaire, elle est transmise sous un mode autosomique dominant. Bien qu'une hétérogénéité génétique existe, le défaut présent chez ces patients consiste majoritairement en une mutation au niveau du gène *PTCH1* (93, 94). Le produit de ce gène code pour une protéine transmembranaire jouant le rôle de récepteur du ligand hedgehog. L'interaction entre ces deux acteurs de la voie sonic hedgehog permet l'activation de celle-ci menant à la modulation de la transcription de gènes. Bien qu'à ce jour toutes les cibles transcriptionnelles ne soient pas décrites, certaines comme le gène *PTCH1*, autorisant un rétrocontrôle de la voie, ou encore le gène codant pour la cycline D1, permettant la régulation du cycle cellulaire sont connues. Depuis sa découverte, de nombreuses études ont démontré le rôle crucial de cette voie de signalisation au niveau du développement embryonnaire (113). Que ce soit chez les invertébrés ou les vertébrés, elle permet la régulation spatiale et temporelle de la formation et de la migration de divers tissus dont le tube neural, les poumons, la peau, le squelette axial, les dents et les membres (98, 118-120). Elle est, de plus, cruciale au processus d'organogénèse en contrôlant notamment la croissance des doigts et l'organisation du cerveau. Il a été démontré que cette voie était inhibée chez l'adulte sain mais qu'elle pouvait être réactivée afin de permettre la régénération tissulaire, la prolifération et la survie cellulaire (113). La mutation hétérozygote du gène *PTCH1* (ou de tout autre acteur de la voie SHH) présent dans les cellules des patients Gorlin entraîne donc une activation aléatoire de cette voie pourtant essentielle à un développement embryonnaire normal. Le phénotype des patients présente donc de nombreuses anomalies du développement (83). Par exemple, on peut citer les défauts squelettiques, les anomalies dermatologiques comme les pits palmo-plantaires ainsi que les anomalies oro-faciales comme les becs de lièvres. D'autres symptômes caractérisent le phénotype de ces patients. En effet, ils possèdent aussi une forte prédisposition à développer des carcinomes basocellulaires, ainsi que d'autres cancers comme les médulloblastomes ou les rhabdomyosarcomes. Les tumeurs cutanées représentent l'un des critères les plus évidents de diagnostic de la maladie avec près de 97% de malades atteints (86). La survenue de ces tumeurs dès l'âge de 20 ans contraste avec la situation de la population générale où ces cancers se développent généralement après 60 ans. Ces carcinomes basocellulaires sont des cancers cutanés se développant aux dépens des kératinocytes présents au niveau de la couche la plus superficielle de la peau : l'épiderme. De plus en plus d'études montrent l'importance du microenvironnement et notamment des fibroblastes, dans l'apparition

de ces tumeurs (171, 172). Bien que le syndrome de Gorlin ne soit pour le moment pas considéré comme étant une maladie d'hyper-radiosensibilité, Wallin *et al.* (91) ont apporté la preuve de ce phénotype chez les patients Gorlin. En effet, les enfants Gorlin traités par radiothérapie présentent une augmentation significative du nombre de BCC dans le champ d'irradiation 6 mois à 3 ans après traitement (91). En revanche, le phénotype radiosensible des cellules n'est pas établi aussi clairement (173-175).

A la lumière de toutes ces données, nous avons donc décidé de travailler avec trois lignées de fibroblastes primaires issus de patients atteints du syndrome de Gorlin et une lignée issue d'un patient considéré comme sain. Cette dernière a déjà été employée en tant que témoin dans de nombreuses études et notamment dans celle de Nagasawa *et al.* (219) portant sur les effets des rayonnements ionisants. L'hyper-radiosensibilité des lignées GM01552 et GM02098 a déjà été démontré par Chan *et al.* (174). En revanche, aucune publication n'est reporté en ce qui concerne la troisième lignée : GM03300. Le test de survie clonale à long terme nous a permis de retrouver ce résultat d'hyper-radiosensibilité et de l'étendre à la dernière lignée. Nos résultats, ainsi que ceux de nos collaborateurs du CEA Evry (Equipe M. MARTIN) ont aussi révélé une large gamme de niveau de sensibilité corrélant parfaitement avec l'ampleur de l'anomalie présente au niveau de la protéine PTCH1. Ainsi, la souche GM01552 possédant la mutation la plus précoce au niveau du gène et donc une protéine tronquée plus précocément, possède l'hyper-radiosensibilité la plus importante. Un phénotype d'hyper-radiosensibilité est bien souvent associée à des défauts dans la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). En effet, on peut citer plusieurs exemples comme celui des personnes atteintes d'ataxia telangiectasia (68, 69). Porteurs d'une mutation au niveau du gène ATM, ces patients possèdent un défaut dans la signalisation des cassures double brin apparaissant après une irradiation ionisante. Ils présentent donc un phénotype d'hyper-radiosensibilité caractéristique. Dans le même esprit, des mutations du gène NBS1 codant pour une protéine essentielle à la formation du complexe MRE11-RAD50-NBS1 mène au syndrome de Nijmegen (68). A nouveau, la défaillance de la reconnaissance des cassures double brin induites par les rayonnements ionisants entraîne une hyper-radiosensibilité. Ces patients présentent aussi d'autres caractéristiques phénotypiques communes à toutes les maladies présentant des défauts de la signalisation ou des réponses effectives de la DDR comme une forte prédisposition à développer des cancers, ainsi que des problèmes neurologiques (68). Ces caractéristiques phénotypiques mises en parallèles avec celles des patients atteints du syndrome de Gorlin nous ont amené à questionner l'impact de la mutation du gène PTCH1 sur la réponse aux dommages de l'ADN chez ces derniers. Très peu

d'études se sont intéressées à ce lien : seulement 6 études ressortent lorsque l'on cherche 'NBCCS + DNA damage response' sur le site de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) et 28 avec les mots clés 'NBCCS + DNA repair'.

Afin d'avoir une vue d'ensemble des systèmes de réparation, nous avons décidé de continuer la caractérisation cytotoxique des fibroblastes de notre étude. Nous avons donc poursuivi les tests de survie à long terme en étudiant l'impact de différents stress physiques ou chimiques menant à différents dommages à l'ADN et donc à la mobilisation de différentes voies de réparation.

L'impact de la mutation présente au niveau du gène *PTCH1* dans les fibroblastes Gorlin sur les voies de réparation des cassures double brin, les premières suspectées au vue du phénotype d'hyper-radiosensibilité, a été testé à l'aide d'un stress chimique générateur de cassure double brin pur : la bléomycine. Contrairement aux rayonnements ionisants, ce stress chimique va donc mettre en jeu les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN : la voie de réparation par suture non homologue et la voie de réparation par recombinaison homologue, en fonction de la phase du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule au moment de la survenue du dommage. Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence de sensibilité des lignées Gorlin par rapport à la lignée normale révélant ainsi un probable bon fonctionnement de ces deux voies de réparation. L'étude de la disparition des foci γ H2AX par nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN d'Evry et Equipe J. LAMARTINE de Lyon) a permis d'étudier la réparation des cassures double brin de l'ADN. Aucune différence n'a été observée en terme de cinétique de réparation entre la lignée normale et les trois lignées Gorlin menant à la conclusion d'une absence de différence au niveau de cette activité. Un nouveau protocole de traitement : l'électrochimiothérapie à base de bléomycine a été testé chez trois patients atteints du syndrome de Gorlin et présentant des carcinomes basocellulaires non résécables de par leurs localisations et leurs tailles (220). Cette molécule chimique ne présente donc pas d'effet négatif comme la radiothérapie pour ces patients.

Les rayonnements ultraviolet B entraîneront principalement l'apparition de CPD mettant en jeu le système de réparation par excision de nucléotides. Tout comme Brellier *et al.* (179), nous n'avons pas mis en évidence de sensibilité à ce stress dans nos trois lignées de fibroblastes Gorlin par rapport à la lignée normale. En revanche, dans leur étude, Applegate *et al.*, (177) décrivent une sensibilité à ce stress exogène. Toutefois, ils discutent de la possibilité que leurs lampes émettent aussi des rayonnements ultraviolets A. Or, ces deux rayonnements UV entraînent des dommages différents à l'ADN. Notre analyse de la réparation des CPD par HPLC

couplée à la spectrométrie de masse en tandem nous a permis de nous assurer qu'il n'y avait pas de différence entre les lignées Gorlin étudiées et la lignée normale. Nous avons donc décidé de tester l'impact des rayonnements ultraviolet A. Les UVA, connus pour générer des dommages à l'ADN grâce à la production de ROS qu'ils entraînent vont donc mener à la formation préférentielle de cassures simple brin, d'oxydation de bases ainsi que de dimères de pyrimidines (17, 20). Ils mèneront donc à la mobilisation des voies de réparation par excision de bases pour la réparation des cassures simple brin et des bases oxydées ; et de la voie de réparation par excision de nucléotides pour la réparation des dimères de pyrimidine. Nos résultats vont dans le sens d'une sensibilité des fibroblastes Gorlin à ce stress, expliquant en même temps, tout du moins en partie, le phénotype photosensible retrouvé par l'équipe d'Applegate *et al.* (177) après une irradiation UVA et UVB. Ces rayonnements ultraviolets, tous deux composants du spectre solaire, ont été directement impliqués dans l'apparition des carcinomes basocellulaires (158). Il est fortement recommandé aux patients Gorlin de se protéger du soleil, afin de limiter l'apparition de ces cancers cutanés. Toutes les données des études de survie clonogénique mises en parallèles semblent indiquer que la voie NER n'est pas impactée par la présence de la mutation du gène *PTCH1*. En revanche, elles nous permettent de suspecter une possible défaillance de la réparation par excision de bases au niveau de ces cellules de peau chez les patients Gorlin. En effet, seuls les stress menant à l'activation de cette voie (rayonnement ionisant et UVA) mènent à des phénotypes de sensibilité cellulaire. En revanche, les autres stress testés (UVB et bléomycine) ne faisant pas intervenir la voie BER, ne semblent pas entraîner de sensibilité particulière.

Nous avons donc décidé de focaliser notre attention sur l'état du système de réparation associé aux bases oxydées, aux sites abasiques et aux cassures simple brin, le système BER. D'un point de vue transcriptomique, la sous-expression de la majorité des acteurs testés est observée. En effet, 18 gènes sont retrouvés sous-exprimés sur les 22 testés. Toutefois, l'effondrement est particulièrement marquant au niveau des glycosylases du BER. La glycosylase MYH, ainsi que la glycosylase bi-fonctionnelle OGG1 apparaissent toutes les deux sous-exprimées dans les trois lignées Gorlin étudiées par rapport à la lignée normale à l'état basal sans stress exogène. Ces deux acteurs de la reconnaissance de la lésion 8-oxoguanine sont aussi retrouvés réduits après les trois doses de rayonnements ionisants testées. Ces résultats transcriptomiques ont pu être confirmés d'un point de vue activité à l'aide des biopuces réparation. En effet, sur ces tests miniaturisés (199), l'activité d'excision-resynthèse des lésions associées à la reconnaissance par la glycosylase OGG1 apparait comme drastiquement diminuée, dans deux lignées

cellulaires sur les trois étudiées. Après exposition à une forte dose de rayonnement ionisant, il est intéressant de noter que l'étude de transcription des gènes et l'étude d'activité mettent en évidence une sous-expression et donc une diminution d'activité pour les glycosylases étudiées dans la lignée normale. En revanche, concernant les lignées Gorlin, il apparaît que ces résultats ne présentent globalement pas de différence significative entre le niveau basal et le niveau post-irradiation. Il est toutefois important de se souvenir que ce niveau basal dans les cellules Gorlin est faible par rapport à celui des cellules normales. Des études ont démontré qu'une faible expression d'OGG1 pouvait entraîner une accumulation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) menant à l'augmentation des lésions 8-oxoG (201, 202). Le MitoSOX™, un colorant fluorogénique ciblant spécifiquement l'anion superoxyde produit au niveau mitochondrial, nous a permis de vérifier la production de ce ROS dans les fibroblastes de notre étude. Les résultats démontrent qu'il n'y a pas de différence statistique que ce soit au niveau basal, ou après différentes doses d'irradiations dans la quantité d'anions superoxydes présents dans les mitochondries de deux lignées sur les trois étudiées. Nous avons ciblé la production de ce ROS au niveau mitochondrial car étant polarisé, l'anion superoxyde ne peut pas traverser les membranes hydrophobes de la mitochondrie où il est le ROS le plus abondant, sauf en empruntant les canaux anioniques (200). La faible expression de la glycosylase bi-fonctionnelle OGG1 n'entraînerait donc pas d'accumulation de ce ROS au niveau basal. Toutefois, il est possible que cette diminution d'OGG1 impacte la production ou l'accumulation des autres espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyl. En effet, très instable, l'anion superoxyde se dismute rapidement en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à l'aide des superoxydes dismutases (SOD) (221). Le radical hydroxyl peut par la suite être formé via une réaction de Fenton faisant intervenir l'H₂O₂ et un ion de cuivre (I) libre (222). Cependant, les rayons UV par rupture homolytique de l'eau, les ultrasons par cassures des liaisons de l'eau et les rayonnements ionisants par radiolyse de l'eau sont également capables de générer ce radical hydroxyl (223). Or, contrairement à l'anion superoxyde, ce radical est considéré comme étant très réactif vis-à-vis des systèmes biologiques et notamment de l'ADN où il entraînera des dommages oxydatifs (224). Après exposition à des rayonnements ionisants, les trois lignées Gorlin réagissent de manière hétérogène : la production d'anions superoxydes va fortement augmenter dans la lignée GM01552 tandis que la lignée GM02098 conserve un niveau relativement stable. Enfin, un autre rôle de l'anion superoxyde est à prendre en compte : il permet le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose en facilitant la sortie du cytochrome C de la mitochondrie (225).

La glycosylase UNG et l'endonucléase APE1 sont elles aussi retrouvées drastiquement sous-exprimées dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale au niveau basal. La première est la glycosylase permettant de cliver l'uracile présent dans l'ADN, la deuxième autorise le clivage de la liaison phospho-diester de l'ADN laissant un hydroxyle 3'-OH et un 5'-phosphate terminale libre. Le lien entre ces deux acteurs de la voie de réparation BER et la radiosensibilité a pu être confirmé (203, 204). Naidu *et al.* (204) démontrent en effet qu'une inhibition d'APE1 à l'aide de siRNA entraîne une diminution de la radiorésistance. Il est intéressant de noter que la radiorésistance cellulaire est proportionnelle à la quantité d'APE1 présente (204). Ainsi, la diminution que nous observons au niveau basal dans les lignées cellulaires que nous étudions pourrait donc entraîner le phénotype de radiosensibilité visible au niveau cellulaire et plus généralement au niveau de l'organisme. A nouveau, la réponse aux stress radiatifs semble être plus forte au niveau de la lignée normale pour laquelle il y a une sous-expression de ces gènes après irradiation. En revanche, l'expression est globalement similaire pour les trois lignées de fibroblastes primaires Gorlin sans et avec irradiation démontrant une absence d'adaptation de ces lignées à un stress ionisant. Outre son rôle dans la réponse cellulaire face à un stress oxydant, APE1 est aussi engagé dans de nombreux autres processus cellulaires comme la transcription génique, la prolifération ou la mort cellulaire (226).

Nos expériences de PCR en temps réel n'ont pas mis en évidence de détérioration de l'expression génique de la polymérase β dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale que ce soit à un niveau basal ou après les différentes doses de rayonnements ionisants testées. Toutefois, dans leur étude, Sobol *et al.* (205) démontrent qu'une délétion de cette polymérase peut mener à des défauts de réparation par excision de bases et une hyper-sensibilité aux agents alkylants. L'étude de l'activité d'excision-resynthèse à l'aide des puces plasmides de la startup LX Repair nous informe que les lésions alkylantes sont moins efficacement réparées dans deux lignées Gorlin sur les trois étudiées. Comme précédemment, la lignée possédant l'activité d'excision-resynthèse la plus proche de la lignée normale est la lignée GM02098 présentant l'hyper-radiosensibilité la moins forte. A nouveau, la réponse à l'irradiation est plus forte dans la lignée normale que dans les lignées Gorlin étudiées où les ratios obtenus ne sont pas significativement différents.

Enfin, l'expression du gène codant pour XRCC1 est elle aussi significativement diminuée dans les cellules Gorlin. Dès 1998 (206), ce gène a été décrit comme jouant un rôle dans la radiosensibilité cellulaire suite à une exposition à des rayonnements ionisants.

En revanche, le lien entre l'expression de la ligase 3 et la radiosensibilité a été très peu étudié. Toutefois, deux lignées Gorlin sur les trois étudiées présentent une diminution de l'expression de cette ligase.

L'addition de l'effondrement de l'expression des glycosylases du BER associé à la forte diminution de l'activité d'excision-resynthèse des lésions gérées par ce système de réparation nous mènent à conclure à une déficience de cette voie au niveau des fibroblastes de patients Gorlin. Les cellules de ces patients sont donc moins équipées pour faire face aux bases endommagées résultant de petites altérations chimiques comme les bases oxydées ou les cassures simple brin. Ceci pourrait donc expliquer, tout du moins en partie, le phénotype de sensibilité aux UVA et aux RI décrits dans les lignées Gorlin. Toutefois, l'absence d'augmentation de la production de l'anion superoxyde dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale nous autorise à penser que le problème de fond chez ces patients n'est pas la surexpression de l'anion superoxyde. En revanche, la réponse hétérogène de ses lignées au niveau de la production de ses ROS après irradiation peut être corrélée avec la radiosensibilité (Equipe M. MARTIN d'Evry et Equipe J. LAMARTINE de Lyon). Plus la cellule sera hyper-radiosensible, plus elle produira d'anions superoxydes. Il en va de même avec l'activité d'excision-resynthèse des lésions du BER. Or, l'augmentation de ROS dans la mitochondrie va mener à l'augmentation des dommages à l'ADN et plus particulièrement à des dommages oxydatifs normalement pris en charge par la voie de réparation par excision de bases. Or, la voie BER est drastiquement impactée au niveau basal et donc après irradiation, menant à une déficience dans la réparation des dommages oxydatifs. Ces résultats pourraient donc permettre d'expliquer la prédisposition aux cancers des patients Gorlin et plus particulièrement l'augmentation de la survenue des BCC après radiothérapie dans le champ d'irradiation (91). L'effet de l'irradiation que nous avons décrit jusque-là est toujours supérieur dans la lignée normale par rapport aux lignées Gorlin démontrant une faible adaptation de ces lignées mutées au stress. Nos expériences n'ont pour le moment pas permis de mettre en évidence le moyen mécanistique reliant cet effondrement du BER et la mutation *PTCH1*. Toutefois, c'est la première fois qu'un lien entre la voie de réparation BER, l'hyper-radiosensibilité et la mutation du gène *PTCH1* présente dans les cellules Gorlin est mis en évidence.

Enfin, l'étude protéomique que nous avons menée sur la lignée GM01552 par rapport à la lignée normale GM00730 sans irradiation a permis de révéler des dérégulations majeures au niveau des voies de régulation du stress oxydant et du métabolisme du glutathion. Il semble d'après cette étude que la lignée de fibroblaste Gorlin étudiée ici présente une baisse de

régulation de la réponse au stress oxydant. En effet, trois de ces protéines majeures sont retrouvées sous exprimées : la superoxyde dismutase, la thiorédoxine ainsi que la phospholipid-hydroperoxyde glutathione peroxydase. Etant l'une des enzymes clés du système cellulaire contre les radicaux libres, la superoxyde dismutase permet de catalyser la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. La thiorédoxine, retrouvée dans le cytoplasme est une enzyme agissant comme un antioxydant. Elle permet en effet de créer des ponts disulfures entre résidus cystéine afin de faciliter la réduction des protéines. Ce système antioxydant fait aussi intervenir la NADPH ainsi que la thiorédoxine réductase (227). Enfin, la GPX4 catalyse la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène et permet donc la protection des cellules contre les dommages oxydatifs. A notre connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent été menée pour étudier le rôle du stress oxydant dans des cellules issues de patients Gorlin. Ce rôle semble toutefois être lié au système de défense anti-oxydant de la cellule, ainsi qu'à la régulation de l'apoptose via la voie intrinsèque de signalisation. Ainsi, la dérégulation de la voie SHH présente dans les lignées Gorlin pourrait donc impacter la défense anti-oxydante de la cellule. La dérégulation de cette défense contre les radicaux libres, prévenant habituellement les dommages oxydatifs (228), peut donc entraîner une augmentation de ces derniers. Couplées à l'effondrement de la voie de réparation des bases oxydées, BER, ces données permettent de mieux appréhender l'augmentation des carcinomes basocellulaires et plus généralement des cancers chez les patients Gorlin. Le lien direct entre BER, stress oxydant et fibroblastes Gorlin n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à maintenant.

Il est intéressant de noter qu'une dérégulation du métabolisme du glutathion est aussi mise en exergue par cette étude protéomique. Cet enzyme est l'anti-oxydant majeur de la cellule, permettant la neutralisation des radicaux libres. La phospholipid-hydroperoxyde glutathione peroxydase (GPX4) joue un rôle important dans le métabolisme de cet anti-oxydant. La sous-expression de cette enzyme ainsi que l'isocitrate déshydrogénase [NADP] dans la lignée de fibroblaste Gorlin étudiée semble indiquer une baisse de cette défense antioxydante. En effet, l'isocitrate déshydrogénase [NADP] joue un rôle dans la production de NADPH nécessaire à l'oxydation du glutathion par la glutathion réductase. Le NADPH est aussi nécessaire à la réduction de la thiorédoxine par la thiorédoxine réductase. En ce qui concerne le rôle de GPX4, l'étude de Yant *et al.* (229) a démontré que les cellules dérivées de souris hétérozygotes pour cette protéine présentaient une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants γ ainsi qu'au stress oxydant. Or, cette diminution d'expression de la GPX4 se retrouve dans les cellules de patients Gorlin présentant elles aussi une hyper-radiosensibilité.

L'hyper-radiosensibilité est bien souvent un phénotype pouvant être relié à un défaut dans l'une des voies de réparation des cassures double brin : la voie de réparation par suture non homologue et la voie de réparation par recombinaison homologue. Bien qu'une sous-expression globale puisse être présumée, la réponse des lignées Gorlin de notre étude apparaît plus homogène que lors de notre étude des gènes du BER. Toutefois, trois gènes sont statistiquement régulés à la baisse dans les lignées Gorlin par rapport à la lignée normale : *Ku80*, *RAD50* et *XPC*. *Ku80*, impliqués dans le complexe hétérodimérique Ku contenant aussi la sous-unité *Ku70*, se lie aux extrémités des cassures double brin et permet d'initier la voie de réparation par suture non homologue. Dans leur étude *Hu et al.* (207), ont relié une augmentation de la sensibilité cellulaire aux rayonnements ionisants à une sous-régulation de l'expression de *Ku80*. Très peu d'études portent sur l'impact d'une dérégulation de l'expression de *RAD50* seule. En effet, ce gène code pour une protéine appartenant au complexe MRN, c'est donc le rôle de l'ensemble de ce complexe qui est étudié pour déterminer si il y a un lien avec l'hyper-radiosensibilité. *Kuroda et al.* (208) ont mis en évidence qu'une inhibition de ce complexe entraînait une hyper-radiosensibilité.

En revanche, le lien entre l'expression de *XPC*, acteur du NER et la radiosensibilité a été peu étudié. En effet, les études portant sur *XPC* étudient le plus souvent le lien entre un défaut de cette protéine et une potentielle hyper-photosensibilité. Toutefois, récemment, il a été montré que *XPC* jouait aussi un rôle important dans la voie de réparation par excision de bases (BER). L'étude de *D'Errico et al.* démontre ainsi l'hypersensibilité des cellules *XPC* aux agents oxydants (230). La diminution significative de l'expression du gène *XPC* dans les fibroblastes Gorlin que nous étudions à la fois au niveau basal, mais aussi après irradiation, nous permet donc d'imaginer une défaillance des voies NER ou BER dans ces cellules. Toutefois, l'étude de la réparation de CPD suite à une exposition aux UVB nous permet de réfuter cette hypothèse. La voie NER n'est pas affectée dans les lignées Gorlin que nous étudions. Ce résultat va dans le même sens que l'étude de *Valin et al.* (170) et met en exergue une nouvelle fois la défaillance de la voie de réparation par excision de bases. *XPC* joue également un rôle dans la coordination de la réparation de l'ADN et de l'activation des checkpoint de cycle cellulaire à travers l'interaction directe de *XPC* avec les protéines ATM et ATR (231). En effet, dans les cellules n'exprimant pas *XPC*, la phosphorylation d'ATM et d'ATR et donc par prolongement de Chk1 et Chk2 est significativement réduite entraînant donc une réponse défaillante de la cellule à une irradiation UV. Nous avons donc poursuivi notre étude en nous intéressant aux autres réponses effectives de la DDR, ainsi qu'à la signalisation de ce dernier. D'un point de vue

transcriptomique, une très forte sous-expression des trois gènes appartenant à la signalisation de la DDR a été observée. Le transducteur ATM permettant la signalisation des cassures double brin est retrouvé sous-exprimé non seulement à l'état basal mais aussi après les différentes doses de rayonnements ionisants testé dans les trois lignées Gorlin par rapport à la lignée normale. De même, le gène *ATR* permettant la signalisation des cassures simple brin est dérégulé à la baisse à l'état basal et après irradiation dans les lignées Gorlin testés. Ces deux données permettent de souligner l'impact de la mutation *PTCH1* sur la signalisation des cassures de la molécule d'ADN. Une étude a démontré que la perturbation d'*ATR* pouvait conduire à une fragmentation chromosomique et à une létalité embryonnaire précoce chez des souris (210, 211). De plus, Barzilai *et al.* (212) ont mis en évidence un lien entre une déficience en ATM et la régulation des ROS au sein de la cellule. Or, la déficience retrouvée ici entraîne une dérégulation que nous avons déjà évoquée dans la production de l'anion superoxyde au niveau des lignées Gorlin après exposition à des rayonnements ionisants. En plus de cela, ATM et ATR sont des régulateurs clés de la réponse aux dommages de l'ADN dont dépend la stabilité du génome (213). Ainsi, la dérégulation des gènes *ATM* et *ATR* retrouvée ici entraîne une instabilité génomique dans les fibroblastes Gorlin qui a été démontré par nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN d'Evry et Equipe J. LAMARTINE de Lyon). Cette instabilité génomique a déjà été corrélée avec l'apparition de cancer (4). Le troisième gène testé, celui codant pour la protéine p53 est lui aussi retrouvé fortement sous-exprimé au niveau basal et après l'exposition des cellules à différentes doses de rayonnements ionisants. De nombreuses études démontrent un lien entre p53 et cancérogénèse. Cette protéine, gardienne du génome, possède de multiples rôles dont la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'entrée en apoptose (45). Elle peut aussi être activée par les facteurs ATM et ATR. De plus, XPC peut aussi jouer un rôle dans le processus d'entrée en mort cellulaire programmée (232). Nous avons donc voulu savoir si cette forte sous-expression de *p53* et de *XPC* entraînait des défauts au niveau de la mort cellulaire programmée. D'après nos expériences de marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium, aucune différence significative n'est retrouvée entre les lignées Gorlin et la lignée normale au niveau basal ou après différentes doses de rayonnements ionisants. Ce résultat démontre que l'apoptose n'est pas impactée par la mutation *PTCH1*, contrairement aux différentes voies de réparation de l'ADN dans ces lignées. Finalement, nos collaborateurs se sont intéressés à la régulation du cycle cellulaire et ont pu mettre en évidence un défaut des phases G2/M dans les cellules Gorlin. Toutes ces données mènent à l'idée d'une dérégulation

globale de la signalisation des dommages à l'ADN impactant plus particulièrement les voies de réparation de l'ADN spécialisées dans le stress oxydant.

L'utilisation de l'étude par protéomique nous a aussi permis de mettre en évidence d'autres défauts d'expression protéique au niveau de la lignée Gorlin GM01552 par rapport à la lignée normale sans irradiation aux rayonnements γ . La voie WnT est retrouvée dérégulée à travers la modification de l'expression de trois protéines clés : la caténine $\beta 1$; la S-phase kinase-associated protein 1 et la protéine Wnt-2b. La caténine $\beta 1$ fait partie d'un complexe de protéines constituant les jonctions adhérentes, nécessaire à la régulation de l'adhésion et de la croissance cellulaire (233). Il est intéressant de noter que des dérégulations dans l'expression de cette protéine sont retrouvées dans de nombreux cancers comme les médulloblastomes (234), aussi présents chez les patients Gorlin. De plus, nos collaborateurs ont noté une augmentation de l'adhérence des fibroblastes Gorlin par rapport aux fibroblastes normaux, que nous retrouvons aussi dans nos cultures. En effet, en observant au microscope, les fibroblastes Gorlin apparaissent plus étalés et plus gros que les fibroblastes normaux. La quantification du nombre de cellules à confluence dans une flasque 75 cm² démontre le même phénomène. La protéine SKP1 appartient au complexe SCF (SKP1-CUL1-F-Box-Protein) impliqué dans la régulation de l'ubiquitination de protéines spécifiques permettant par la suite leurs dégradations par le protéosome. Parmi les substrats de ce complexe, on retrouve de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réplication de l'ADN et dans le développement (235). Une sur-régulation aberrante de certains composants de ce complexe a pu être reliée à de nombreux cancers, dont notamment les cancers de la peau (236). Enfin, une dernière protéine appartenant à la signalisation WnT est retrouvée sous-exprimée dans les cellules Gorlin par rapport aux cellules normales, c'est la protéine WNT2B. Cette protéine fait partie de l'une des voies d'induction WnT impliquée dans les processus de développement comme la régulation cellulaire et la différenciation. L'implication de cette protéine dans l'apparition des cancers et notamment des carcinomes basocellulaires a été démontrée par Bonifas *et al.* (237). En effet, dans leur étude, ils démontrent une sur-expression du transcript codant pour WNT2B au niveau des carcinomes basocellulaires, contrairement à sa faible présence au niveau de la peau. Cette étude n'est pas la seule à mettre en évidence en lien entre la voie WnT et la voie de signalisation sonic hedgehog mutée dans les cellules de patients Gorlin (217, 218, 238).

A la lumière de toutes ces informations, nous pouvons donc supposer que les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin possèdent non seulement une mutation du gène

PTCH1 menant à une activation aberrante de la voie SHH, mais que cette mutation impacte aussi d'autres voies de régulation cellulaire dont la voie de réparation de l'ADN par excision de bases. Couplées à un effondrement de la défense anti-oxydante de la cellule, ces données permettent de mieux appréhender le phénotype de prédisposition aux cancers présents chez les patients Gorlin.

En combinant tous ces résultats, nous sommes en mesure de proposer un modèle pour expliquer le phénotype des patients Gorlin (Figure 43).

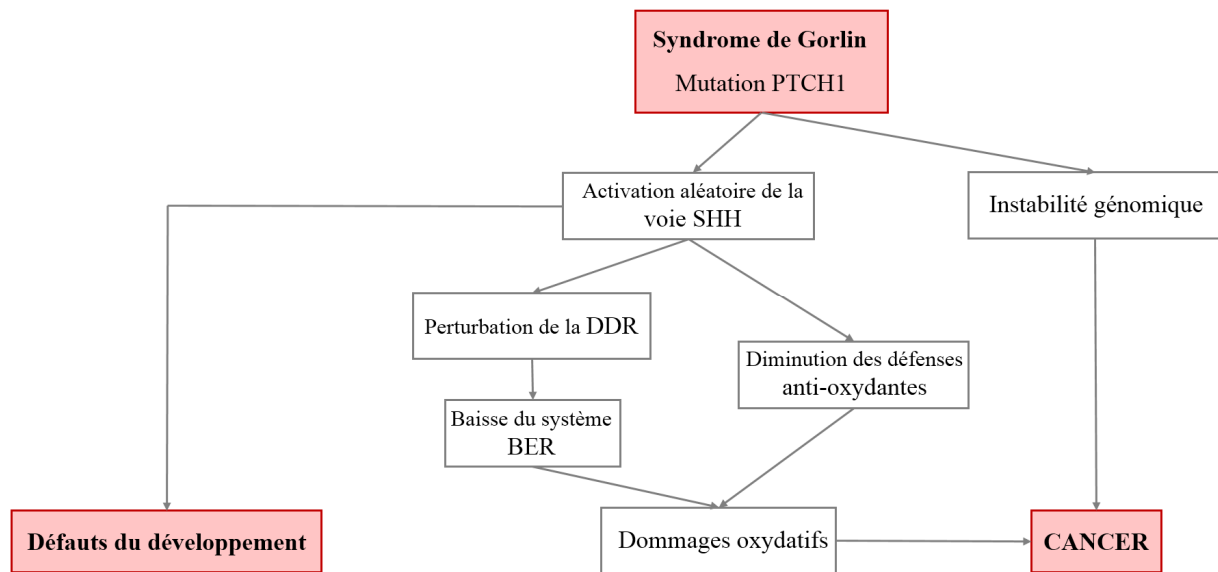


Figure 43 : Modèle d'explication de l'apparition du phénotype des patients Gorlin. Les patients atteints du syndrome de Gorlin possèdent une mutation du gène *PTCH1* (ou de l'un des acteurs de la voie de signalisation sonic hedgehog). Cette mutation va entraîner l'activation aléatoire de la voie de signalisation hedgehog (SHH). Or, il a été montré que cette voie jouait un rôle très important dans le développement cellulaire et l'embryogenèse. Cette fonction permet l'explication de l'apparition des nombreux défauts de développement des patients (anomalies costales, calcification des tissus mous...). Notre étude a permis de mettre en évidence que la présence de cette mutation au niveau du gène *PTCH1* entraînait la perturbation de la réponse aux dommages de l'ADN et un effondrement du système de réparation par excision de bases (BER). Couplée à une baisse de la défense anti-oxydante, la réparation des dommages oxydatifs est donc impactée menant à l'apparition de cancers et notamment de carcinomes basocellulaires. L'instabilité génomique retrouvée par nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN au CEA d'Evry et Equipe J. LAMARTINE à Lyon) va aussi dans le sens d'une augmentation de l'apparition des cancers.

Conclusions & Perspectives

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de la dérégulation de la voie sonic hedgehog sur la réponse aux dommages de l'ADN afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à une hyper-radiosensibilité et à une prédisposition élevée aux divers cancers chez les patients Gorlin. Pour ce faire, des fibroblastes de patients atteints du syndrome de Gorlin ont été utilisés en tant que modèle d'étude. En effet, ces cellules possèdent une mutation du gène *PTCH1*, acteur essentiel de la voie SHH entraînant une activation aléatoire de cette voie de signalisation jouant un rôle primordial dans le développement cellulaire, l'embryogenèse ainsi que l'organogénèse. Les défauts au niveau du développement retrouvés chez ces patients sont donc facilement liable à cette mutation. Toutefois, les patients Gorlin souffrent aussi d'une forte prédisposition à développer des cancers et plus particulièrement des carcinomes basocellulaires. Nos travaux ont permis de mettre en évidence une perturbation de la réponse aux dommages de l'ADN passant par une sous-régulation de l'expression génique des senseurs comme ATM et ATR. Jouant un rôle fondamental dans la balance survie/mort cellulaire, l'expression de *p53* est aussi retrouvée fortement diminuée. Toutefois, l'analyse de l'apoptose n'a pas révélé de différence entre la lignée normale et les lignées Gorlin étudiées. Allant dans le sens d'une modulation de la réponse aux dommages de l'ADN, nos collaborateurs (Equipe M. MARTIN et Equipe J. LAMARTINE) ont retrouvé une dérégulation du cycle cellulaire en mettant en évidence un défaut des phases G2/M dans les cellules Gorlin. De plus, une dérégulation de la défense anti-oxydante des fibroblastes Gorlin a aussi été retrouvée. Mise en parallèle avec la baisse du système de réparation par excision de bases (BER), la réparation des dommages oxydatifs est donc impactée menant à l'apparition de cancers et notamment de carcinomes basocellulaires. Toutefois, l'étude des autres voies de réparation a aussi permis de mettre en évidence une absence de modulation de la cinétique de réparation des dimères de pyrimidines pris en charge par la voie de réparation d'excision des nucléotides (NER). Plus globalement, l'étude protéomique que nous avons pu mener nous a permis de dessiner une modulation plus globale de la physiologie cellulaire. Le métabolisme du glutathion, mais aussi la voie WnT sont retrouvés modulés dans la lignée Gorlin étudiée par rapport à la lignée contrôle. Le premier joue un rôle dans la protection cellulaire face au stress oxydant démontrant une nouvelle fois la perturbation de ce système de protection de l'intégrité cellulaire. La voie de signalisation WnT, quant à elle, joue un rôle important dans

l'embryogenèse et la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération. Ainsi, une mutation d'un des acteurs de la voie de signalisation sonic hedgehog entraîne la perturbation de la voie Wnt, allant à nouveau dans le sens de l'apparition de défaut du développement présents chez les patients Gorlin.

Cette étude a été menée sur des fibroblastes et non des kératinocytes, siège de l'apparition de ces cancers cutanés. Bien que l'importance du microenvironnement dans l'apparition des tumeurs ait été apportée par plusieurs études, il serait tout de même intéressant d'étudier la réponse moléculaire et cellulaire de ces cellules d'un point de vue basal et après exposition à des rayonnements ionisants. Ce genre d'analyse pourrait être complété par l'étude de peau reconstruite en 3 dimensions. Ce système de culture permet, en reconstruisant *in vitro* ce qu'il se passe *in vivo*, d'étudier les cellules responsables de la genèse des BCC dans leur environnement direct. Ainsi, il serait plus facile de comprendre le phénotype de prédisposition aux carcinomes basocellulaires observables chez les patients atteints du syndrome de Gorlin.

Afin de vérifier l'impact de la dérégulation de la voie BER dans les fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Gorlin, il serait intéressant de tester l'effet d'une surexpression d'un de ces acteurs, ou bien d'une des enzymes anti-oxydantes sous-exprimées. Si cette expérience permet de mettre en évidence une restauration de la sensibilité cellulaire à l'exposition aux rayonnements ionisants, alors un traitement en thérapie génique ou bien à base d'anti-oxydant pourrait être étudié pour permettre de rétablir un phénotype normal, ou tout du moins plus proche de la normale, chez les patients atteints de ce syndrome.

Une autre question qui est au cœur de ces travaux de recherche est celle des effets biologiques des faibles doses de rayonnements ionisants et le risque de cancers qui en découlent. L'étude de la survie clonale des fibroblastes Gorlin après irradiation à une faible dose révèle un accroissement de la mortalité. Cette hyper-sensibilité aux faibles doses de rayonnements ionisants n'avait encore jamais été décrite. Elle confirme le risque que courent ces individus s'ils devaient être exposés à des faibles doses dans un contexte environnemental ou médical.

Enfin, tout au long de cette étude, nous nous sommes principalement intéressés à l'effet des rayonnements ionisants γ sur les fibroblastes de patients Gorlin. Or, il a été prouvé que les rayonnements UVB et UVA, tous deux composants du spectre solaire,

menaient à l'apparition des carcinomes basocellulaires. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la réponse aux dommages de l'ADN suite à une exposition aux UVA ; nos études n'ayant pas montré de sensibilité des cellules Gorlin aux rayonnements UVB.

Pour finir, l'un des objectifs ultimes de notre laboratoire est l'identification de facteur biologique ou pharmacologique pouvant moduler les réponses aux dommages de l'ADN. La découverte de biomarqueur protéique pouvant prédire la radiosensibilité permettrait d'identifier facilement les personnes radiosensibles autorisant une meilleure adaptation des techniques d'imagerie médicale ou des traitements par radiothérapie pour ces patients afin d'éviter les effets indésirables à long terme. De plus, la découverte de ce genre de facteurs constituerait une cible thérapeutique des cancers radiorésistants comme les glioblastomes ou encore une cible préventive pour les personnes souffrant des effets indésirables de la radiothérapie. Enfin, l'identification de voies de signalisation responsables de la modulation de la réparation de l'ADN pourraient être utilisées à visée thérapeutique ou préventive contre les maladies engendrant une baisse de réparation.

Matériels & Méthodes

I - Matériels

Les lignées primaires humaines de fibroblastes utilisées lors de ces études sont des cellules provenant de l'institut Coriell pour la recherche médicale (Coriell Institute for Medical Research).

Les caractéristiques biologiques de ces lignées sont répertoriées dans le Tableau 7. Chacune des lignées Gorlin possède donc une mutation spécifique menant à la production de protéines différentes. Le positionnement des mutations au niveau du gène *PTCH1* est récapitulé sur la Figure 44.

Nom	Sexe	Age (année)	Origine	Exon affecté	Changement de nucléotide	Effet sur transcrit/ protéine	Séquence de référence
GM00730	F	45	Institut Coriell				
GM01552	M	27	Institut Coriell	Exon 1 5' UTR	c 91 del T * -258 del T	Décalage du cadre de lecture	NM1083603 NM108602
GM02098	M	31	Institut Coriell	Intron	ISV 17 +1 G>C	Erreur d'épissage	NM_000263
GM03300	F	11	Institut Coriell	Exon 8	c1168 G>A c1170 delC	Décalage du cadre de lecture	NM_000263

Tableau 7 : Caractéristiques des lignées primaires utilisées lors de cette étude. Toutes les cellules de cette étude proviennent de l'institut Coriell. Les trois lignées Gorlin possèdent une mutation au niveau du gène *PTCH1*. C'est la lignée GM01552 qui possède la mutation la plus précoce. Puis, par ordre croissant vient la lignée GM03300 et enfin, la lignée GM02098.

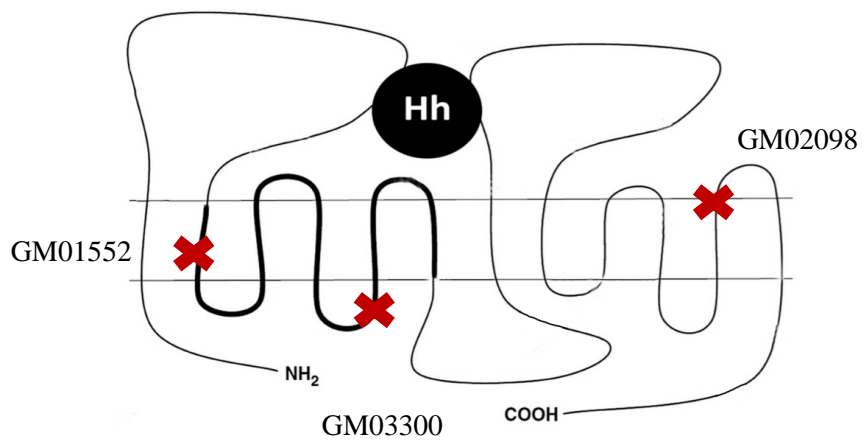


Figure 44 : Positionnement des mutations présentes au sein des lignées Gorlin de notre étude. Plus la mutation est proche du 5' terminal, plus la protéine produite sera courte.

II - Méthodes

A - Culture cellulaire

1) Passage, maintien et récolte

Les lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu DMEM Glutamax (4,5g Glu ,Pyr, Invitrogen) complémenté à 10% en Sérum de veau foétale (SVF) (HyClone , Thermo Scientific) et en 100X pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont cultivées dans des incubateurs à 37°C et enrichi à 5% en CO₂.

Afin de pouvoir garantir aux cellules suffisamment d'espaces pour leur développement et obtenir une quantité suffisante de cellules pour nos études, ces dernières sont passées une fois par semaine. Pour cela, les cellules sont d'abord rincées à l'aide de PBS (Invitrogen) puis trypsinées à l'aide de 2 mL de trypsine-EDTA (0,5 g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA ; Invitrogen). Les cellules vont alors se détacher. Puis, l'action de la trypsine est arrêtée avec du milieu de culture. Après comptage des cellules au compteur automatique (Countess - Invitrogen) ou manuellement à l'aide de lame Kova[®], les cellules sont ensemencées à raison de 1500 cellules/cm² dans de nouvelles flasques (Corning CellBind[®] - Life Technologies).

2) Conservation

Les cellules sont régulièrement congelées pour leur maintien au sein du laboratoire. Pour cela, les cellules sont trypsinées, comptées puis centrifugées à 400g pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris dans la solution de congélation (DMSO 5% + SVF) et transféré dans des cryotubes Nunc (Dutscher) à raison de 1.10⁶ cellules par tube. Les cellules sont congelées progressivement à -80°C à l'aide de bicell, puis transférées dans l'azote liquide.

Lors de la décongélation, les cellules sont reprises doucement dans du milieu de culture puis centrifugées afin de retirer le DMSO. Enfin, elles sont remises en culture dans de nouvelles flasques dans les conditions habituelles.

B - Stress cellulaire

1) Irradiation ionisante

Les cellules sont cultivées dans des flasques Corning CellBind®. Une fois à subconfluence (80 - 85% de confluence), elles sont soit non exposées (0 Gy), soit exposées à des doses d'irradiations croissantes de rayonnements gamma. (2,2 Gy/min, Co⁶⁰ ou 0,077 Gy/min, Co⁶⁰ pour la faible dose d'irradiation). L'irradiateur se situe sur le centre du CEA Grenoble, dans l'entreprise Arc Nucleart spécialisée dans la restauration du bois et des matériaux poreux. Après irradiation, les flasques sont remises à incubation jusqu'à la récolte cellulaire. Pour celles-ci, les cellules sont trypsinées comme indiqué ci-dessus. Puis, après centrifugation, les culots cellulaires sont rapidement congelés à -80°C pour l'étude de transcriptomique. Pour l'étude de protéomique, les culots seront rincés 4 fois à l'aide de PBS à 4°C avant d'être congelé à -80°C.

2) Irradiation UVA ou UVB

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures rondes de chez Beckton Dickinson. Une fois à subconfluence (80 - 85% de confluence), elles sont soit non exposées, soit exposées à des doses croissantes de rayonnements UVA ou UVB (UVA : 700L Waldmann ou UVB : VL215G irradiator, Bioblock). Après irradiation, les boîtes sont remises à incuber jusqu'à la récolte cellulaire. Pour celle-ci, les cellules sont trypsinées comme indiqué ci-dessus. Puis, après centrifugation, les culots cellulaires sont rapidement congelés à -80°C pour l'étude de transcriptomique.

3) Stress chimique

Les cellules sont cultivées dans des flasques Corning CellBind®. Une fois à subconfluence (80 - 85% de confluence), elles sont soit non exposées, soit exposées à des doses croissantes de bléomycine (Sigma-Aldrich). Après exposition, les cellules sont rincées et sont ensuite remises à incuber jusqu'à la récolte cellulaire. Les cellules

sont trypsinées comme indiqué ci-dessus. Puis, après centrifugation, les culots cellulaires seront rapidement congelés à -80°C pour l'étude de transcriptomique.

C - Caractérisation à l'aide du test de survie clonogénique

La survie cellulaire à long terme a été étudiée à l'aide du test de survie clonogénique. Les fibroblastes primaires humains sontensemencés à faibles densités (20 cellules/cm²) dans des puits de plaque 6 puits puis stressés à l'aide de différents stress physiques ou chimiques 24 h post ensemencement. Les cellules sont ensuite cultivées durant 14 jours, en changeant le milieu tous les 2 jours. Au bout de 14 jours, les colonies formées sont révélées à l'aide du cristal violet (0.5% dans H₂O/EtOH 1:1). Enfin, le comptage de chaque puits est effectué à l'œil nu deux fois.

D - Etude du phénotype réparation des fibroblastes

1) Etude transcriptomique

a. Extraction ARN

L'extraction de l'ARN total nécessite l'utilisation du kit 'GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit' (Sigma-Aldrich), suivant les recommandations du fournisseur. Rapidement, les culots cellulaires sont resuspendus soigneusement dans la solution de lyse contenant 1% de 2-mercaptoethanol. Le lysat est ensuite placé sur une colonne Gene Elute Filtration puis centrifugé 2 minutes à 15000 rpm. Un volume d'EtOH 70% est ajouté à l'éluat puis ce mélange est immédiatement placé dans une GenElute Binding Column. Chaque colonne est centrifugée 30 secondes à 15000 rpm avant d'éliminer l'éluat. Les acides nucléiques fixés sur la colonne sont rincés par ajout d'un volume de solution de lavage n°1 et une nouvelle centrifugation à 15000 rpm pendant 30 secondes est opérée. Chaque colonne reçoit ensuite 80 µL d'une solution de DNase I/Buffer RDD et est incubée à température ambiante durant 15 minutes afin de dégrader tout l'ADN présent. La DNase est éliminée par rinçage à l'aide d'un volume de tampon de lavage n°1 et une centrifugation. Puis deux rinçages à l'aide de

500 μ L de solution de lavage n°2 contenant 80% d'EtOH sont opérés. Enfin, 50 μ L de solution d'élution de l'ARN sont disposés sur chaque colonne, ce qui permet de récupérer une solution contenant l'ARN. La concentration et le taux de contamination en protéines sont dosés par mesure d'absorbance à 260 nm et 280 nm à l'aide du Nanodrop 1000. Si le rapport 260/280 est compris entre 1,7 et 2,1, la pureté de l'échantillon est acceptable en termes de contaminations de protéines. L'intégrité de l'ARN extrait est vérifiée à l'aide d'une migration sur gel d'agarose 1% dans du TBE 0,5% RNase Free. L'ARN est considéré comme intact quand 2 bandes nettes correspondant aux sous-unités 28S et 18S sont visualisables avec un rapport 2:1 en termes de quantités. Enfin, les échantillons sont conservés à -80°C .

b. Reverse Transcription

L'ARN total est reverse transcrit à l'aide du kit 'Superscript III Reverse Transcriptase' (Invitrogen) suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, 2 μ g d'ARN total sont incubés à 65°C pendant 5 minutes en présence de 100 ng de Random Primers (Promega) et 10 mM d'un mix de dNTPs (Sigma) puis incubés dans la glace pendant 1 minute. Le tampon 5X contenant 0,1 M de DTT, 45 unités d'inhibiteurs de ribonucléases (Sigma) et 200 U de reverse transcriptase III RT est alors ajouté. Le mélange est incubé à 25°C pendant 5 minutes, puis chauffé à 50°C pendant 60 minutes. Enfin, la réaction est inactivée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. Les échantillons sont stockés à -20°C .

c. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel est effectuée à l'aide du mix Takyon Low Rox (Eurogentec). Un mix contenant 10 μ L de mastermix, 2 μ L d'amorce Forward (stock à 2 μ M), 2 μ L d'amorce Reverse (stock à 2 μ M) ainsi que 3,5 μ L d'eau nucléase free est déposé dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Puis, 2,5 μ L d'ADN complémentaire à 4 ng/ μ L est déposé sur ce mix. Sur une plaque, chaque échantillon sera déposé en duplicat technique. De plus, deux contrôles sont nécessaires : l'un permettant de s'assurer de l'absence de contamination en ADN génomique ; et l'autre permettant d'indiquer une éventuelle contamination de l'eau. La plaque est

ensuite centrifugée 3 minutes à 700 rpm. Puis, elle est insérée dans le Stratagène MX3500. Le profil thermique suivant est utilisé :

- 3min à 95°C
 - 10sec à 95°C
 - 60sec à 60°C
 - 1min à 95°C
 - 30sec à 55°C
 - 30sec à 95°C
- } 40 cycles

Le gène de ménage choisi est celui de la GAPDH.

2) Etude de l'activité d'excision-resynthèse

a. Extraction des protéines nucléaires

L'extraction s'effectue à partir des culots cellulaires préalablement préparés. Il faut en moyenne 5 millions de cellules afin d'obtenir un bon rendement d'extraction. Le culot cellulaire est décongelé puis lavé à l'aide de 1 mL de PBS. Après une centrifugation de 5 minutes à 500 g, le culot cellulaire est repris dans 500 µL de tampon A (HEPES pH 7,9 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, Triton X-100 0.02%, DTT 0,5 mM, PMSF 18 µg/mL) par million de cellules. Après 20 minutes d'incubation dans la glace, le tout est vortexé durant 30 secondes puis centrifugé 5 minutes à 2300 g à 4°C. Après avoir jeté le surnageant, le culot cellulaire est repris dans 12,5 µL de tampon B (HEPES pH 7,9 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 400 mM, EDTA 0.2 mM, Glycerol 25%, DTT 0.5 mM, PMSF 18 µg/mL, antiprotease 0.7X (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)) par million de cellules. Après une incubation de 20 minutes dans la glace, deux congélations (dans l'azote liquide)-décongélations (à 4 °C) sont réalisées. Enfin, une centrifugation à 13500 g à 4 °C pendant 10 minutes est réalisée avant l'aliquotage du surnageant. Les échantillons sont conservés à -80°C.

b. Dosage des protéines nucléaires

La concentration en protéine nucléaire des extraits est déterminée à l'aide du kit 'MicroBC assay protein quantification kit' (Interchim). Ce kit utilise la méthode de l'acide bichinchonique : les protéines placées en milieu alcalin sont capables de réduire

les ions Cu^{2+} en ion Cu^+ . Le sel de sodium de l'acide bicinchoninique réagit alors avec les ions Cu^+ en formant un complexe de couleur pourpre soluble dans l'eau et présentant une forte absorption à 562 nm. Ce dosage a lieu en plaque 96 puits. Une gamme étalon est effectuée à l'aide d'une solution de BSA de concentration connue (2 mg/mL). Chacun de nos échantillons à tester est dosé à trois dilutions et déposé en duplicat sur la plaque. 100 μL de réactif MicroBC assay est ajouté au 100 μL de l'échantillon, puis incubé pendant 1 h à 60°C. Enfin, l'absorbance est mesurée à 560 nm.

c. Biopuces plasmides

Le principe de la biopuce plasmide est expliqué dans la Figure 28.

Cette technique permet d'étudier les activités d'excision-resynthèse des extraits préalablement réalisés. L'activité de réparation se traduit par l'incorporation de nucléotides fluorescents (dCTP-Cy5) au niveau du site où se situait la lésion. Sept dommages connus pour être réparés par des enzymes et/ou des voies de réparation distinctes (BER et NER) sont situés au niveau de sites prédéterminés : photoproduits, adduits psoralène, adduits de cisplatine, 8-oxoguanine, base alkylée, cytosine et thymine glycol et enfin, site abasique. Chacune de ces lésions a été contrôlée préalablement à son incorporation dans les plasmides. Trois concentrations différentes de chacune des lésions sont présentes. Les images sont acquises en scannant la biopuce à l'aide d'un scanner InnoScan710AL (Innopsys). Les données sont normalisées en utilisant le logiciel NormalizeIt.

E - Etude de la production de l'anion superoxyde

La production de l'anion superoxyde est étudiée à l'aide du MitoSOXTM (Life Technologies). Ce colorant fluorogénique cible sélectivement la mitochondrie des cellules vivantes où il sera oxydé par l'anion superoxyde mais pas par les autres ROS présents. Rapidement, les cellules sont cultivées jusqu'à subconfluence (80 - 85% de confluence). Après un rinçage à l'aide de milieu sans SVF, la solution de MitoSOXTM est ajoutée à la concentration finale de 5 μM recommandée par le fabricant. Les cellules sont incubées pendant 10 minutes puis rincées au PBS. Enfin, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences) avec les conditions

d'excitation/émission suivantes : 510/580 nm. Pour confirmer ces résultats, les cellules montées sur une lame de microscopie à l'aide de ½ glycérol , ½ d'eau et observées au microscope de fluorescence avec les mêmes conditions d'excitation et d'émission.

F - Etude de la mort cellulaire programmée

Le marquage des cellules vivantes s'effectue à l'aide du kit 'Annexin V-Iodure de Propidium' de chez Life Technologies. Dans un premier temps, les cellules sont trypsinées comme indiqué ci-dessus, puis centrifugées. Le culot obtenu est lavé au PBS. Les cellules sont alors resuspendues à raison de 1.10^6 cellules/mL dans du tampon. Puis, la suspension cellulaire est incubée dans un mix contenant l'annexin V et l'iodure de propidium. Après 15 minutes d'incubation dans le noir et à température ambiante, du tampon est ajouté afin de stopper la réaction. Enfin, les cellules sont analysées par FACS (Facsalibur, BD Biosciences) en excitant à 488 nm. L'émission est regardée à 530 nm et 570 nm. Afin de vérifier les résultats obtenus par cette technique, les cellules sont dans un second temps montées sur une lame de microscopie à l'aide de ½ glycérol ,1/2 d'eau et observées au microscope de fluorescence avec les mêmes conditions d'excitation et d'émission.

G - Etude protéomique et validation de gènes

1) Etude protéomique

Cette étude protéomique a été effectuée à l'Institut de Biologie et de Pathologie de Grenoble (IBP), au niveau de la plateforme Prométhée dirigé par M. SEVE.

a. Extraction des protéines totales

Afin de procéder à l'extraction des protéines totales de nos culots cellulaires, ces derniers sont lysés 5 minutes à 95°C dans une solution contenant 4% SDS dans 0.1M Tris-HCl, pH 7.6. Après une bref sonication pour s'assurer de la bonne lyse, une centrifugation à 14000 g pendant 10 minutes est effectuée. Le dosage des protéines est

effectué à l'aide du kit BCA protein assay (Thermo fischer). Afin de réduire les cystéines, du dithiothréitol (DTT) est ajouté à une concentration finale de 0,1 M.

b. Digestion protéique

Les protéines sont digérées à l'aide de la trypsine en utilisant un protocole de préparation du protéome décrit par Rideau *et al.* (239). Brièvement, le lysat protéique est déposé sur des colonnes de filtration YM-30 microcon (MRCF0R030, Millipore), centrifugé et rincé trois fois à l'aide d'une solution d'urée 8 M dans 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5. Puis, 12 mM final de methanethiosulfonate est ajouté sur les filtres. Les échantillons sont ensuite incubés 20 minutes à température ambiante sous agitation à 500 rpm. Les filtres sont ensuite rincés trois fois avec une solution d'urée 8 M dans 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 ; puis à nouveau trois fois avec une solution de 0,5 M de triéthylammonium bicarbonate. Finalement, la trypsine-lysine C (Promega) dans du tampon 0,5 M TEAB est ajouté sur chaque filtre avec un ratio protéine/enzyme de 40/1. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C sur la nuit. Les peptides issus de la digestion sont récupérés par centrifugation. Après séchage, ces derniers sont resuspendus dans une solution de 1% acétonitrile ; 0,5% acide trifluoroacétique et dessalés à l'aide d'une colonne Pierce® C-18 (Thermo Scientific). A nouveau, la concentration en peptides est déterminée à l'aide du kit BCA protein assay (Thermo fischer).

c. Marquage à l'iTRAQ

Les échantillons sont marqués à l'aide du kit de réactif iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) contenant 8 solutions de marquages en suivant les instructions du fournisseur (iTRAQ Reagents 8 plex Applications kit ; AB Sciex). En bref, chaque solution peptidique est incubée 2 heures à température ambiante avec l'un des réactifs iTRAQ. Après le marquage, les échantillons sont poolés avec un ratio 1/1 afin d'obtenir un total de 600 µg de peptides.

d. Isoélectrofocalisation des peptides par offgel

La séparation des peptides en fonction de leur point isoélectrique a été réalisée à l'aide du kit OFFGEL linear pH 3-10 (Agilent Technology) sur un 3100 OFFGEL en suivant

les instructions du fournisseur. Brièvement, le mélange de peptides marqués à l'étape précédente est séché puis resuspendu dans le tampon fourni par le fabricant et déposé dans les puits de l'appareil d'électrofocalisation. Un courant constant de 50 μ A et maximum 8000 V a été utilisé pour cette étape. Une fois le fractionnement complet, les échantillons peptidiques ont été récupérés de chaque puits, puis séchés et dessalés à l'aide de colonne C18 ZipTips (Millipore).

e. Chromatographie liquide en phase inverse

A nouveau, une séparation des peptides est effectuée à l'aide du système de chromatographie liquide en phase inverse (RP-nanoLC) (Ultimate 3000, Dionex, Thermo Scientifique) contrôlé par le logiciel Chromeleon (version 6.80 ; Dionex, Thermo Scientifique) et couplé à un maldi PROBOT contrôlé par le logiciel μ Carrier 2.0 (Dionex, Thermo Scientifique) autorisant le dépôt de la solution en spot. Les fractions préalablement séchées et désalées ont été remises en suspension dans de l'eau contenant 0,1% de TFA et injectées sur une précolonne (C18, 5 μ M, taille des pores : 100 Å ; LC Packings) dans 2% d'acétonitrile (ACN) ; 0,05% de TFA pendant 3 min à un débit de 20 μ L / min. Puis, les peptides piégés ont été séparés par chromatographie en phase inverse (Acclaim PepMap RSLC 75 μ m, 15 cm, nanoViper C18, 2 μ m, 100 une taille de pores ; Thermo Scientifique) avec un gradient de tampon A (0,05% de TFA) et tampon B (80% d'ACN ; 0,04% de TFA) à un débit de 0,3 μ L / min. Le gradient a été mis en place comme suit: 5-55 min, 12-46% de B ; 55-60 min, 46-62% de B ; et 60-70 min, 94% des fractions B. Enfin, les peptides ont été déposés sur une plaque d'échantillon MALDI (AB Sciex) à une fréquence de un point par 15 secondes. La matrice d'acide L α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (2 mg / ml dans 70% d'ACN ; 0,1% de TFA) a été ajoutée en continu à l'effluent de la colonne à un débit de 0,9 μ L / min et, par conséquent, intégrée dans chaque spot des plaques MALDI préparées. Chaque échantillon a été spotté sur deux plaques différentes et sera donc analysé en double.

f. Analyse par MALDI TOF-TOF

Les analyses par spectrométrie de masse et spectrométrie de masse en tandem ont été réalisées en utilisant le MALDI TOF/TOF Analyseur 4800 (AB Sciex) contrôlée par le logiciel Explorer Series 4000 (version 3.5). L'instrument a été utilisé en mode réflecteur

positif et calibré en utilisant le mix standard d'étalonnage de Brucker (Brucker Daltonics). Les spectres ont été acquis avec un ratio masse/nombre d'ions (m/z) dans la gamme des 700-4000. La tolérance sur la masse peptidique a été fixée à 50 ppm. Jusqu'à 30 des ions les plus intenses caractérisés par un ratio signal sur bruit supérieur à 25 de chaque spot ont été sélectionnés en tant que précurseurs de la fragmentation en utilisant le mode CID (Collision Induced Dissociation) pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem.

g. Analyse des données

Le logiciel ProteinPilot™ (version 4.5) avec l'algorithme Paragon™ a été utilisé pour l'identification et la quantification relative des peptides et des protéines. Chaque spectre MS/MS a été confronté à la base de donnée humaine UniProtKB (2014_02 /Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute)). L'effort de recherche a été mis sur 'Thorough ID' et le taux de faux positif (False Discovery Rate Analysis, FDR) a été fixé à 1%. Seules les protéines quantifiées avec au moins un peptide à 95% de confiance ont été incluses. Le logiciel PathwayStudio a été utilisé pour l'étude par gene ontology.

2) Etude par western blot

Une analyse par western blot a aussi été conduite afin de quantifier les protéines présentes dans les extraits protéiques. Brièvement, 20 µg de chaque échantillon est mélangé à du bleu de Laemli puis chauffé à 90°C pendant 10 minutes afin de dénaturer les protéines. Ces échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide TGX stain free (Bio-Rad) (le pourcentage résolutif dépend de la taille de la protéine d'intérêt) et mis à migrer à 150 V durant 1h30. Puis, le transfert des protéines sur une membrane est effectué à l'aide du Trans-Blot® Turbo™ Transfert System (100-240 VAC, 50-60 Hz, Max Power 276 VA, 250 V T 6,3 A). Après une étape de blocage de la membrane pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans du TBS 1X/Tween-20 0,5%, Lait lyophilisé 5%, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire sur la nuit. Après trois rinçages de 5 minutes à l'aide de TBS 1X/Tween-20 0,5%, la membrane est incubée 1 heure dans l'anticorps secondaire dilué dans du TBS 1X/Tween-20 0,5%, Lait lyophilisé 5%. A nouveau, la membrane est rincée trois fois à l'aide de TBS

1X/Tween-20 0,5%, puis l'étape de révélation s'effectue à l'aide du kit clarity Western ECL (Bio-Rad) grâce au Chemi-doc XRS+ system (Bio-Rad).

H - Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du test de Student après avoir vérifié l'homogénéité des variances à l'aide du test de Levens. L'analyse de la variance par Anova à un facteur a aussi été utilisée. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque la p value était inférieure à 0,05.

Bibliographie

1. Dahm R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol*; **278**: 274-88.
2. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*; **171**: 737-8.
3. Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*; **40**: 179-204.
4. Lord CJ, Ashworth A (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*; **481**: 287-94.
5. Davies KJ (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*; **61**: 1-31.
6. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*; **408**: 239-47.
7. Frelon S, Douki T, Favier A, Cadet J (2003) Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*; **16**: 191-7.
8. de Boer J, Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*; **21**: 453-60.
9. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*; **424**: 9-21.
10. Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*; **1**: 22-33.
11. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*; **411**: 366-74.
12. Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology*; **279**: 36-44.
13. Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, et al. (1990) Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*; **29**: 5872-80.
14. du Puch CB, Barbier E, Sauvaigo S, Gasparutto D, Breton J Tools and strategies for DNA damage interactome analysis. *Mutat Res*; **752**: 72-83.
15. Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC (2007) Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*; **81**: 495-504.
16. Cadet J, Sage E, Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res*; **571**: 3-17.
17. Ridley AJ, Whiteside JR, McMillan TJ, Allinson SL (2009) Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*; **85**: 177-95.
18. Foote CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*; **54**: 659.
19. Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (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.

20. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (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.
21. Albanese J, Dainiak N (2003) Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation. *Exp Hematol*; **31**: 455-64.
22. Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; **35**: 95-125.
23. Ravanat JL, Douki T, Cadet J (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*; **63**: 88-102.
24. Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*; **28**: 739-45.
25. Chou DM, Adamson B, Dephoure NE, Tan X, Nottke AC, Hurov KE, et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **107**: 18475-80.
26. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, et al. (2007) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem*; **282**: 16441-53.
27. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*; **417**: 639-50.
28. Stracker TH, Usui T, Petrini JH (2009) Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*; **8**: 1047-54.
29. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*; **358**: 15-6.
30. Poehlmann A, Roessner A (2010) Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract*; **206**: 591-601.
31. Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol*; **35**: 461-78.
32. Schwartz GK, Shah MA (2005) Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*; **23**: 9408-21.
33. Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*; **246**: 629-34.
34. Kruse JJ, Svensson JP, Huigsloot M, Giphart-Gassler M, Schoonen WG, Polman JE, et al. (2007) A portrait of cisplatin-induced transcriptional changes in mouse embryonic stem cells reveals a dominant p53-like response. *Mutat Res*; **617**: 58-70.
35. Derks KW, Hoeijmakers JH, Pothof J The DNA damage response: the omics era and its impact. *DNA Repair (Amst)*; **19**: 214-20.
36. Garinis GA, Mitchell JR, Moorhouse MJ, Hanada K, de Waard H, Vandeputte D, et al. (2005) Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *EMBO J*; **24**: 3952-62.
37. Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, Lerenthal Y, Linhart C, Kupershtein A, et al. Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Mol Oncol*; **5**: 336-48.

38. Chaudhary AK, Yadav N, Bhat TA, O'Malley J, Kumar S, Chandra D A potential role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in mitochondrial membrane permeabilization and its implication in cancer therapy. *Drug Discov Today*;
39. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*; **193**: 3-34.
40. Plesca D, Mazumder S, Almasan A (2008) DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol*; **446**: 107-22.
41. Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, et al. (1999) The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol*; **147**: 809-22.
42. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **15**: 269-90.
43. Batista LF, Roos WP, Kaina B, Menck CF (2009) p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res*; **7**: 237-46.
44. Bitomsky N, Hofmann TG (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J*; **276**: 6074-83.
45. Millau JF, Bastien N, Drouin R (2009) P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res*; **681**: 118-33.
46. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*; **7**: 673-82.
47. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*; **288**: 1053-8.
48. Weng L, Brown J, Eng C (2001) PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet*; **10**: 237-42.
49. Parsons JL, Dianov GL Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)*; **12**: 326-33.
50. Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ (2005) Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*; **5**: 89-108.
51. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T (2011) DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*; **94**: 166-200.
52. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*; **66**: 981-93.
53. Caldecott KW (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*; **9**: 619-31.
54. Almeida KH, Sobol RW (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*; **6**: 695-711.
55. Gillet LC, Scharer OD (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*; **106**: 253-76.
56. Mocquet V, Laine JP, Riedl T, Yajin Z, Lee MY, Egly JM (2008) Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step. *EMBO J*; **27**: 155-67.

57. Svejstrup JQ (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **3**: 21-9.
58. Maillard O, Camenisch U, Blagoev KB, Naegeli H (2008) Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair. *Mutat Res*; **658**: 271-86.
59. Emmert S, Schneider TD, Khan SG, Kraemer KH (2001) The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*; **29**: 1443-52.
60. Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, et al. (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*; **177**: 219-29.
61. Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*; **18**: 114-24.
62. Costantini S, Woodbine L, Andreoli L, Jeggo PA, Vindigni A (2007) Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair (Amst)*; **6**: 712-22.
63. Lieber MR NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol*; **17**: 393-5.
64. Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenailon O, Acquaviva C, Sayada C, et al. (2000) Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell*; **103**: 711-21.
65. Valerie K, Povirk LF (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*; **22**: 5792-812.
66. Jun SH, Kim TG, Ban C (2006) DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J*; **273**: 1609-19.
67. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*; **461**: 1071-8.
68. Pollard JM, Gatti RA (2009) Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; **74**: 1323-31.
69. Knoch J, Kamenisch Y, Kubisch C, Berneburg M (2012) Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. *Eur J Dermatol*; **22**: 443-55.
70. Kerzendorfer C, O'Driscoll M (2009) Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA Repair (Amst)*; **8**: 1139-52.
71. Desai-Mehta A, Cerosaletti KM, Concannon P (2001) Distinct functional domains of nibrin mediate Mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol*; **21**: 2184-91.
72. Spivak G, Itoh T, Matsunaga T, Nikaido O, Hanawalt P, Yamaizumi M (2002) Ultraviolet-sensitive syndrome cells are defective in transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *DNA Repair (Amst)*; **1**: 629-43.
73. Cleaver JE, Lam ET, Revet I (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*; **10**: 756-68.
74. Jarisch W (1894) Zur lehre von der hautgeschwulsten. . *Arch Dermatol Syphi*; **28**: 163-222:

75. White J (1894) Multiple benign cystic epitheliomas. . *J Cutan Genitourin Dis*; **12**:477-84:
76. Straith F (1894) Hereditary epidermoid cyst of the jaws. . *J Cutan Genitourin* **12**:477-84:
77. Binkley GW, Johnson HH, Jr. (1951) Epithelioma adenoides cysticum; basal cell nevi, agenesis of the corpus callosum and dental cysts; a clinical and autopsy study. *AMA Arch Derm Syphilol*; **63**: 73-84.
78. Gorlin RJ, Goltz RW (1960) Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*; **262**: 908-12.
79. Rayner CR, Towers JF, Wilson JS (1977) What is Gorlin's syndrome? The diagnosis and management of the basal cell naevus syndrome, based on a study of thirty-seven patients. *Br J Plast Surg*; **30**: 62-7.
80. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA (1993) Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet*; **30**: 460-4.
81. Lo Muzio L, Nocini PF, Savoia A, Consolo U, Procaccini M, Zelante L, et al. (1999) Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Clinical findings in 37 Italian affected individuals. *Clin Genet*; **55**: 34-40.
82. Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, Haan E, Oley C, Ravine D, et al. (1994) Nevoid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet*; **50**: 282-90.
83. Lo Muzio L (2008) Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*; **3**: 32.
84. Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, et al. (1997) Most germline mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. *Am J Hum Genet*; **60**: 21-6.
85. Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, DiGiovanna JJ, et al. (1997) Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*; **69**: 299-308.
86. Ortega Garcia de Amezaga A, Garcia Arregui O, Zepeda Nuno S, Acha Sagredo A, Aguirre Urizar JM (2008) Gorlin-Goltz syndrome: clinicopathologic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; **13**: E338-43.
87. Fujii K, Miyashita T (2014) Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): update and literature review. *Pediatr Int*; **56**: 667-74.
88. Morgan TA, Burton CC, Qian F (2005) A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg*; **63**: 635-9.
89. Kimonis VE, Singh KE, Zhong R, Pastakia B, Digiovanna JJ, Bale SJ Clinical and radiological features in young individuals with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Genet Med*; **15**: 79-83.
90. Yu FY, Hong YY, Qu JF, Chen F, Li TJ (2014) The large intracellular loop of ptch1 mediates the non-canonical Hedgehog pathway through cyclin B1 in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Int J Mol Med*; **34**: 507-12.
91. Wallin JL, Tanna N, Misra S, Puri PK, Sadeghi N (2007) Sinonasal carcinoma after irradiation for medulloblastoma in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Otolaryngol*; **28**: 360-2.

92. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K, et al. (2012) Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med*; **366**: 2180-8.
93. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*; **272**: 1668-71.
94. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*; **85**: 841-51.
95. Farndon PA, Del Mastro RG, Evans DG, Kilpatrick MW (1992) Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet*; **339**: 581-2.
96. Reis A, Kuster W, Linss G, Gebel E, Hamm H, Fuhrmann W, et al. (1992) Localisation of gene for the naevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Lancet*; **339**: 617.
97. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, et al. (1992) Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*; **69**: 111-7.
98. Athar M, Tang X, Lee JL, Kopelovich L, Kim AL (2006) Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol*; **15**: 667-77.
99. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*; **384**: 129-34.
100. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ (1996) Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*; **384**: 176-9.
101. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, et al. (2002) Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet*; **110**: 297-301.
102. Lindstrom E, Shimokawa T, Toftgard R, Zaphiropoulos PG (2006) PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat*; **27**: 215-9.
103. Fan Z, Li J, Du J, Zhang H, Shen Y, Wang CY, et al. (2008) A missense mutation in PTCH2 underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *J Med Genet*; **45**: 303-8.
104. Smith MJ, Beetz C, Williams SG, Bhaskar SS, O'Sullivan J, Anderson B, et al. Germline mutations in SUFU cause Gorlin syndrome-associated childhood medulloblastoma and redefine the risk associated with PTCH1 mutations. *J Clin Oncol*; **32**: 4155-61.
105. Rui Z, Li-Ying P, Jia-Fei Q, Ying-Ying H, Feng C, Tie-Jun L Smoothened gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *Head Face Med*; **10**: 36.
106. Brellier F, Bergoglio V, Valin A, Barnay S, Chevallier-Lagente O, Vielh P, et al. (2008) Heterozygous mutations in the tumor suppressor gene PATCHED provoke basal cell carcinoma-like features in human organotypic skin cultures. *Oncogene*; **27**: 6601-6.
107. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature*; **287**: 795-801.
108. Mohler J (1988) Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of Drosophila. *Genetics*; **120**: 1061-72.
109. Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y (1991) Role of the Drosophila patched gene in positional signalling. *Nature*; **353**: 184-7.

110. Lee JJ, von Kessler DP, Parks S, Beachy PA (1992) Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell*; **71**: 33-50.
111. Mohler J, Vani K (1992) Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development*; **115**: 957-71.
112. Tashiro S, Michiue T, Higashijima S, Zenno S, Ishimaru S, Takahashi F, et al. (1993) Structure and expression of hedgehog, a *Drosophila* segment-polarity gene required for cell-cell communication. *Gene*; **124**: 183-9.
113. Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*; **15**: 3059-87.
114. Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, et al. (1995) Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics*; **28**: 44-51.
115. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*; **75**: 1401-16.
116. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*; **75**: 1417-30.
117. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW (1993) A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*; **75**: 1431-44.
118. Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*; **135**: 2489-503.
119. Chang DT, Lopez A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, et al. (1994) Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*; **120**: 3339-53.
120. Johnson RL, Riddle RD, Laufer E, Tabin C (1994) Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem Soc Trans*; **22**: 569-74.
121. Trowbridge JJ, Scott MP, Bhatia M (2006) Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **103**: 14134-9.
122. Petrova R, Joyner AL Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*; **141**: 3445-57.
123. Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui C (1998) Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet*; **18**: 104-6.
124. Varjosalo M, Taipale J (2008) Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*; **22**: 2454-72.
125. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, et al. (1999) Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*; **99**: 803-15.
126. Burke R, Basler K (1997) Hedgehog signaling in *Drosophila* eye and limb development - conserved machinery, divergent roles? *Curr Opin Neurobiol*; **7**: 55-61.
127. Therond PP Release and transportation of Hedgehog molecules. *Curr Opin Cell Biol*; **24**: 173-80.

128. Yao E, Chuang PT (2015) Hedgehog signaling: From basic research to clinical applications. *J Formos Med Assoc*;
129. Hassounah NB, Bunch TA, McDermott KM (2012) Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin Cancer Res*; **18**: 2429-35.
130. Rubin LL, de Sauvage FJ (2006) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*; **5**: 1026-33.
131. Hui CC, Angers S (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **27**: 513-37.
132. Adolphe C, Hetherington R, Ellis T, Wainwright B (2006) Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Res*; **66**: 2081-8.
133. Binns W, James LF, Shupe JL, Everett G (1963) A Congenital Cyclopiantype Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, *Veratrum Californicum*. *Am J Vet Res*; **24**: 1164-75.
134. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, et al. (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*; **406**: 1005-9.
135. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A (2010) Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem*; **18**: 6613-24.
136. Gorojankina T, Hoch L, Faure H, Roudaut H, Traiffort E, Schoenfelder A, et al. Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothed. *Mol Pharmacol*; **83**: 1020-9.
137. Bragina O, Sergejeva S, Serg M, Zarkovsky T, Maloverjan A, Kogerman P, et al. Smoothed agonist augments proliferation and survival of neural cells. *Neurosci Lett*; **482**: 81-5.
138. Liu H, Gu D, Xie J (2011) Clinical implications of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Chin J Cancer*; **30**: 13-26.
139. Miao N, Wang M, Ott JA, D'Alessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, et al. (1997) Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult In vitro. *J Neurosci*; **17**: 5891-9.
140. Charrier JB, Lapointe F, Le Douarin NM, Teillet MA (2001) Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development*; **128**: 4011-20.
141. Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science*; **301**: 843-6.
142. Mehlen P (2003) [Patched is a dependence receptor]. *Med Sci (Paris)*; **19**: 1062.
143. Kenney AM, Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol*; **20**: 9055-67.
144. Roy S, Ingham PW (2002) Hedgehogs tryst with the cell cycle. *J Cell Sci*; **115**: 4393-7.
145. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet*; **14**: 353-6.

146. Hill RE, Heaney SJ, Lettice LA (2003) Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. *J Anat*; **202**: 13-20.
147. Teglund S, Toftgard R Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*; **1805**: 181-208.
148. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. (1998) Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*; **391**: 90-2.
149. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB (2006) Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol*; **208**: 17-25.
150. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, et al. (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*; **425**: 846-51.
151. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, et al. (2007) Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*; **13**: 944-51.
152. Hegde GV, Peterson KJ, Emanuel K, Mittal AK, Joshi AD, Dickinson JD, et al. (2008) Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*; **6**: 1928-36.
153. Hwa C, Bauer EA, Cohen DE (2012) Skin biology. *Dermatol Ther*; **24**: 464-70.
154. Wysocki AB (1999) Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*; **34**: 777-97, v.
155. Whiteman DC Testing the divergent pathway hypothesis for melanoma: recent findings and future challenges. *Expert Rev Anticancer Ther*; **10**: 615-8.
156. Navarrete-Dechent C, Veness MJ, Droppelmann N, Uribe P High-risk cutaneous squamous cell carcinoma and the emerging role of sentinel lymph node biopsy: A literature review. *J Am Acad Dermatol*; **73**: 127-37.
157. Epstein EH (2008) Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*; **8**: 743-54.
158. Situm M, Buljan M, Bulat V, Lugovic Mihic L, Bolanca Z, Simic D (2008) The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Coll Antropol*; **32 Suppl 2**: 167-70.
159. de Zwaan SE, Haass NK (2010) Genetics of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol*; **51**: 81-92; quiz 3-4.
160. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, et al. (1996) The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*; **14**: 78-81.
161. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, et al. (2005) Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*; **152**: 43-51.
162. Reifemberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, et al. (1998) Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*; **58**: 1798-803.
163. D'Errico M, Calcagnile A, Iavarone I, Sera F, Baliva G, Chinni LM, et al. (1999) Factors that influence the DNA repair capacity of normal and skin cancer-affected individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; **8**: 553-9.

164. Tanori M, Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S, Rebessi S, Di Majo V, et al. (2008) PARP-1 cooperates with Ptc1 to suppress medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Carcinogenesis*; **29**: 1911-9.
165. Tanori M, Santone M, Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S, Di Majo V, et al. (2010) Developmental and oncogenic effects of insulin-like growth factor-I in Ptc1^{+/-} mouse cerebellum. *Mol Cancer*; **9**: 53.
166. Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR (2002) The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res*; **62**: 152-5.
167. El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*; **31**: 5526-33.
168. Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH, Jr., Scott MP (1997) Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science*; **276**: 817-21.
169. Daya-Grosjean L, Couve-Privat S (2005) Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett*; **225**: 181-92.
170. Valin A, Barnay-Verdier S, Robert T, Ripoché H, Brellier F, Chevallier-Lagente O, et al. (2009) PTCH1 ^{+/-} dermal fibroblasts isolated from healthy skin of Gorlin syndrome patients exhibit features of carcinoma associated fibroblasts. *PLoS One*; **4**: e4818.
171. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*; **432**: 332-7.
172. Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, Magrane G, Gray JW, Carey L, et al. (2004) Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**: 4966-71.
173. Featherstone T, Taylor AM, Harnden DG (1983) Studies on the radiosensitivity of cells from patients with basal cell naevus syndrome. *Am J Hum Genet*; **35**: 58-66.
174. Chan GL, Little JB (1983) Cultured diploid fibroblasts from patients with the nevoid basal cell carcinoma syndrome are hypersensitive to killing by ionizing radiation. *Am J Pathol*; **111**: 50-5.
175. Arlett CF, Priestley A (1984) Deficient recovery from potentially lethal damage in some gamma-irradiated human fibroblast cell strains. *Br J Cancer Suppl*; **6**: 227-32.
176. Lehmann AR, Kirk-Bell S, Arlett CF, Harcourt SA, de Weerd-Kastelein EA, Keijzer W, et al. (1977) Repair of ultraviolet light damage in a variety of human fibroblast cell strains. *Cancer Res*; **37**: 904-10.
177. Applegate LA, Goldberg LH, Ley RD, Ananthaswamy HN (1990) Hypersensitivity of skin fibroblasts from basal cell nevus syndrome patients to killing by ultraviolet B but not by ultraviolet C radiation. *Cancer Res*; **50**: 637-41.
178. Little JB, Nichols WW, Troilo P, Nagasawa H, Strong LC (1989) Radiation sensitivity of cell strains from families with genetic disorders predisposing to radiation-induced cancer. *Cancer Res*; **49**: 4705-14.
179. Brellier F, Valin A, Chevallier-Lagente O, Gorry P, Avril MF, Magnaldo T (2008) Ultraviolet responses of Gorlin syndrome primary skin cells. *Br J Dermatol*; **159**: 445-52.
180. Nagasawa H, Burke MJ, Little FF, McCone EF, Chan GL, Little JB (1988) Multiple abnormalities in the ultraviolet light response of cultured fibroblasts derived from patients with the basal cell nevus syndrome. *Teratog Carcinog Mutagen*; **8**: 25-33.

181. Shafei-Benaissa E, Savage JR, Babin P, Larregue M, Papworth D, Tanzer J, et al. (1998) The naevoid basal-cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome) is a chromosomal instability syndrome. *Mutat Res*; **397**: 287-92.
182. Timins JK Communication of benefits and risks of medical radiation: a historical perspective. *Health Phys*; **101**: 562-5.
183. Yonehara S, Brenner AV, Kishikawa M, Inskip PD, Preston DL, Ron E, et al. (2004) Clinical and epidemiologic characteristics of first primary tumors of the central nervous system and related organs among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1958-1995. *Cancer*; **101**: 1644-54.
184. Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, et al. (2003) Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**: 13761-6.
185. Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T (2001) Quantification of late complications after radiation therapy. *Radiother Oncol*; **61**: 233-46.
186. Puck TT, Cieciora SJ, Fisher HW (1957) Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology; comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast-like cells from a variety of human organs. *J Exp Med*; **106**: 145-58.
187. Bjork-Eriksson T, West C, Nilsson A, Magnusson B, Svensson M, Karlsson E, et al. (1999) The immunohistochemical expression of DNA-PKCS and Ku (p70/p80) in head and neck cancers: relationships with radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; **45**: 1005-10.
188. Joubert A, Zimmerman KM, Bencokova Z, Gastaldo J, Chavaudra N, Favaudon V, et al. (2008) DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int J Radiat Biol*; **84**: 107-25.
189. Hennequin C, Quero L, Favaudon V (2008) [Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]. *Cancer Radiother*; **12**: 3-13.
190. Deschavanne PJ, Fertil B (1996) A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; **34**: 251-66.
191. Joubert A, Foray N (2007) [Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]. *Cancer Radiother*; **11**: 129-42.
192. Suzuki K, Yamashita S Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. *Jpn J Clin Oncol*; **42**: 563-8.
193. Surtees JA, Argueso JL, Alani E (2004) Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res*; **107**: 146-59.
194. Soderlund K, Stal O, Skoog L, Rutqvist LE, Nordenskjold B, Askmalms MS (2007) Intact Mre11/Rad50/Nbs1 complex predicts good response to radiotherapy in early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; **68**: 50-8.
195. Cun Y, Dai N, Xiong C, Li M, Sui J, Qian C, et al. (2013) Silencing of APE1 enhances sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to radiotherapy in vitro and in a xenograft model. *PLoS One*; **8**: e55313.
196. Fernet M, Hall J (2004) Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair (Amst)*; **3**: 1237-43.
197. Angelini S, Kumar R, Carbone F, Maffei F, Forti GC, Violante FS, et al. (2005) Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res*; **570**: 105-17.

198. Pugh TJ, Keyes M, Barclay L, Delaney A, Krzywinski M, Thomas D, et al. (2009) Sequence variant discovery in DNA repair genes from radiosensitive and radiotolerant prostate brachytherapy patients. *Clin Cancer Res*; **15**: 5008-16.
199. Millau JF, Raffin AL, Caillat S, Claudet C, Arras G, Ugolin N, et al. (2008) A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip*; **8**: 1713-22.
200. Gus'kova RA, Ivanov, II, Kol'tover VK, Akhobadze VV, Rubin AB (1984) [Permeability of bilayer phospholipid membranes to superoxide oxygen radicals]. *Biokhimiia*; **49**: 758-66.
201. Huang XX, Scolyer RA, Abubakar A, Halliday GM (2012) Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase-1 is downregulated in human basal cell carcinoma. *Mol Genet Metab*; **106**: 127-30.
202. Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, et al. (2000) Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res*; **60**: 4740-4.
203. An Q, Robins P, Lindahl T, Barnes DE (2005) C --> T mutagenesis and gamma-radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases. *EMBO J*; **24**: 2205-13.
204. Naidu MD, Mason JM, Pica RV, Fung H, Pena LA Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1. *J Radiat Res*; **51**: 393-404.
205. Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, et al. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*; **379**: 183-6.
206. Labudova O, Hardmeier R, Kitzmuller E, Rink H, Lubec G (1998) Transcription of the XRCC1 gene in kidneys of radiosensitive and radioresistant mice following whole-body irradiation. *Nephron*; **79**: 61-6.
207. Hu L, Wu QQ, Wang WB, Jiang HG, Yang L, Liu Y, et al. Suppression of Ku80 correlates with radiosensitivity and telomere shortening in the U2OS telomerase-negative osteosarcoma cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*; **14**: 795-9.
208. Kuroda S, Urata Y, Fujiwara T (2012) Ataxia-telangiectasia mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 complex: promising targets for radiosensitization. *Acta Med Okayama*; **66**: 83-92.
209. Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*; **15**: 2177-96.
210. Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*; **14**: 397-402.
211. O'Driscoll M (2009) Mouse models for ATR deficiency. *DNA Repair (Amst)*; **8**: 1333-7.
212. Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y (2002) ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*; **1**: 3-25.
213. Shiloh Y (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*; **11**: 71-7.
214. Wright AT, Magnaldo T, Sontag RL, Anderson LN, Sadler NC, Piehowski PD, et al. Deficient expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 is consistent with increased sensitivity of Gorlin syndrome patients to radiation carcinogenesis. *Mol Carcinog*; **54**: 473-84.
215. Selenius M, Hedman M, Brodin D, Gandin V, Rigobello MP, Flygare J, et al. Effects of redox modulation by inhibition of thioredoxin reductase on radiosensitivity and gene expression. *J Cell Mol Med*; **16**: 1593-605.

216. Biaglow JE, Ayene IS, Koch CJ, Donahue J, Stamato TD, Mieyal JJ, et al. (2003) Radiation response of cells during altered protein thiol redox. *Radiat Res*; **159**: 484-94.
217. Winkler T, Mahoney EJ, Sinner D, Wylie CC, Dahia CL Wnt signaling activates Shh signaling in early postnatal intervertebral discs, and re-activates Shh signaling in old discs in the mouse. *PLoS One*; **9**: e98444.
218. Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT (2000) Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97**: 4520-4.
219. Nagasawa H, Little JB, Tsang NM, Saunders E, Tesmer J, Strniste GF (1992) Effect of dose rate on the survival of irradiated human skin fibroblasts. *Radiat Res*; **132**: 375-9.
220. Kis E, Baltas E, Kinyo A, Varga E, Nagy N, Gyulai R, et al. Successful treatment of multiple basalomas with bleomycin-based electrochemotherapy: a case series of three patients with Gorlin-Goltz syndrome. *Acta Derm Venereol*; **92**: 648-51.
221. McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*; **244**: 6056-63.
222. Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*; **219**: 1-14.
223. von Sonntag C (2008) Advanced oxidation processes: mechanistic aspects. *Water Sci Technol*; **58**: 1015-21.
224. Henle ES, Luo Y, Gassmann W, Linn S (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. *J Biol Chem*; **271**: 21177-86.
225. Madesh M, Hajnoczky G (2001) VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol*; **155**: 1003-15.
226. Bhakat KK, Mantha AK, Mitra S (2009) Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. *Antioxid Redox Signal*; **11**: 621-38.
227. Lu J, Holmgren A The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*; **66**: 75-87.
228. Pisoschi AM, Pop A The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*; **97**: 55-74.
229. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, et al. (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*; **34**: 496-502.
230. 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**: 4305-15.
231. Ray A, Milum K, Battu A, Wani G, Wani AA NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. *DNA Repair (Amst)*; **12**: 273-83.
232. Wang QE, Han C, Zhang B, Sabapathy K, Wani AA Nucleotide excision repair factor XPC enhances DNA damage-induced apoptosis by downregulating the antiapoptotic short isoform of caspase-2. *Cancer Res*; **72**: 666-75.
233. Angers S, Moon RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **10**: 468-77.

234. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer*; **12**: 818-34.
235. Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*; **78**: 399-434.
236. Xie CM, Wei W, Sun Y Role of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases in skin cancer. *J Genet Genomics*; **40**: 97-106.
237. Bonifas JM, Pennypacker S, Chuang PT, McMahon AP, Williams M, Rosenthal A, et al. (2001) Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol*; **116**: 739-42.
238. Katoh M (2009) Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. *Int J Oncol*; **34**: 1411-5.
239. Rideau A, Besson D, Boissard A, Coqueret O, Guette C Two-step OFFGEL approach for effective peptide separation compatible with iTRAQ labeling. *Proteomics*; **13**: 3261-6.

Annexes

Annexe 1

Tableau représentant les protéines sur-exprimées dans la lignée GM01552 par rapport à la lignée GM00730 sans irradiation.

Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence Coverage (%)	Ratio [Gorlin / Normal]	P Value Rat	P Value Sample	Log10 Ratio
<i>SH3GL2</i>	1	1	1.99	0.287	1.29E-3	8.14E-4	-0.5416
<i>ZNF609</i>	1	1	1.49	0.329	1.73E-6	1.30E-3	-0.4823
<i>SI00A4</i>	5	68	7.92	0.343	5.88E-8	1.44E-3	-0.4644
<i>SNX18</i>	2	3	1.91	0.356	5.68E-4	1.76E-3	-0.4489
<i>HSPB6</i>	4	31	6.88	0.372	1.73E-30	1.93E-3	-0.4290
<i>LAMTOR5</i>	1	1	10.99	0.395	3.02E-3	2.42E-3	-0.4040
<i>HMGB1</i>	2	6	6.98	0.434	3.21E-5	3.52E-3	-0.3629
<i>HIBCH</i>	1	1	2.33	0.442	4.85E-3	3.25E-3	-0.3544
<i>TTC21A</i>	4	4	1.21	0.444	1.42E-3	4.58E-3	-0.3529
<i>SNX3</i>	1	5	6.79	0.452	1.64E-4	5.31E-3	-0.3453
<i>RPL18</i>	1	2	7.45	0.461	2.89E-6	3.95E-3	-0.3360
<i>CRABP2</i>	4	12	9.42	0.468	1.52E-3	5.24E-3	-0.3295
<i>GPX4</i>	1	1	5.58	0.470	7.04E-3	4.60E-3	-0.3283
<i>EIF3F</i>	1	3	3.36	0.492	1.64E-3	1.92E-2	-0.3080
<i>ATPIF1</i>	2	5	10.38	0.500	6.57E-5	5.28E-3	-0.3010
<i>WNT2B</i>	1	2	2.30	0.504	1.05E-2	5.97E-3	-0.2973
<i>DCC</i>	1	1	0.90	0.507	4.48E-2	1.01E-2	-0.2950
<i>PPP1R7</i>	1	2	3.06	0.508	6.30E-3	8.11E-3	-0.2942
<i>NCALD</i>	1	4	3.63	0.521	7.41E-4	5.29E-3	-0.2836
<i>PTGIS</i>	7	22	3.00	0.523	4.14E-3	1.00E-2	-0.2817
<i>DNAH12</i>	1	1	0.42	0.524	7.86E-3	7.27E-3	-0.2804
<i>LGALS3</i>	6	61	4.40	0.527	1.78E-4	6.88E-3	-0.2781
<i>SORBS3</i>	3	7	1.64	0.528	1.89E-4	7.94E-3	-0.2777
<i>HNRNPDL</i>	1	1	1.90	0.544	3.92E-3	9.05E-3	-0.2642
<i>IDH1</i>	6	31	1.93	0.547	8.31E-3	8.38E-3	-0.2618
<i>PTX3</i>	1	2	3.15	0.557	2.04E-4	9.21E-3	-0.2544
<i>HIST1H4A</i>	10	208	10.68	0.566	1.53E-3	9.46E-3	-0.2475
<i>ILF3</i>	2	2	1.34	0.578	4.01E-2	1.33E-2	-0.2379
<i>RPLP0</i>	7	34	3.15	0.581	8.54E-3	1.15E-2	-0.2356
<i>AK2</i>	1	3	6.69	0.584	1.34E-4	1.13E-2	-0.2335

<i>RANBP1</i>	1	1	10.45	0.588	3.36E-2	1.20E-2	-0.2305
<i>GLOD4</i>	1	4	3.51	0.589	5.71E-3	3.27E-2	-0.2302
<i>TXN</i>	6	46	8.57	0.589	1.34E-2	1.17E-2	-0.2302
<i>GREM1</i>	1	1	5.98	0.594	2.86E-2	1.31E-2	-0.2266
<i>ACSL3</i>	4	8	1.39	0.595	2.69E-3	2.78E-2	-0.2252
<i>TMPO</i>	2	3	1.98	0.596	1.25E-3	1.13E-2	-0.2247
<i>LMAN1</i>	6	24	1.37	0.605	6.33E-4	1.52E-2	-0.2180
<i>EPPK1</i>	1	1	0.37	0.607	1.55E-2	1.64E-2	-0.2170
<i>LGALS1</i>	12	228	8.89	0.608	2.47E-3	1.37E-2	-0.2159
<i>NQO1</i>	10	53	3.28	0.611	1.11E-2	1.52E-2	-0.2141
<i>COX4I1</i>	3	6	6.51	0.621	7.73E-5	2.21E-2	-0.2069
<i>CCAR2</i>	4	7	1.41	0.624	6.30E-3	4.98E-2	-0.2051
<i>TFG</i>	3	6	2.25	0.629	2.77E-2	2.96E-2	-0.2014
<i>HIST3H3</i>	6	44	5.15	0.637	7.59E-3	2.21E-2	-0.1961
<i>PSMD11</i>	2	2	3.55	0.640	2.31E-2	1.93E-2	-0.1936
<i>DBI</i>	2	6	22.99	0.648	2.40E-2	2.46E-2	-0.1885
<i>KRT8</i>	1	1	1.86	0.654	3.53E-2	2.22E-2	-0.1842
<i>RPL23A</i>	4	20	7.69	0.655	5.08E-3	3.86E-2	-0.1837
<i>RPSA</i>	4	9	6.10	0.658	9.32E-3	2.38E-2	-0.1819
<i>TSPO</i>	1	11	4.73	0.662	1.83E-4	2.75E-2	-0.1790
<i>CS</i>	2	6	1.50	0.663	1.34E-2	1.24E-2	-0.1786
<i>CAV1</i>	6	78	4.49	0.664	1.11E-2	2.02E-2	-0.1777
<i>CCT6A</i>	3	12	2.45	0.666	4.44E-2	4.02E-2	-0.1763
<i>ENO1</i>	24	223	2.30	0.669	4.77E-2	2.50E-2	-0.1747
<i>COL6A2</i>	10	36	1.08	0.670	4.28E-2	2.87E-2	-0.1739
<i>APRT</i>	3	22	7.22	0.671	5.84E-4	3.79E-2	-0.1734
<i>UBE2NL</i>	1	2	5.23	0.672	4.77E-2	2.15E-2	-0.1725
<i>ERH</i>	5	29	7.69	0.674	4.48E-2	2.54E-2	-0.1716
<i>RPL36A, RPL36AL</i>	3	10	5.66	0.675	7.01E-3	2.47E-2	-0.1708
<i>MATR3</i>	7	13	1.65	0.677	9.47E-3	1.59E-2	-0.1695
<i>XPO1</i>	3	8	0.84	0.678	4.45E-4	3.36E-2	-0.1687
<i>MTHFD1</i>	9	14	0.96	0.681	3.78E-2	2.88E-2	-0.1666
<i>S100A6</i>	6	45	10.00	0.688	8.16E-3	3.02E-2	-0.1623
<i>SOD1</i>	6	16	6.49	0.689	1.96E-2	5.00E-2	-0.1616
<i>CDC42</i>	3	19	5.76	0.690	7.11E-3	3.45E-2	-0.1609
<i>KARS</i>	1	3	1.34	0.694	9.62E-4	3.16E-2	-0.1584
<i>TKT</i>	12	53	1.44	0.697	1.29E-2	3.39E-2	-0.1571
<i>PSME2</i>	5	8	6.28	0.698	4.47E-2	1.50E-2	-0.1559
<i>RPL13</i>	3	20	5.21	0.700	2.69E-2	3.96E-2	-0.1548
<i>FSCN1</i>	15	66	2.23	0.701	3.03E-2	3.27E-2	-0.1543
<i>PDIA6</i>	10	65	3.86	0.702	1.86E-3	4.01E-2	-0.1539
<i>SLC25A1</i>	2	6	3.54	0.710	5.85E-4	2.84E-2	-0.1488
<i>SUCLG1</i>	2	3	2.02	0.725	2.17E-2	4.48E-2	-0.1399

<i>PRKCDBP</i>	2	10	4.21	0.727	7.31E-3	4.44E-2	-0.1385
<i>PCBP2</i>	3	14	3.01	0.727	2.63E-2	3.62E-2	-0.1382
<i>FAU</i>	1	5	16.95	0.733	9.83E-3	3.79E-2	-0.1351
<i>CLIC1</i>	4	25	3.73	0.739	4.82E-2	4.71E-2	-0.1316
<i>PKM</i>	2	5	1.69	0.744	1.31E-2	3.88E-2	-0.1283
<i>NHP2L1</i>	3	8	9.38	0.758	3.12E-3	4.66E-2	-0.1204

Annexe 2

Tableau représentant les protéines sous-exprimées dans la lignée GM01552 par rapport à la lignée GM00730 sans irradiation.

Gene	Peptide Count	Spectral Count	Sequence Coverage	Ratio [Gorlin / Normal]	P Value Ratio	P Value Sample	Log10 Ratio
<i>P4HA1</i>	7	16	2.62	1.373	3.59E-3	4.18E-2	0.1378
<i>FLNB</i>	29	96	0.58	1.374	4.79E-2	4.84E-2	0.1378
<i>RIMS2</i>	2	2	0.92	1.376	2.64E-2	4.59E-2	0.1385
<i>NOC2L</i>	5	7	0.93	1.390	3.40E-2	2.29E-2	0.143
<i>CTNNB1</i>	3	7	1.54	1.402	2.98E-2	3.13E-2	0.1468
<i>LMO7</i>	8	19	0.71	1.418	2.90E-2	4.65E-2	0.1516
<i>CNN2</i>	7	19	2.27	1.427	4.63E-2	3.43E-2	0.1544
<i>DNAJB4</i>	1	3	2.97	1.434	3.34E-2	3.77E-2	0.1565
<i>ASNS</i>	1	7	2.50	1.440	9.30E-4	2.70E-2	0.1583
<i>KHSRP</i>	7	14	2.53	1.443	1.56E-2	4.37E-2	0.1593
<i>CSRP1</i>	5	31	7.77	1.448	2.70E-2	3.37E-2	0.1608
<i>MOGS</i>	3	18	2.15	1.449	8.81E-3	4.45E-2	0.1612
<i>EIF4A2</i>	2	11	2.46	1.484	1.54E-5	3.12E-2	0.1713
<i>TUBA1B</i>	2	23	2.00	1.486	2.40E-4	3.23E-2	0.1721
<i>MARCKS</i>	8	34	5.72	1.529	3.83E-2	2.29E-2	0.1844
<i>TAGLN</i>	17	125	3.48	1.532	9.24E-3	2.25E-2	0.1853
<i>TPM2</i>	2	8	3.17	1.550	1.74E-5	2.44E-2	0.1903
<i>SKP1</i>	1	1	7.36	1.564	8.90E-3	2.06E-2	0.1943
<i>HBA1</i>	3	13	10.56	1.585	1.34E-2	3.86E-2	0.2000
<i>AP2M1</i>	2	4	3.68	1.586	4.54E-2	1.91E-2	0.2002
<i>PEA15</i>	3	7	13.08	1.595	1.23E-3	2.42E-2	0.2026
<i>TCIRG1</i>	2	9	2.17	1.612	5.85E-3	2.50E-2	0.2072
<i>OGT</i>	1	1	1.15	1.621	3.28E-2	1.72E-2	0.2096
<i>ABCD3</i>	1	1	1.67	1.658	3.71E-2	1.38E-2	0.2196
<i>PFKP</i>	2	3	2.17	1.700	3.16E-3	1.26E-2	0.2304
<i>TGM2</i>	2	10	2.33	1.757	1.05E-2	1.01E-2	0.2446
<i>MIF</i>	2	8	9.57	1.856	1.17E-2	1.09E-2	0.2686
<i>SAMD9L</i>	1	1	0.38	1.893	3.55E-2	8.38E-3	0.2771
<i>FAM219A</i>	1	1	9.19	1.943	3.66E-3	6.98E-3	0.2885
<i>A2ML1</i>	3	3	1.24	1.965	5.12E-3	6.41E-3	0.2934
<i>ALDH1A3</i>	6	14	2.54	1.971	1.81E-3	4.25E-3	0.2947

<i>TRAM1</i>	2	3	2.94	1.976	1.44E-3	6.01E-3	0.2958
<i>TPM1</i>	8	20	5.99	1.981	1.80E-6	5.87E-3	0.2968
<i>NUP62</i>	1	1	2.68	2.021	1.83E-2	6.12E-3	0.3056
<i>PCNT</i>	5	10	0.27	2.115	3.42E-2	1.74E-2	0.3252
<i>PSTPIP2</i>	1	1	2.40	2.394	2.60E-3	2.98E-3	0.3791
<i>DDX6</i>	2	4	1.24	2.477	4.85E-3	2.58E-3	0.3940
<i>KRT7</i>	5	7	2.77	2.558	4.45E-4	2.15E-3	0.4079
<i>TMTC3</i>	2	3	2.30	2.638	5.48E-3	2.22E-3	0.4212
<i>UCHL1</i>	5	13	3.59	2.692	1.67E-5	1.83E-3	0.4300
<i>TES</i>	3	8	2.61	3.861	7.63E-9	7.64E-4	0.5867
<i>CALD1</i>	3	8	1.26	4.136	6.04E-9	1.01E-3	0.6166

Annexe 3 : Tableau des primers utilisés pour la RT-qPCR

Gène	Numéro d'entrée sur GenBank	Amorce Forward	Amorce Reverse
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	gagtcaacggatttggctgt	ttgatttggagggatctcg
<i>PTCH1</i>	NM_000264.3	acaactcctggtgcaaacc	ctttgctggaccattct
<i>Gli2</i>	NM_005270.4	caccaaccagaacaagcaga	acctcagcctctgcttaca
<i>CCND1</i>	NM_053056.2	agetgtgcatctacaccgac	tgttgtctcctccgcctc
<i>UNG</i>	NM_080911.1	aatggcagctgtatccaacc	cacccaacatctgtcactg
<i>MYH</i>	NM_012222.2	ccagagagtgagcaggaac	ttctggggaagtgaccac
<i>OGG1</i>	NM_002542.5	tggaagaacaggcgggcta	atggacatccacggcacag
<i>APE1</i>	NM_001641.2	gctgctggactctctcatc	gctgttaccagcacaacga
<i>Polβ</i>	NM_002690.1	gagaagaacgtgaccaagc	cgatcatcctgccaatct
<i>XRCC1</i>	NM_006297.2	cagccctacagcaaggactc	gctgtgactgggatgtctt
<i>LigIII</i>	NM_013975.2	gctcagcaggagatggtttc	tctaggtcccgtgccatctc
<i>Ku70</i>	NM_001469.3	agaggagctgaagaccaca	cctctggtcagctcctggaag
<i>Ku80</i>	NM_021141.3	ccccaatcagcagcatatt	ccttcagccagactggagac
<i>DNA-PKcs</i>	NM_006904.6	catggaagaagatcccaga	tggcacaccactttaacaa
<i>XRCC4</i>	NM_003401.3	cattgtgtcaggagcagga	tctcaggtgctcattttg
<i>Lig4</i>	NM_002312.3	ggacgatttctcccgtttt	gcggtgatgaatctctcgt
<i>MRE11</i>	NM_005591.3	cccagaggagcttgactgac	ttcatttctctgggcaagtc
<i>RAD50</i>	NM_005732.2	cttgatgatgcaggacgat	ccagaagctggaagtacgc
<i>NBS1</i>	NM_002485.4	ttggtgcatgctctcttg	ggctgcttcttgactcaac
<i>XPC</i>	NM_004628.4	ccatgaggacacacacaagg	tccaatgaaccactcacca
<i>ATM</i>	NM_000051.3	ggacagtgaggcacaacaaat	gtgtcgaagacagctgggta
<i>ATR</i>	NM_001184.3	ctcgtgaactgtacgtgga	gcatagctcgacctggatt
<i>p53</i>	NM_000546.4	gtccgagagctgaatgagg	tctgagtcaggcccttctgt

**Impairment of base excision repair in dermal fibroblasts isolated
from Nevroid Basal Cell Carcinoma patients**

A. CHARAZAC^{1;2}; P. HALDIA^{1;2}; S. SAUVAIGO³; T. DOUKI^{1;2}; W. RACHIDI^{1;2}

1) *Univ. Grenoble Alpes, INAC, SCIB, F-38000 Grenoble, France*

2) *CEA, INAC, SCIB, F-38054 Grenoble, France.*

3) *LX-Repair, 7 parvis Louis Néel, 38040 Grenoble, France*

ABSTRACT

The nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), also called Gorlin syndrome is an autosomal dominant disorder whose incidence is estimated at about 1 per 57 000 - 256 000 individuals. It is characterized by several developmental abnormalities, radiosensitivity and an increased predisposition to the development of basal cell carcinomas (BCCs). Mutations in the tumor suppressor gene PTCH1, which is part of the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway, are responsible for these clinical manifestations. As several genetic mutations in the DNA repair genes are responsible of photo or radiosensitivity and high predisposition to cancers, we hypothesized that these effects in Gorlin syndrome might be due to a defect in the DNA damage response (DDR) and/or the DNA repair capacities. Therefore, the objective of this work was to investigate the sensitivity of skin fibroblasts from NBCCS patients to different DNA damaging agents and the modulation of the DNA repair capacities by these agents. To that aim, we used fibroblasts from Gorlin patients or healthy individuals and compared their radiosensitivity and their resistance to several stresses. Gorlin's fibroblasts showed high radiosensitivity and also less resistance to oxidative stress-inducing agents when compared to controls. However, no difference in cell viability was shown after exposure to UVB or bleomycin. As BER is responsible for the repair of oxidative DNA damage, we decided to assess the BER mechanisms in Gorlin's fibroblasts. Interestingly, the levels of both BER gene expression and BER protein activity were drastically decreased in Gorlin's fibroblasts with respect to control. Another interesting fact is the increasing production of superoxide in the mitochondria of Gorlin cells after exposure to ionizing radiation.

1. INTRODUCTION

First described by Gorlin and Goltz in 1960 (1), the nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) also called Gorlin syndrome, is a rare autosomal dominant disorder whose prevalence varies from 1 case per 57 000-256 000 in the general population (2). Patients with NBCCS may present various developmental abnormalities such as palmar and plantar pits, odontogenic keratocysts, skeletal abnormalities (bifid ribs, scoliosis, polydactyly), neurological disorders (like mental deficiency or medulloblastoma), and an increased predisposition to the development of basal cell carcinomas (BCCs) of the skin (2, 3). The onset of skin tumors at a young age (3) is in contrast to that at 60-65 years in the general population. NBCCS patients are predisposed to cancer induction by ionizing radiation. Indeed, Gorlin patients undergoing radiotherapy treatment develop multiple BCCs, the major clinical feature, within the irradiation field (scalp and neck) 6 months to 3 years after treatment (4). In addition to the occurrence of BCCs, Gorlin patients are at high risk of

developing medulloblastoma which is the cause of premature death, rhabdomyosarcoma, ovarian and uterine fibromas (3).

To date, more than 200 mutations have been reported in the tumor suppressor gene patched 1 (*Ptch1*) which is mainly considered to be responsible for Gorlin syndrome (3, 5). No correlation between genotype and patient's phenotype was described so far. The protein encoded by this gene acts as a transmembrane receptor for the sonic hedgehog (SHH) ligand (6). In the absence of SHH, PTCH1 constitutively suppresses the activation of the hedgehog signaling by inhibiting a second transmembrane protein called Smoothed (SMO). The binding of SHH to PTCH1, or PTCH1-inactivating mutations, relieves this suppression and restores SMO activity, which leads to the activation and nuclear translocation of the zinc transcription factors (Gli1, Gli2 and Gli3) (7). Highly conserved among species, this Sonic Hedgehog signaling pathway plays a critical role in patterning, proliferation, and cell fate determination of a broad range of cells and tissues (8). In the adult stage, the pathway is considerably down-regulated and is restricted to tissue regeneration and stem cell renewal (9). SHH aberrant activation has been observed in several types of human cancer such as leukemia, gastrointestinal, lung, ovarian or even breast and in almost all sporadic BCCs (10). NBCCS patient cells exhibit chromosomal instability (11). Sensitivity to genotoxic stresses such as UV (12, 13) and ionizing radiation (14) have been reported. However, contradictory results have been published on this sensitivity, both for UV and IR (15, 16). Thus, the underlying mechanism remains elusive in the sensitive cells. Some studies have suggested that increased radiosensitivity of cells might be strongly linked with the failure of cells to repair the DNA lesions induced by the exposure to radiation (17-19). Because complex DNA damage and in particular double-strand breaks play a major role in the lethality and mutagenicity of ionizing radiation, deficient DNA damage response and DNA repair may be one of the origins of NBCC.

A wide variety of DNA repair pathways are expressed in cells. They evolved in order to maintain the integrity of the genome continuously threaten by both endogenous and exogenous stresses. Among all, small DNA lesions such as deamination, oxidation, alkylation or single strand breaks will be repaired by the base excision repair (BER) system. This pathway is initiated by DNA N-glycosylases (like OGG1, MYH...) which recognize and remove specific damaged or inappropriate bases, generating an abasic sites (AP) that is subsequently cleaved by an AP endonuclease. The resulting single-stranded break can then be processed by the combined action of both polymerase and ligase (20, 21). Nucleotide excision repair (NER) is an additional important mechanism that handles a variety of lesions affecting the DNA helix structure including UV-induced lesions and bulky chemical adducts. The NER process involves the action of more than 30 proteins in a stepwise manner that includes damage recognition, local unwinding of the helix, dual incision of the lesion, gap-filling using the undamaged single-stranded DNA and finally, the strand ligation (20, 22). Other important pathways are the homologous recombination (HR) and the non-homologous end joining pathway (NHEJ) both allowing the repair of DNA double-stranded breaks notably induced by ionizing radiation (20, 23).

Like NBCCS, numerous genetic disorders presenting hyper-radiosensitivity, photosensitivity or even increased proneness to cancer exist. This is the case for Xeroderma Pigmentosum (XP) where a mutation in a DNA repair gene of the NER pathway leads to UV sensitivity, neurological abnormalities and a great risk of developing skin cancer (24). Another such genetic disorder is Ataxia-Telangiectasia (AT) which is characterized by hypersensitivity to ionizing radiations, predisposition to malignancies and neurological defects because of mutations in the ATM gene involved in the NHEJ repair pathway (25). Because deficient

DNA repair is a common feature to these syndromes, we decided to investigate whether this was not also the case in Gorlin syndrome. Therefore, we designed this work in order to study the sensitivity of skin fibroblasts from NBCCS patients to different DNA damaging agents and the modulation of the DNA repair capacities. Here, we demonstrate that the PTCH1 mutations present in Gorlin fibroblasts lead them to be more sensitive to the exposure to ionizing radiation and to UVA. Furthermore, our experiments showed a drastic decrease in the gene expression of BER and DNA damage signaling. Besides, the BER activity was found to be globally downregulated in these PTCH1 mutated cell lines. Finally, an increased production amount of superoxide anion was found in Gorlin fibroblasts after an irradiation stress.

2. MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions.

Primary human dermal fibroblasts of a healthy 45 years old woman (GM00730) or NBCCS patients of 11 to 31 years old men and women (GM01552, GM02098 and GM03300) were purchased from Coriell Institute for Medical Research (NJ, USA). GM00730 was found to be representative among three other control human primary fibroblasts.

The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with Glutamax (Invitrogen, CA, USA), 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, CA, USA). Incubation was routinely at 37°C in an incubator supplied with 5% CO₂.

Long-term cytotoxicity assay.

Long-term cytotoxicity of gamma irradiation (2.2Gy/min, Co⁶⁰, Arc Nucleart, CEA Grenoble), UVA radiation (UVA 700L Waldmann, Germany) and UVB radiation (VL215G irradiator, Bioblock, France) were tested with ranging doses from 0 to 10 Gy, 0 to 100 J/cm² and 0 to 0.025 J/cm² respectively. Bleomycin was also tested as pure DNA double-stranded breaks producer with doses varying from 0 µM to 1 µM.

Fibroblasts were plated at 20 cells/cm² for this clonogenic assay. The next day, the medium was changed and the cells were stressed. Cells were cultured as previously described (26). They were then fixed and stained with crystal violet, in order to count the number of colonies by microscopy.

Treatment and frozen pellets preparation.

Subconfluent cells were either not exposed (0 Gy) or exposed to 6 Gy gamma radiation at a rate of 2.2 Gy/min. Fibroblasts were harvested either 4h (RT-qPCR assay) or 24h (DNA repair activity assay) after irradiation, centrifuged and rinsed with PBS (Invitrogen, CA, USA). Then, pellets were rapidly frozen at -80°C until further use.

Reverse Transcription and Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) analysis.

Total cellular RNA was extracted from each sample using the GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's protocol with the optional DNase treatment step. RNA quantification was done using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) and its quality was assessed using native agarose gel electrophoresis. Total RNA was considered intact when two acute 28S and 18S bands were visualized.

For each condition, 2 μ g of RNA were reverse transcribed to cDNA (Superscript[®] III Reverse Transcriptase, Invitrogen, CA, USA) in the presence of 100 ng/ μ L of random primers (Promega, Charbonnières, France), dNTP mix (10 mM of each, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 5X-First strand buffer, 0.1M DTT, ribonuclease inhibitor (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and SuperScript III enzyme (Invitrogen, CA, USA).

Ten ng of each cDNA was used in qPCR reactions with gene-specific primers (Table 1). qPCR was performed in a MX3005p Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, CA, USA) using Takyon[™] qPCR MasterMix for SYBR[®] assays containing Low ROX passive reference (Eurogentec, Angers, France). At the end of each run, the amplification's integrity indicated by a single melt peak for each product was verified using a dissociation curve analysis. Target gene mRNA expression was normalized to the expressed housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The quantification was done using the comparative Ct method involving the comparison of the Ct values of the sample of interest with the Ct values of normal non-irradiated RNA as calibrator. The target's amplifications efficiencies as well as the endogenous references were considered to be approximately equal.

DNA excision/synthesis activity analysis.

The DNA repair biochips measure DNA lesions excision/synthesis repair activities of substrates present in supercoiled plasmid DNA, immobilized on support (hydrogel coated surface). Repair activity is reflected by the incorporation of fluorescent nucleotides at the lesions sites (dCTP-Cy5). Seven lesions known to be repaired by distinct enzymes and/or pathways (BER and NER) are located at predetermined sites: photoproducts, psoralen adduct, cisplatin adduct, 8-oxoguanine, alkylated bases, cytosine and thymine glycols, and abasic sites. The substrates are controlled by HPLC-MS/MS and for each lesion a concentration range is available (27). Images were acquired by scanning the biochip at 532 nm using an InnoScan710AL scanner (Innopsys, France). Total spot fluorescence intensity was quantified using the Mapix software (Innopsys, France). Data were normalized using NormalizeIt software (27). Each sample was characterized by seven values corresponding to the repair of the seven DNA lesions present on the biochip.

As described in Millau *et al.* (27), nuclear extracts were prepared and used at 0.4 mg/mL to conduct the DNA repair excision/synthesis reaction on the modified plasmid arrays. Each extract was tested in duplicate.

Mitochondrial superoxide production analysis

Mitochondrial superoxide generation was assessed using MitoSOX[™] (Life Technologies, CA, USA). This fluorogenic dye is selectively targeted to the mitochondria of live cells where it is oxidized by superoxide but not by other reactive oxygen species. MitoSOX[™] was added at a final concentration of 5 μ M according to the manufacturer's recommendation. Cells were allowed to load this dye for 10 min and then washed with PBS (Invitrogen, CA, USA). The measurements were carried out using a FACScalibur instrument (BD Biosciences, USA).

Statistical analysis.

The data were expressed as the mean \pm SD. Statistical significance of data was assessed using the student's t test after checking variance homogeneity with the Levene's test or one-way ANOVA as appropriate. Differences were considered significant when the p value was <0.05 .

3. RESULTS

3.1. NBCCS fibroblasts are specifically more sensitive to ionizing radiation and UVA-induced cytotoxicity.

The four human primary cell cultures were exposed to increasing doses of either gamma, UVA and UVB radiations, or to increasing concentrations of bleomycin. Long-term survival was then determined 14 days post-stress using the clonogenic survival assay (26). The IC₅₀ was thus determined as the dose where half of cells survived. For the ionizing radiation, the IC₅₀ for the GM00730 cell line is 2.1 Gy while it was 1.4 Gy ; 1.2 Gy ; 1.4 Gy for GM01552 ; GM02098 ; GM03300 respectively. Upon exposure to UVA radiation, the IC₅₀ of the GM00730 cell line was found to be 68.03 J/cm². The three Gorlin cell lines show sensitivity to this stress, as their IC₅₀ is respectively 32.28 J/cm² (GM01552), 40.15 J/cm² (GM02098) and 46.33 J/cm² (GM03300). Looking at the results after a UVB stress, the IC₅₀ of all cell lines did not show any significant differences. Indeed, it varies from 0.0070 J/cm² (GM02098) to 0.0097 J/cm² (GM01552) for the Gorlin cell lines and the value is 0.0082 J/cm² for the normal cell line. Finally, exposure to bleomycin did not result in different survival responses between Gorlin and normal cell lines (0.243 μM for the GM00730 ; 0.285 μM for the GM01552 ; 0.297 μM for the GM02098 and 0.263 μM for the GM03300).

3.2. Fibroblasts from NBCCS patients show a drastic decrease of BER and DNA damage signaling gene expression at basal condition.

We first examined the expression level of a large series of DNA repair genes in the normal and the three Gorlin primary cell lines under basal conditions without any exogenous stress (Figure 2). Several genes from base excision repair (BER), non-homologous end joining (NHEJ) and DNA damage signaling pathways were studied. Numerous BER-associated genes were significantly less expressed in Gorlin cell lines. For *MYH* which is a BER glycosylase that removes misincorporated adenines in front of 8oxoG during DNA replication, the fold change expression in normal cell line compared to Gorlin cell lines varies from 0.39 ± 0.05 (GM01552, p = 0.0012) to 0.59 ± 0.14 (GM02098, p = 0.0187). The expression of the uracil-DNA glycosylase (*UNG*) is also drastically decreased in Gorlin as compared to the normal cell line (from 0.20 ± 0.05 (GM01552, p = 0.0113) to 0.29 ± 0.04 (GM03300, p = 0.0141)). mRNA level of the human 8oxoG-specific glycosylase, *OGGI*, is reduced in Gorlin cell lines from 0.42 ± 0.08 (GM01552, p = 0.0012) to 0.60 ± 0.17 (GM02098, P = 0.0223). Similarly, the apurinic endonuclease 1 (*APE1*) expression is reduced from 0.12 ± 0.03 (GM03300, p = 9.9205E-05) to 0.33 ± 0.04 (GM01552, p = 0.0003) in Gorlin as compared to normal. The mRNA expression of *Polβ* is not significantly different in Gorlin and normal fibroblasts. However, ligase 3 (*LigIII*) expression is reduced in GM01552 (0.43 ± 0.03, p = 5.766E-06) and GM03300 (0.61 ± 0.05, p = 0.0001), but no significant difference was found for the GM02098 cell line.

Next, we assessed the mRNA expression of DNA damage signaling genes. For *ATM*, ataxia telangectasia mutated gene, a kinase which is recruited and activated by DNA double-strand breaks, the mRNA expression is decreased from 0.33 ± 0.02 (GM01552, p = 8.3764E-06) to 0.41 ± 0.04 (GM02098, p = 2.7832E-05). As compared to *ATR* (ATM and Rad3-related), the fold change expression of Gorlin cells compared to normal ones is declined from 0.44 ± 0.02 (GM01552, p = 0.0006) to 0.78 ± 0.1 (GM02098, p = 0.0499). The mRNA expression level of the DNA-dependent protein kinase (*DNA-PKcs*) responsible for the alignment of broken ends of DNA in the NHEJ pathway is significantly reduced from 0.42 ± 0.03 in GM03300, (p = 0.0027) to 0.74 ± 0.02 in GM02098 (p = 0.0398) in Gorlin. Playing a role in the early DNA double-strand breaks repair, the Rad50 expression is decreased in all Gorlin as compared to

normal cell line (from 0.30 ± 0.06 (GM03300, $p = 0.0011$) to 0.58 ± 0.08 (GM01552, $p = 0.0093$). Finally, no significant differences were found between Gorlin and normal for the ligase 4 (*LigIV*) expression.

3.3. Effect of ionizing radiation on BER-associated gene expression in normal and Gorlin fibroblasts.

We then investigated the gene expression profile of these cell lines 4h following a 6 Gy irradiation stress (Figure 3). MTT short-term toxicity assay demonstrate that this stress leads to less than 20% of mortality 24h after irradiation for both normal and Gorlin fibroblasts (Data not shown). The one way anova statistical analysis shows that the mRNA fold change of the 22 studied genes (BER and signaling associated genes) was overall downregulated in the normal cell line after irradiation as compared to the same cell line without irradiation ($p = 9.048E-06$). We next assessed the statistical changes between each cell line without irradiation and after a 6 Gy irradiation. The mRNA level of the *MYH* is reduced in Gorlin cell lines from 0.30 ± 0.07 (GM01552, $p = 0.0127$) to 0.38 ± 0.03 (GM03300, $p = 0.0213$) compared to normal. The fold change expression of *UNG* is drastically decreased in Gorlin fibroblasts from 0.22 ± 0.03 (GM01552, $p = 2.56E-06$) to 0.28 ± 0.03 (GM03300, $p = 1.27E-05$). Concerning the expression of *OGG1*, it varies from 0.34 ± 0.04 (GM03300, $p = 0.0008$) to 0.53 ± 0.01 (GM01552, $p = 0.0164$) in Gorlin cell lines. The *APE1* expression fold collapses in Gorlin when compared to normal (from 0.09 ± 0.01 (GM03300, $p = 1.386E-05$) to 0.31 ± 0.01 (GM01552, $p = 6.34E-05$)). However, no significant differences were found in the gene expression of *Polβ* and *LigIII* between Gorlin and normal cells ; except for the GM01552 *LigIII* expression, which is decreased to 0.48 ± 0.03 ($p = 0.0208$).

Regarding the *ATM* gene expression, it is decreased from 0.31 ± 0.02 (GM02098, $p = 1.586E-06$) to 0.36 ± 0.02 (GM01552, $p = 3.719E-06$) in Gorlin cell lines. The mRNA expression of *ATR* is also downregulated in Gorlin as compared to normal (from 0.55 ± 0.05 (GM01552, $p = 0.0081$) to 0.59 ± 0.03 (GM03300, $p = 0.0131$)). Similarly, the expression of *DNA-PKcs* which decreases from 0.39 ± 0.05 (GM03300, $p = 0.0001$) to 0.52 ± 0.01 (GM02098, $p = 3.475E-05$) in Gorlin. mRNA level of *Rad50* is also reduced in Gorlin cell lines (from 0.39 ± 0.05 (GM02098, $p = 0.0050$) to 0.51 ± 0.03 (GM01552, $p = 0.0122$)). Finally, *LigIV* expression is increased in GM01552 (1.34 ± 0.16 , $p = 0.0082$) and decreased in GM02098 (0.74 ± 0.03 , $p = 0.0055$), but no significant difference was found for the GM03300 cell line.

3.4. Low intrinsic DNA repair capacities in NBCCS fibroblasts.

We used a miniaturized assay that allows among other the analysis of the excision/resynthesis step activity of the BER repair pathway (27). The assay involves the quantification of the repair of plasmid spotted on biochips, each bearing a specific class of DNA damage. The 8-oxoG lesions highlight the repair capacity of the OGG1 (8-oxoguanine glycosylase) glycosylase followed by BER endonuclease and ligase steps. The AlkB lesions show the repair capacity of the alkyladenine DNA glycosylase (AAG) excision's activity and BER endonuclease and ligase resynthesis activity. Finally, the thymine glycol lesions allow the observation of the repair capacity of the Thymine DNA glycosylase (TDG), followed by BER endonuclease and ligase steps.

We first investigated the excision/resynthesis activity using the global repair efficiency index of the four cell lines at the basal level without irradiation (Figure 4). The excision/resynthesis activity of the 8-oxoG lesion was found to be statistically downregulated in GM01552 (0.05 ± 0.03 , $p = 5,033E-06$), and in GM03300 (0.17 ± 0.01 , $p = 7,339E-05$) as compared to the normal cell line. Once again, the activity of the GM01552 and the GM03300 are found

reduced for excision/resynthesis activity of the AAG (respectively 0.18 ± 0.07 , $p = 0.0016$ and 0.35 ± 0.06 , $p = 0.0358$). The value representing GM02098's (0.69 ± 0.13 , $p = 0.0557$) repair activity is not statistically different from the value of GM00730. Finally, regarding the activity of excision/resynthesis of the Glycol lesions, all three Gorlin cell lines appear to have a downregulation of this activity (from 0.15 ± 0.07 , $p = 0.0015$ (GM01552) to 0.61 ± 0.13 , $p = 0.0329$ (GM02098)) when compared to the normal cell line.

We then decided to test the excision-synthesis activity of these cell lines 24h after a 6 Gy stress (Figure 5). MTT short-term toxicity assay demonstrate that this stress leads to less than 20% of mortality 24h after irradiation for both normal and Gorlin fibroblasts (Data not shown). The anova statistical analysis demonstrates that the excision-resynthesis activity tested by this biochip are weakened in the irradiated normal cell line as compared to the non-irradiated ($p = 0.0070$). In the Gorlin fibroblasts, the same one way anova statistical analysis did not show any differences in the excision/resynthesis activity of this three lesions after a 6 Gy stress as compared to the respective cell line without irradiation ($p = 0.64$ for GM01552 ; $p = 0.43$ for the GM02098 and $p = 0.39$ for the GM03300). We next compared the repair activities between the irradiated GM00730 cell line and the 3 irradiated Gorlin cell lines. The excision/resynthesis activity of the 8-oxoG lesion was drastically reduced in the GM01552 cell line (0.05 ± 0.05 , $p = 0.0097$) compared to the GM00730 cell line. No statistical differences were found for the two other Gorlin cell lines (0.50 ± 0.12 , $p = 0.54$ for GM02098 and 0.29 ± 0.17 , $p = 0.20$ for GM03300). With regard to the activity of the excision/resynthesis of the AlkB lesions, it was found reduced in the GM01552 cell line (0.15 ± 0.09 , $p = 0.0139$) in comparison to the GM00730 cell line ; while once again no differences were found for the other Gorlin cell lines (0.63 ± 0.10 , $p = 0.72$ for GM02098 and 0.41 ± 0.10 , $p = 0.17$ for GM03300). GM02098 (0.56 ± 0.08 , $p = 0.46$) and GM03300 (0.36 ± 0.09 , $p = 0.15$) are found to possess the same TDG activity as the normal one. Glycol excision activity is decreased in GM01552 (0.11 ± 0.06 , $p = 0.0085$) in comparison to the normal cell line.

3.5. Superoxide production is increased in Gorlin fibroblasts.

MitoSOXTM dye was used to reveal the production of superoxide by mitochondria of the four human primary fibroblasts. A one way ANOVA analysis revealed that this production was not statistically different between all cell lines ($p = 0.37$) at basal level. However, GM01552 (10.11 ± 0.70 , $p = 0.034$) and GM03300 (4.33 ± 1.43 , $p = 0.034$) produced more superoxide anion than the normal cell line (1.89 ± 0.11) after exposure to 6 Gy of \square -radiation (Figure 6). The GM02098 appears to possess the same ability to produce superoxide as the GM00730 cell line (1.59 ± 1.88 , $p = 0.287$).

DISCUSSION

It has been shown that several cancers prone diseases result from a defective DNA repair capacity. This is the case of the Xeroderma Pigmentosum syndrome (XP) where patients exhibit a high sensitivity to UV radiation. The abnormally high apparition rate of basal cell carcinomas (BCCs) in sun-exposed skin is due to mutations in proteins belonging to the nucleotide excision repair pathway (24). Ataxia Telangiectasia (AT) is another example of such kind of disorder. The mutation in *ataxia telangiectasia mutated* gene is responsible for the highly increased incidence of lymphomas and leukemia in these patients (25). Thus, the aim of our study was to assess the modulation of several DNA repair systems in NBCCS, an

hyper-radiosensitive disorder and cancer prone-disease in order to know if Gorlin phenotype is due to a defective DNA repair capacity. Our present results show that the PTCH1 mutations lead Gorlin fibroblasts to be more radiosensitive to ionizing radiation and UVA-induced cytotoxicity. Further experiments have shown a drastic decrease in the gene expression of BER and DNA damage signaling, as well as in the excision/resynthesis activity of the base excision repair pathway. Finally, an increased production of superoxide anion was found in Gorlin fibroblasts after exposure to ionizing radiation.

In the present study, we used fibroblasts which were easily obtainable instead of keratinocytes from NBCCS patients and from one control donor. It has been clearly demonstrated that BCCs in Gorlin patients are derived from epidermal keratinocytes, but more and more data show clear evidence of stroma cells in the tumoral development (28).

Because Gorlin patients are found to be hyper-radiosensitive to ionizing radiation, we first decided to test our cell lines in order to know if they were able to reproduce the NBCCS phenotype. Clonogenic assay showed that the three Gorlin fibroblasts were more sensitive to this stress leading to damages preferentially repaired by both NHEJ and BER. Chan *et al.* (14) found the same results. The-radiosensitivity, and thus the inter-individuality found is dependent upon the mutation's position in the PTCH1 gene. On the contrary, Featherstone *et al.* (16) were not able to observed survival difference between NBCCS and control fibroblasts exposed to ionizing radiation. These dissimilarities might be explained by methodological differences or probably more by the individual differences found between all NBCCS fibroblasts depending upon the mutation's position.

Other stresses leading to the formation of other classes of DNA damage were tested. UVA is known to induce DNA damage by its ability to generate ROS, which leads to the formation of SSB, oxidized bases such as 8oxoG (29), and CPD (30). We observed that the Gorlin fibroblasts were more sensitive than normal fibroblasts to UVA. This may be explained by a decreased DNA repair although UVA exhibits much more drastic effects on other cellular compartments such as lipid membranes. We then tested UVB, a CPD and 6-4 PP inducer which are handled by the NER repair pathway. As Brellier *et al.* (15), the Gorlin cell lines were not sensitive to this agent. On the contrary, Applegate *et al.* (12) described an hypersensitivity of NBCCS fibroblasts to UVB ; but they mentioned that the sunlamp used in their experiments substantially emitted in the UVA wavelengths. Finally, we did not observe increased sensitivity of Gorlin cell lines to bleomycin, a radiomimetic agent producing double-strand breaks through an oxidative stress-independent pathway. In summary, clonogenicity assay demonstrated a strong radiosensitivity and a lower resistance to agents generating oxidative stress of the primary Gorlin cell lines than the normal cell line. In contrast, no difference was observed for stresses not associated with oxidative stress.

In order to know if the sensitivity to IR and UVA was due to the failure to repair DNA damage induced by these genotoxic agents, we decided to assess the mRNA expression of DNA repair gene in all four cell lines at both basal level and after an irradiation stress of 6 Gy doses. A global downregulation of almost all DNA repair genes was found with a collapse for the excision-resynthesis step of BER. Interestingly, *OGG1* and *MYH*, both of which are involved in the 8-oxoG repairs, were significantly downregulated at basal level and after a strong irradiation dose. Some studies have already demonstrated that a low expression of OGG1 might result in the accumulation of reactive oxygen species (ROS) generating 8-oxoG lesion (31, 32). Our results also establish a collapse expression of *UNG* and *APE1*. These two glycosylases have been shown to be linked with deficiency in radiosensitivity (33, 34). Interestingly, it has been exposed by Sobol *et al.* (35) that a deletion in beta-polymerase leads

to BER repair deficiency and an hyper-sensitivity to DNA-alkylating agents. Our RT-qPCR experiments did not show any impairment of gene expression of this polymerase.

ATM and ATR are key mediators of the DNA damage response enabling through their activation the initiation of signaling pathways regulating apoptosis, cell cycle progression and DNA repair (36). The mRNA expression of both kinases was found reduced at basal level and after an ionizing radiation. Studies on mice have shown that the disruption of ATR might lead to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality (37, 38). On top of that, ATM and ATR are key controllers of the DNA damage response on which depends the genome's stability (39). Moreover, Barzilai *et al.* (40) have linked the ATM deficiency to ROS regulation. Thus, the downregulation of ATM and ATR gene expression found here might introduce a genomic instability in Gorlin's fibroblast.

Next, we wanted to know if this downregulation was also found at the activity level. In order to answer this question, we used a miniaturized assay allowing the fast and reliable questioning of the excision-synthesis step of the BER repair pathway. Overall, the activity of DNA repair in NBCCS cell lines is decreased when compared to the normal cell line. AAG and TDG activity have been found downregulated. Regarding, two of the three NBCCS cell lines present a decreased of the 8-oxoG lesions excision/resynthesis activity. These results might be correlated with the collapsing of *MYH* and *OGG1* gene expression. These data are another evidence of the BER repair pathway impairment in Gorlin fibroblasts. The question of ROS production, and more specifically of superoxide anion in Gorlin and normal fibroblasts demonstrate an increase after ionizing radiation. We thus hypothesized that the increase in ROS production will lead to the increase of DNA damage. Along with the BER repair pathway defect from basal level leads to NBCCS phenotype. Thus, the results of both gene expression and DNA repair activity allowed the highlight of the same downregulation of DNA repair, and especially of oxidative damage, in Gorlin's fibroblast.

An alternative or additional mechanism could be that increased oxidative stress may be at the origin of the decrease in repair capacities. Indeed, we have recently reported a general decrease in DNA repair under conditions leading to oxidative stress such as expression of amyloid β peptide (41), selenium depletion (26) or exposure to nanoparticles (42). It may be proposed that Gorlin's cells, like XP's (43), is associated with increased production of ROS, even at the basal level and therefore have to deal with increased level of DNA damage and impaired DNA repair. This may not explain the impact on survival upon exposure to β -rays because bleomycin experiments showed that repair of deadly double-strand breaks is unaffected in Gorlin's cells. Similarly, the cell death results after exposure to UVA cannot be rationalized only in terms of DNA damage that are produced at a very low level by this stress. Yet, accumulation of DNA damage may well explain the increased cancer rate observed in Gorlin patients.

REFERENCES

1. Gorlin RJ, Goltz RW (1960) Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*; **262**: 908-12.
2. Lo Muzio L (2008) Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*; **3**: 32.
3. Fujii K, Miyashita T (2014) Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): update and literature review. *Pediatr Int*; **56**: 667-74.

4. Wallin JL, Tanna N, Misra S, Puri PK, Sadeghi N (2007) Sinonasal carcinoma after irradiation for medulloblastoma in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Otolaryngol*; **28**: 360-2.
5. Lindstrom E, Shimokawa T, Toftgard R, Zaphiropoulos PG (2006) PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat*; **27**: 215-9.
6. Ogden SK, Ascano M, Jr., Stegman MA, Robbins DJ (2004) Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol*; **67**: 805-14.
7. Hui CC, Angers S (2011) Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*; **27**: 513-37.
8. Cohen MM, Jr. (2003) The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A*; **123A**: 5-28.
9. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A (2010) Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem*; **18**: 6613-24.
10. Li C, Chi S, Xie J (2011) Hedgehog signaling in skin cancers. *Cell Signal*; **23**: 1235-43.
11. Shafei-Benaissa E, Savage JR, Babin P, Larregue M, Papworth D, Tanzer J, et al. (1998) The naevoid basal-cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome) is a chromosomal instability syndrome. *Mutat Res*; **397**: 287-92.
12. Applegate LA, Goldberg LH, Ley RD, Ananthaswamy HN (1990) Hypersensitivity of skin fibroblasts from basal cell nevus syndrome patients to killing by ultraviolet B but not by ultraviolet C radiation. *Cancer Res*; **50**: 637-41.
13. Nishigori C, Arima Y, Matsumura Y, Matsui M, Miyachi Y (2005) Impaired removal of 8-hydroxydeoxyguanosine induced by UVB radiation in naevoid basal cell carcinoma syndrome cells. *Br J Dermatol*; **153 Suppl 2**: 52-6.
14. Chan GL, Little JB (1983) Cultured diploid fibroblasts from patients with the nevoid basal cell carcinoma syndrome are hypersensitive to killing by ionizing radiation. *Am J Pathol*; **111**: 50-5.
15. Brellier F, Valin A, Chevallier-Lagente O, Gorry P, Avril MF, Magnaldo T (2008) Ultraviolet responses of Gorlin syndrome primary skin cells. *Br J Dermatol*; **159**: 445-52.
16. Featherstone T, Taylor AM, Harnden DG (1983) Studies on the radiosensitivity of cells from patients with basal cell naevus syndrome. *Am J Hum Genet*; **35**: 58-66.
17. Biedermann KA, Sun JR, Giaccia AJ, Tosto LM, Brown JM (1991) scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **88**: 1394-7.
18. Deschavanne PJ, Chavaudra N, Fertil B, Malaise EP (1984) Abnormal sensitivity of some Cockayne's syndrome cell strains to UV- and gamma-rays. Association with a reduced ability to repair potentially lethal damage. *Mutat Res*; **131**: 61-70.
19. Nunez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V (1996) Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. *Radiother Oncol*; **39**: 155-65.
20. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*; **193**: 3-34.
21. Wallace SS, Murphy DL, Sweasy JB (2012) Base excision repair and cancer. *Cancer Lett*; **327**: 73-89.
22. Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*; **1**: 22-33.
23. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ (2012) Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*; **47**: 497-510.
24. de Boer J, Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*; **21**: 453-60.
25. Pollard JM, Gatti RA (2009) Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; **74**: 1323-31.

26. de Rosa V, Erkekoglu P, Forestier A, Favier A, Hincal F, Diamond AM, et al. (2012) Low doses of selenium specifically stimulate the repair of oxidative DNA damage in LNCaP prostate cancer cells. *Free Radic Res*; **46**: 105-16.
27. Millau JF, Raffin AL, Caillat S, Claudet C, Arras G, Ugolin N, et al. (2008) A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip*; **8**: 1713-22.
28. Valin A, Barnay-Verdier S, Robert T, Ripoché H, Brellier F, Chevallier-Lagente O, et al. (2009) PTCH1 +/- dermal fibroblasts isolated from healthy skin of Gorlin syndrome patients exhibit features of carcinoma associated fibroblasts. *PLoS One*; **4**: e4818.
29. Ridley AJ, Whiteside JR, McMillan TJ, Allinson SL (2009) Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*; **85**: 177-95.
30. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (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.
31. Huang XX, Scolyer RA, Abubakar A, Halliday GM (2012) Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase-1 is downregulated in human basal cell carcinoma. *Mol Genet Metab*; **106**: 127-30.
32. Audebert M, Chevillard S, Levalois C, Gyapay G, Vieillefond A, Klijanienko J, et al. (2000) Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res*; **60**: 4740-4.
33. An Q, Robins P, Lindahl T, Barnes DE (2005) C --> T mutagenesis and gamma-radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases. *EMBO J*; **24**: 2205-13.
34. Naidu MD, Mason JM, Pica RV, Fung H, Pena LA (2010) Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1. *J Radiat Res*; **51**: 393-404.
35. Sobol RW, Horton JK, Kuhn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, et al. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*; **379**: 183-6.
36. Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*; **15**: 2177-96.
37. Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*; **14**: 397-402.
38. O'Driscoll M (2009) Mouse models for ATR deficiency. *DNA Repair (Amst)*; **8**: 1333-7.
39. Shiloh Y (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*; **11**: 71-7.
40. Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y (2002) ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*; **1**: 3-25.
41. Forestier A, Douki T, Sauvaigo S, De Rosa V, Demeilliers C, Rachidi W (2012) Alzheimer's disease-associated neurotoxic peptide amyloid-beta impairs base excision repair in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci*; **13**: 14766-87.
42. Jugan ML, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, et al. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*; **6**: 501-13.
43. Arbault S, Sojic N, Bruce D, Amatore C, Sarasin A, Vuillaume M (2004) Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes. *Carcinogenesis*; **25**: 509-15.

GENE NAME	GENE BANK ENTRY	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
<i>MYH</i>	NM_012222.2	ccagagagtggagcaggaac	tttctggggaagttgaccac
<i>UNG</i>	NM_080911.1	aatggcagctgtatccaacc	cacccaacatctgtcactg
<i>OGG1</i>	NM_002542.5	tggaagaacaggcgggcta	atggacatccacgggcacag
<i>APE1</i>	NM_001641.2	gctgcctggactctctatc	gctgttaccagcacaacga
<i>Polβ</i>	NM_002690.1	gagaagaacgtgagccaagc	cgatcatctgccgaatct
<i>LigIII</i>	NM_013975.2	gctcagcaggagatggttc	tctaggctccgtgcatatc
<i>ATM</i>	NM_000051.3	ggacagtggaggcacaaat	gtgtcgaagacagctggtga
<i>ATR</i>	NM_001184.3	ctcgtgaactgtactgga	gcatagctcgaccatggatt
<i>DNA-PKcs</i>	NM_006904.6	catggaagaagatcccaga	tgggcacaccactttaacaa
<i>Rad50</i>	NM_005732.2	cttgatgatcgaggacgat	ccagaagctggaagttagc
<i>LigIV</i>	NM_002312.3	ggacgatttctccgtttt	gcggtgatgaatcttctctg

Table 1: List of the primers used for the RT-qPCR experiments. Reaction mix contains 10 ng of each cDNA, Takyon™ qPCR MasterMix, and primers forward and reverse. qPCR was performed in an MX3005p Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, CA, USA) and the amplification's integrity was checked at the end of each run.

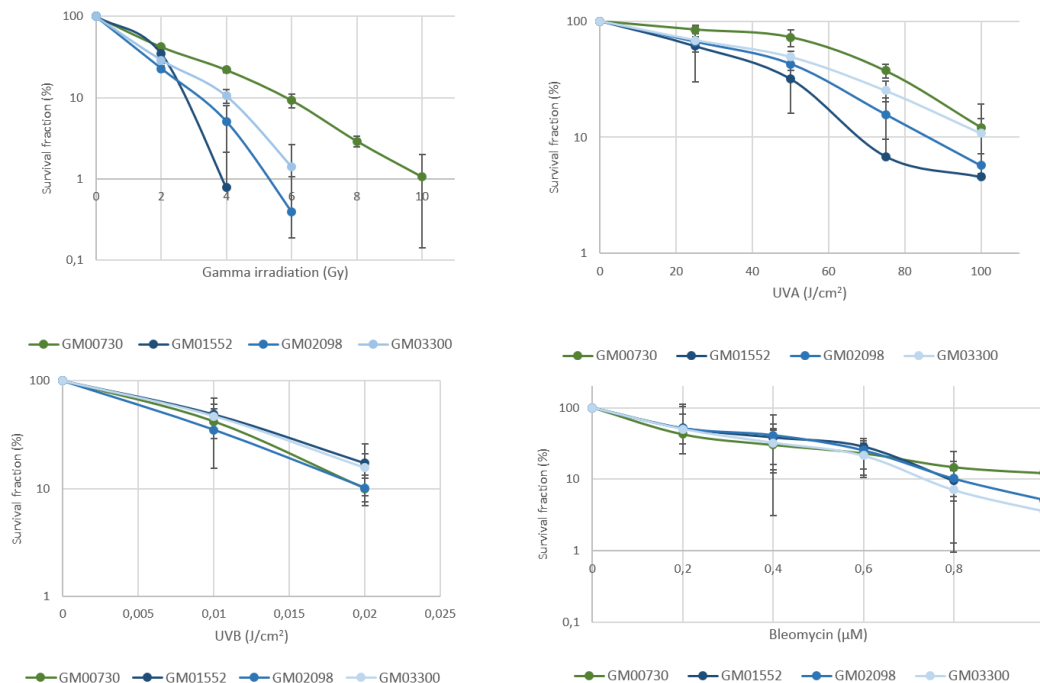


Figure 1: Long term survival curves determined thanks to the clonogenic assay. Cells are plated at low density, stressed on the second day and cultured for 2 weeks. Crystal violet is used to reveal forming colonies. We tested 4 stress: ionizing radiation, UVA, UVB and bleomycin. Anova one way demonstrate a sensitivity of the NBCCS fibroblasts for the IR and UVA radiation while no sensitivity was found for the two others.

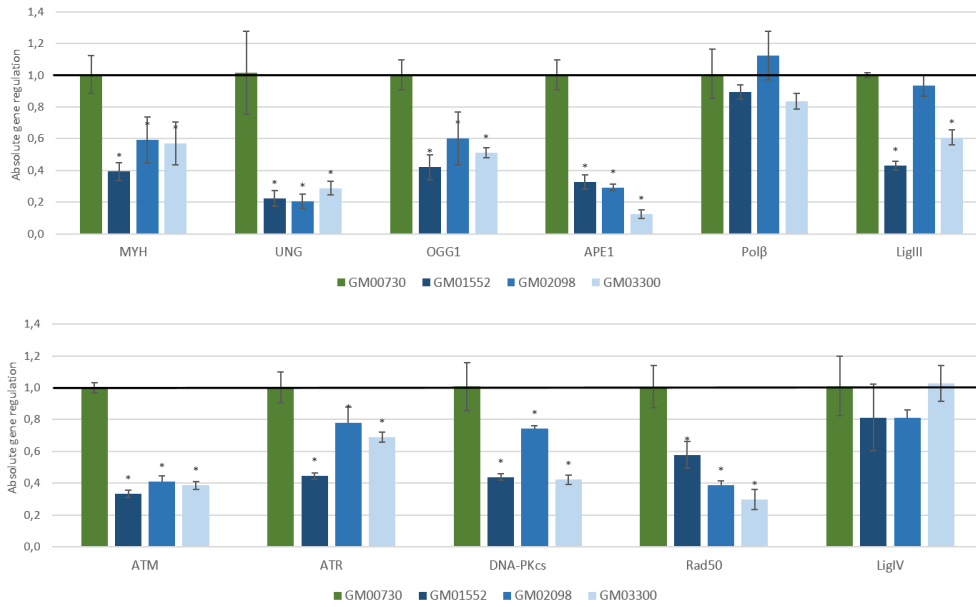


Figure 2: RNA quantitative expression of NBCCS and control fibroblasts at basal level determined by RT-qPCR experiments. The calibrator use is GM00730 non-irradiated. The upper panel reports results for the BER genes while the lower one shows data for the DNA double strand breaks repair. Collapse of BER glycosylases gene expression as well as DNA Damage Response gene signaling is demonstrate here. As concerned, no statistical differences in the expression of the polymerase beta was found. * significantly ($p < 0.05$) different from the normal cell line (GM00730).

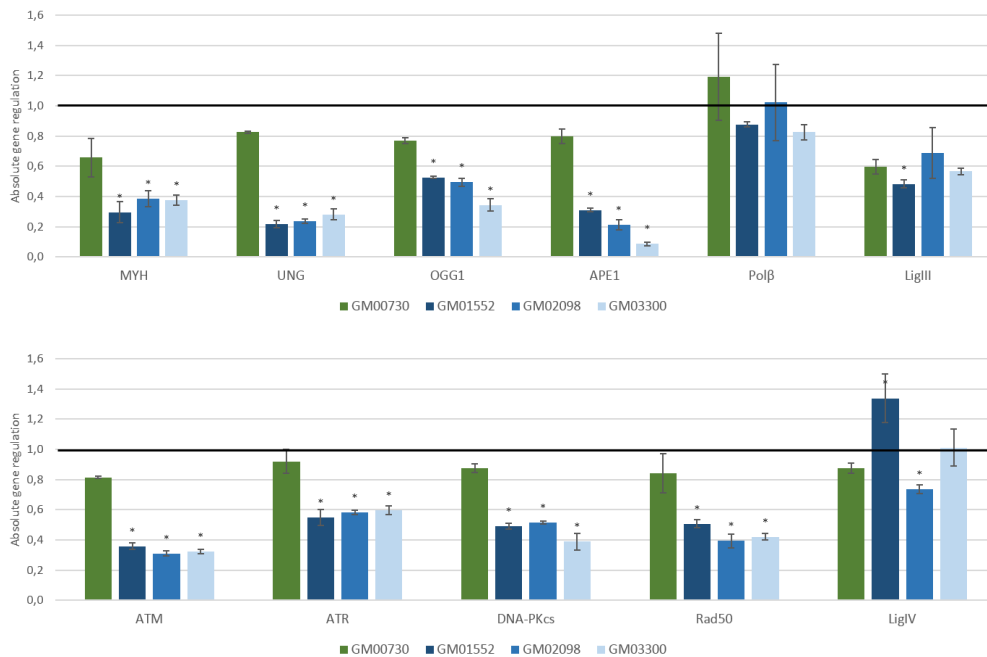


Figure 3: RNA quantitative expression of NBCCS and control fibroblasts after a 6 Gy ionizing radiation determined by RT-qPCR experiments. The calibrator use is GM00730 non-irradiated. The upper panel reports results for the BER genes while the lower one shows data for the DNA double strand breaks repair. Collapse of BER glycosylases gene expression as well as DNA Damage Response gene signaling is demonstrate here. As concerned, no statistical differences in the expression of the polymerase beta was found. Furthermore, gene expression of the normal cell line is decreased after a stress.

* significantly ($p < 0.05$) different from the irradiated normal cell line (GM00730).

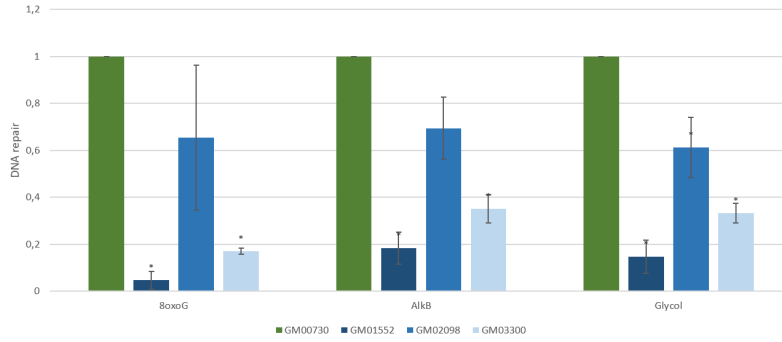


Figure 4: Basal DNA excision-synthesis activity determined using the multiplexed plasmid biochips comparing the normal primary human fibroblasts and the three NBCCS fibroblasts at basal level. 8-oxoG, AlkB and Glycol are found to be less repaired in Gorlin's fibroblasts.

* significantly ($p < 0.05$) different from the normal cell line (GM00730).

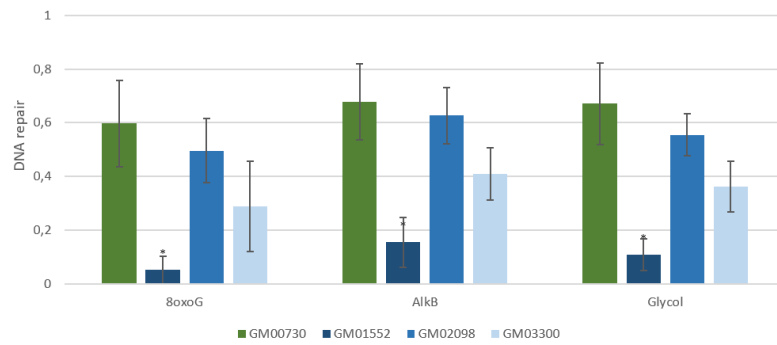


Figure 5: Basal DNA excision-synthesis activity determined using the multiplexed plasmid biochips comparing the normal primary human fibroblasts and the three NBCCS fibroblasts after a 6 Gy irradiation. Once again, 8-oxoG, AlkB and Glycol are found to be less repaired in Gorlin's fibroblasts. It is noteworthy that the excision-resynthesis activity of GM00730 after a stress is decreasing as compared to the same cell line without irradiation.

* significantly ($p < 0.05$) different from the irradiated normal cell line (GM00730).

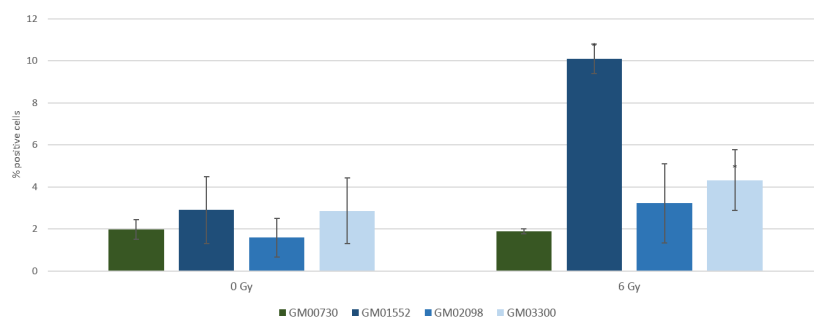


Figure 6: Anion superoxide production in the Gorlin and normal fibroblasts 25 min post-stress. FACS analysis using MitoSOX™ have demonstrate that there is no significant differences in the production between all cell lines at basal level. On contrary, GM01552 and GM03300 produces more anion superoxide than the GM00730 after a 6 Gy ionizing radiation.

* significantly ($p < 0.05$) different from the normal cell line (GM00730)

Annexe 5 : Communications scientifiques, encadrements de stagiaires et articles

Communications scientifiques

- Congrès annuel de l'European Radiation Research Society (41^{ème}, Rhodes, Grèce) : présentation orale (dans le cadre de la bourse Young Investigator Award) et présentation d'un poster.
- Congrès 'Plasticité et Intégrité du Génome' (PIG 10^{ème} édition, Grenoble, France) : présentation d'un poster.

Encadrements de stagiaires

- Wafaa BAYA, étudiante Master 1 de l'Université Joseph FOURIER
- Prakriti HALDIA, étudiante Master 2 Erasmus Mundus (Inde)

Articles

- Article soumis '*Impairment of base excision repair in dermal fibroblasts isolated from Nevoid Basal Cell Carcinoma patients*'.
- Article en préparation '*Proteomic study of PTCH1 impact in dermal fibroblasts*'.
- Article en préparation '*Proteomic study of irradiation impact in dermal fibroblasts isolated from Nevoid Basal Cell Carcinoma patients*'.