



Étude des conséquences génétiques et épigénétiques consécutives à la signalisation persistante des dommages radio-induits de l'ADN

Aurélie Vaurijoux

► To cite this version:

Aurélie Vaurijoux. Étude des conséquences génétiques et épigénétiques consécutives à la signalisation persistante des dommages radio-induits de l'ADN. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS515 . tel-01500100

HAL Id: tel-01500100

<https://theses.hal.science/tel-01500100>

Submitted on 2 Apr 2017

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.

NNT= 2016 SACL5 515

**THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD**

**ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et dynamique des systèmes vivants**

Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Aurélie Vaurijoux

**Etude des conséquences génétiques et épigénétiques consécutives
à la signalisation persistante des dommages radio-induits de l'ADN**

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 12 décembre 2016

Composition du Jury :

Pr. Suzanne Sommer
Pr. Ruth Wilkins
Pr. Francis Rodier
Dr. Janet Hall
Dr. Carl Mann
Pr. Joan Francesc Barquinero
Dr. Gaëtan Gruel

Professeur émérite, Université d'Orsay, Paris-Sud
Professeur adjoint, Université de Carleton, Canada
Professeur, Université de Montréal, Canada
Directrice de recherche, CRC, Lyon
Directeur de recherche, CEA, Saclay
Professeur, Université Autonome de Barcelone, Espagne
Chercheur, IRSN, Fontenay-aux-Roses

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse



Thèse réalisée au

Laboratoire de dosimétrie biologique de l'IRSN

31 avenue de la division Leclerc

BP 17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex

Sous la direction de

Joan Francesc Barquinero (Francesc.Barquinero@uab.cat)

et Gaëtan Gruel (gaetan.gruel@irsn.fr)

Financée par

EDF

*« Même pour le simple envol d'un papillon,
tout le ciel est nécessaire. »*

Paul Claudel

*« Si tu ne changes pas de direction,
tu pourrais bien aboutir là où tu te diriges. »*

Lao Tseu

Sommaire

Remerciements	6
Liste des abréviations	10
Préambule	12
 PARTIE I. ETAT DE L'ART DE LA REPONSE CELLULAIRE A UN STRESS RADIO-INDUIT	 14
1. Les interactions des rayonnements ionisants avec la matière à l'échelle atomique : quelques notions de physique	15
1.1. Nature des rayonnements ionisants	15
1.2. Interaction des rayonnements X avec la matière au niveau atomique	16
2. Les interactions des rayons X avec les composants cellulaires	19
2.1. Radiolyse de l'eau	19
2.2. Altération des lipides membranaires	20
2.3. Altération des protéines	22
2.4. Dommages de l'ADN	22
3. Signalisation cellulaire de la cassure double-brin de l'ADN	27
3.1. Structure de la chromatine	27
3.1.1. Organisation générale	27
3.1.2. Nucléosome l'unité de base de la chromatine	28
3.1.3. Changement d'état de la chromatine	31
3.2. Modulation de l'organisation de la chromatine suite à des dommages de l'ADN	35
3.2.1. Etat de la chromatine au moment du dommage	35
3.2.2. Modulation de la chromatine et signalisation des dommages de l'ADN	35
3.3. Cas particulier du variant d'histone H2A.X	37
3.3.1. Quelques notions de phylogénie	38
3.3.2. Les modifications post-traductionnelles du variant d'histone H2A.X	39
3.3.3. Rôles de la phosphorylation sur la sérine 139 de l'histone H2A.X (γ H2A.X)	40
4. Gestion cellulaire des cassures double-brin de l'ADN et devenir cellulaire	45
4.1. Perturbation du cycle cellulaire	45
4.1.1. Description générale du cycle cellulaire	45

4.1.2. Arrêt du cycle cellulaire lié à la phase du cycle	48
4.2. Réparation des dommages de l'ADN	51
4.2.1. Réparation de la séquence lésée de l'ADN	51
4.2.2. Restauration de la chromatine	53
4.3. Devenirs cellulaires possibles	55
4.3.1. La mort cellulaire radio-induite	56
4.3.2. La sénescence cellulaire	64
4.3.3. L'instabilité génomique radio-induite	65
PARTIE II. OBJECTIFS DE THESE	67
PARTIE III. MATERIELS ET METHODES	70
1. Stratégie expérimentale	71
2. Modèle cellulaire et cultures	73
2.1. Modèle cellulaire	73
2.2. Culture cellulaire	73
2.2.1. Maintien des cellules en culture	73
2.2.2. Condition d'ensemencement pour l'irradiation	74
3. Condition d'irradiation	74
4. Traitement post-irradiation	75
4.1. Incorporation du BrdU	75
4.2. Cytochalasine B	76
5. Marquages par immunofluorescence	77
5.1. Protocole de marquage par immunofluorescence	77
5.2. Validation des anticorps utilisés	78
5.3. Acquisition par microscopie à fluorescence	80
6. Méthodologie analytique	80
6.1. Analyses des images	80
6.2. Analyses des données	83
6.2.1. Analyses des foyers γ H2A.X	84
6.2.2. Création de foyers simulés	85
6.2.3. Colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X	87

6.2.4. Association des CN-PML avec les foyers γ H2A.X	88
6.2.5. Analyse de la prolifération cellulaire	89
6.3. Analyse des cellules binucléées	90
6.4. Analyse des anomalies de ségrégation mitotique	90
PARTIE IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX	91
1. Evolution temporelle de la signalisation des dommages de l'ADN	92
1.1. Cinétique des foyers γ H2A.X	92
1.2. Cinétique des aires des foyers γ H2A.X	94
1.3. Colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X	98
1.4. Quantification de la densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X	100
1.5. Quantification de l'acétylation sur la lysine 16 de l'histone H4 au niveau des foyers γ H2A.X	103
1.6. Evolution du taux de cellules ayant des foyers γ H2A.X persistants au cours du temps	104
2. Etude de l'impact des foyers persistants sur le cycle cellulaire	106
2.1. Foyers persistants et cycle cellulaire	106
2.1.1. Perturbation du cycle cellulaire après irradiation	106
2.1.2. Présence de foyers persistants au sein de cellules ayant cyclée	108
2.2. Transmission des foyers persistants aux cellules filles	111
2.2.1. Evolution des distributions des foyers persistants avant et après division cellulaire	111
2.2.2. Foyers persistants dans les cellules filles	114
2.2.3. Foyers persistants et anomalies de ségrégation mitotique	115
3. Etude de l'association des corps nucléaires PML et des foyers γH2A.X	117
3.1. Dynamique des corps nucléaires PML en réponse à l'irradiation	117
3.2. Dynamique d'association des corps nucléaires PML et des foyers persistants	118
3.3. Evolution de cette association après la division cellulaire	121
PARTIE V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	123
1. Caractéristiques des foyers γH2A.X persistants	124
2. La persistance de certains foyers γH2A.X a-t-elle des causes identifiables ?	128

3. L'association entre les foyers γ H2A.X et les corps nucléaires PML comme marqueur précoce de dommages persistants ?	130
4. Les foyers persistants ne bloquent pas définitivement le cycle cellulaire	134
5. Impact de la division cellulaire sur la structure signalisée par les foyers persistants	137
 PARTIE VI. CONCLUSION GENERALE	 141
 PARTIE VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 145
 ANNEXE : PUBLICATION ASSOCIEE	 168

Remerciements

Le métier de chercheur est un véritable sacerdoce de patience, d'endurance et d'humilité. Dis comme ça, je suis d'accord je ne vends pas du rêve ! Seulement, il permet de pouvoir sans cesse abreuver une insatiable soif de curiosité et surtout, tous les jours, voir la beauté de la Vie. Et « juste » pour ça c'est une chance incroyable de pouvoir encore exercer ce métier.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir pris de leur temps pour d'évaluer mes travaux de thèse et d'être venus, pour certains de loin, pour participer à ma soutenance. Merci à Suzanne Sommer d'avoir endossé le rôle de présidente du jury. Merci à Ruth Wilkins et Francis Rodier d'avoir accepté le dur rôle de rapporteur. Merci également à Janet Hall d'avoir accepté d'être examinatrice. Et enfin, merci à Carl Mann, d'avoir accepté d'être examinateur et également d'avoir participé à mes comités de thèse en apportant une vision extérieure sur mon travail qui m'a beaucoup aidé.

Je remercie infiniment mes deux directeurs de thèse, Joan Francesc Barquinero et Gaëtan Gruel d'avoir fortement contribué à mon apprentissage de ce métier en me permettant de faire une thèse. Paco, merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse sans me connaître, ou presque, sur un sujet qui n'était pas initialement dans tes propres recherches. Je ne saurais assez te remercier d'avoir su tenir ce rôle, magnifiquement bien, malgré la distance lors de ton retour à Barcelone. J'ai adoré venir à Barcelone faire les bilans de mes avancées de thèse et boire une bonne bière après. Ta force de « dinosaure » m'a beaucoup porté lors de ces années de thèse durant lesquelles les moments de doutes sur mon travail ont été nombreux. Gaëtan, mille milliard de merci (et encore c'est une goutte d'eau dans l'océan de ma gratitude) de m'avoir soutenu depuis que j'ai repris mes études, 8 années, c'est à la fois long et tellement riche, d'avoir été là pour les moments de rire, de joie, de doutes et de stress intense... et de m'avoir guidé et poussé à chercher toujours « ce qu'il y a derrière » ce qu'on voit, entend, expérimente. C'est un plaisir de travailler avec toi professionnellement parlant, tellement tu aimes ce que tu fais et que tu le transmets très bien et également, et pas des moindres, humainement parlant, de par ta patience hors pair (il en faut beaucoup dans certains cas) et ta profonde empathie.

A tous les deux, je vous dois aussi de m'avoir transmis le grand art, initialement inconnu pour moi, de partager de façon claire des travaux de recherche issus de mille

pérégrinations intellectuelles, expérimentales et encore intellectuelles, en somme mes nouveaux « talents » de pédagogues (bon je modère un peu, y a encore du boulot !). Une chose est sûr sans vous je crois que personne n'aurait encore rien compris à mon travail.

Je tiens également à te remercier, Laurence Roy, de m'avoir permis d'entrée à l'IRSN en tant que technicienne supérieure de laboratoire (LDB), lorsque tu étais responsable du laboratoire de dosimétrie biologique, de m'avoir confié le projet de développement de la détection automatique des dicentriques au laboratoire et surtout pour ton appui dans ma reprise d'étude. Un merci également à Jocelyne Aigueperse, directrice du pôle de radioprotection de l'Homme, et à Philippe Voisin, ancien responsable du service de radiobiologie et d'épidémiologie, d'avoir accepté mon congé Fongecif pour mon année de Master 2 et de m'avoir permis de réintégrer le laboratoire avec un poste d'ingénieur-chercheur. Je remercie également, Marc Benderitter, son successeur, d'avoir pris en compte mon statut particulier d'ingénieur-chercheur titulaire en doctorat.

Pleins de pensées accompagnées de mille mercis à tous mes collègues du LDB, Pascale Voisin, Eric Grégoire, Cécile Martin-Bodiot, Sandrine Roch-Lefèvre, Amélie Fréneau, Géraldine Gonon, Delphine Dugué et Céline Baldeyron. Pour la plus part ça fait longtemps que nous travaillons ensemble et avec tout ce temps passé au labo, vous êtes un peu une seconde famille avec des hauts, souvent, et des bas, parfois. Il ne me faut pas être « vexable » quand on entre au LDB et franchement, merci beaucoup de maintenir active ma faculté d'autodérision, dans la joie et la bonne humeur, bien sûr ! A tous, merci également pour votre compréhension de mon « upgrade » de poste au sein du labo. Pour moi, ce n'était pas acquis d'avance, et je vous remercie pour ça.

Pascale, ton soutien sans faille, tes paroles compréhensives et rassurantes lors de mes périodes de doute et de stress m'ont été très précieuses. Je te remercie beaucoup également de m'avoir supporté lors de mes phases de complaints qui m'ont semblé interminables. Eric, merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ton inépuisable capacité à rendre service aux autres dans la joie et surtout ton sens de l'humour « high level », c'est vraiment chouette. Cécile, merci de ton soutien depuis toutes ces années. Amélie, petit, que dis-je, grand soleil, merci d'avoir illuminé mes interminables journées de rédaction par ta furieuse joie de vivre et merci également pour ton précieux soutien. J'espère pouvoir t'apporter au moins autant lorsque ça sera ton tour, jeune padawan. Géraldine, s'il te plaît, n'arrête surtout pas de raconter ta vie abracadabrante, c'est à mourir de rire et franchement ça fait du bien, merci. Delphine petite dernière arrivée au labo, je suis contente que tu ais été recrutée, je suis sûr qu'avec Géraldine vous allez mener des

travaux supers avec le microfaisceau, j'ai hâte de voir ça. Céline, merci pour nos discussions sur les mécanismes de réparation de l'ADN, j'ai appris beaucoup de choses.

Je tiens également à remercier tous mes collègues du service de radiobiologie et d'épidémiologie (SRBE) pour vos paroles de soutien et d'encouragement au détour d'un couloir, Valérie Buard, George Tarlet, Claire Squiban, Tény Ebrahimián, Jean Marc Bertot, Stéphane Grison, Olivier Guipaud, Véronique Joffres et tous les autres. Un merci tout spécial à Fabien Milliat et Agnès François pour votre soutien et vos questions pertinentes lors de la préparation de ma soutenance de thèse.

Une pensée à tous les thésards, encore là ou déjà partis. Je sais que je ne suis pas venue souvent mais les rares fois c'était chouette de boire un coup ou manger un morceau avec vous, Cyprien, Jérémy, Frédéric, Clélia, Stéfania, Sabine, Lucie... Elodie et Benoit, je ne vous oublie pas, franchement, notre périple au Japon est mémorable pour moi, je suis vraiment contente d'y être allée avec vous. Benoit, merci aussi d'être venu souvent dans mon bureau pour m'arracher aux doigts crochus de R et égayer certaines de mes longues après-midi de programmation/triturage de cervelles avec tes blagues.

Un petit mot, pour un grand merci, à « mon assistance » préférée, Sandra Barth (avec un « h » muet), je crois que tu es dans le « top 10 » des gens excentriques sur cette terre, petite licorne, merci pour tes vocalises, tes paillettes et ton absence totale d'inhibition, ça fait du bien de ne pas se prendre trop au sérieux.

Toujours à l'IRSN, une pensée également accompagnée d'un grand merci pour ta disponibilité et ta gentillesse Yoann Ristic, sans toi je n'aurais pas pu réaliser ce travail, puisque sans irradiation pas de dommages... Merci également à Marion Baumann et Laurent Van Ryckeghen d'avoir fait les mesures dosimétriques des configurations pour Alphée. Un merci également à toi Carmen Villagrasa, d'avoir apporté ton regard de physicienne sur mon travail. Une pensée accompagnée d'un merci également à Patrick Laloï pour son soutien.

Je ne peux pas clore ces remerciements sans citer et souligner le soutien sans faille de mes amis et de ma famille durant cette longue entreprise qu'a été ma reprise d'étude. Un univers de mercis, et ça n'est pas encore assez, à mes parents pour votre inconditionnel soutien et votre amour qui me porte chaque jour. J'espère que je vous apporte au moins autant d'amour. A ma Mamy, qui malgré la distance m'a soutenu et est présente dans mes pensées et mon cœur. A mon Papy, dont la présence reste toujours dans mon cœur. A Olivier, avec qui je partage mon cœur, mon quotidien, une grande partie de mes rêves et crée de beaux moments chaque jour. Sans toi, je ne sais pas si

j'aurais fini cette thèse, ton réconfort, ton soutien et ton amour inconditionnel de chaque instant a été et est encore aujourd'hui une pépite, un grigri, dont la valeur ne peut être décrite. C'est une grande joie, d'avoir partagé avec toi ces moments d'émerveillements mais aussi de stress et de remise en question que crée la condition de thésards.

Un énorme clin d'œil à Daphné, Michaël, Manue, Arno, Marco, Benoît, Cindy, Vincent, Delphine, Julien, Anne Claire, Matthieu, Florence et Guillaume pour votre encouragement lors des moments de ras le bol. Nos moments ensemble, téléphones, soirées, week-end, vacances, ont été (et seront encore) des moments partagés de joie, de rire, de grandes réflexions à l'état pur (blague !) et ont participé grandement aux « changements d'idées » obligatoires pour ne pas finir cloîtré ou même fou...

Une pensée et des mercis également pour votre soutien, Philippe, Chantal, Murielle, Françoise, Michel, François et Lise. Philippe, c'est un peu à toi que je dois mes premiers pas dans « les rayonnements ionisants », tu vois, 12 ans après j'y suis encore... Françoise, merci beaucoup encore pour tes gâteaux et ton aide précieuse pour mon pot de thèse.

Je remercie enfin mes tatas et tonton, Thérèse, Madeleine, Martine et Jacky, de s'être déplacés de Normandie pour venir à ma soutenance, votre présence et votre soutien durant ce moment important m'ont fait extrêmement plaisir.

Liste des abréviations

mSv : milli Sievert

eV : Electron Volt

Gy : Gray

ROS : Reactive Oxygen Species

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CDB : Cassure Double-Brin

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

NHEJ : Non Homologous End-Joining

HR : Homologous Recombination

53BP1 : p53-Binding Protein 1

BRCA1 : BReast CAncer 1

SWI/SNF : SWItch/Sucose Non-Fermentable

Ser-Gln-(Glu/Asp) : Sérine-Glutamine-(acide Glutamique/acide Aspartique)

MPT : Modification Post-Traductionnelles

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit

ATR : ATM and Rad3-related

NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome

MRE11 : Meiotic REcombination 11

ATRIP : ATR-Interacting Protein

CdK : Cycline-dependant Kinase

Myt1 : MYelin Transcription factor 1

CKi : CdK inhibitor

Chk1 : Check Point 1

Chk2 : Check Point 2

PCAFM : Point de Contrôle de l'Assemblage du Fuseau Mitotique

MCC : Mitotic Checkpoint Complex

Mad : Mitotic Arrest Deficient

Bud : Budding Uninhibited by Benomyl

APC : Anaphase-Promoting Complex

PP2A : Protein Phosphatase 2A
TNF : Tumoral Necrosis Factor
PUMA : P53-Upregulated Modulator of Apoptosis)
p53AIP1 : p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1
BAX : BCL2 associated X
APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1
Atgs : Autophagy-related genes
LC3 : microtubule-associated protein 1 Light Chain 3
PARP-1 : Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PML : ProMyelocytic Leukemia
CN-PML : Corps Nucléaire PML
FITC : Fluorescein Isothiocyanate
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
BrdU : 5-Bromo-2'-deoxyUridine
H4K16ac : lysine 16 de l'histone H4 acétylée
IR : irradiation
PCC : Premature Chromosome condensation

Préambule

Les rayonnements ionisants impactent les organismes vivants depuis le début de leur existence sur terre. Ils sont d'origine tellurique et cosmique, ces expositions sont dites naturelles. Les utilisations des rayonnements ionisants par l'Homme sont diverses, ajoutant en plus de l'irradiation naturelle d'autres sources d'exposition. Ils sont présents aussi bien dans le domaine industriel (bâtiment, alimentaire, centrale nucléaire, *etc.*) que dans le domaine médical au niveau diagnostic (scanner, mammographie, radiographie interventionnelle, scintigraphie, *etc.*) et thérapeutique (radiothérapie externe et interne). L'exposition aux rayonnements ionisants est actuellement estimée à en moyenne 4,5 mSv par an sur l'ensemble de la population humaine (IRSN, 2016). Ce chiffre est une moyenne car suivant la zone d'habitation, le type de sol, l'altitude et le nombre d'examens médicaux, toute la population n'est pas exposée exactement à la même dose de rayonnements ionisants. De plus, le taux d'exposition tend à augmenter avec le temps notamment due à l'utilisation croissante des rayonnements ionisants dans la sphère médicale. En effet, entre 1988 et 2008, la dose reçue estimée à augmenter de 0,25 mSv (UNSCEAR 2008, 2010).

Les effets des rayonnements ionisants sur l'homme sont étudiés depuis le début du 20^{ième} siècle (radiobiologie), avec deux objectifs principaux et potentiellement contradictoires : le traitement à travers leur efficacité à éradiquer les cellules cancéreuses, et la radioprotection pour mieux définir l'impact des différents types de rayonnements sur l'homme et protéger les travailleurs (industrie, nucléaire) ainsi que le public (médical). Ce dernier point a conduit la commission internationale de protection radiologique à définir différents seuils d'exposition maximale par an pour les travailleurs et pour le public (ICRP, 2007).

La dangerosité des rayonnements ionisants a la même origine que ce qui fait leur efficacité à éliminer les cellules cancéreuses : ils interagissent avec les différents constituants cellulaires en provoquant des altérations qui conduisent notamment à la mort cellulaire. Ainsi ce qui est délétère pour une cellule cancéreuse à de fortes chances de l'être aussi pour les cellules saines environnantes. De plus, suivant le taux de dommages induits au sein des cellules la

mort n'est pas systématique. Que cela passe par la sénescence ou l'instabilité génomique dans les générations cellulaires suivantes, il y a perturbation de l'homéostasie tissulaire. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte et dans l'objectif d'apporter de nouveaux éléments expérimentaux à la connaissance des effets des rayonnements ionisants à l'échelle cellulaire ainsi que dans l'espoir fou d'une possible extrapolation à l'échelle tissulaire.

En 2016, cela fait plus de 120 ans que la radioactivité fut découverte par Henri Becquerel puis Marie Curie et plus de 90 ans que leur dangerosité fut établie. Les techniques expérimentales ont considérablement évolué depuis et de nombreuses découvertes s'y sont ajoutées. Toutes les connaissances répertoriées dans ce manuscrit sont, autant que faire se peut, à lire au regard des choses connues, démontrées ou postulées à ce jour. Toutes pourront être remises en cause, infirmées ou confirmées dans 1 heure, 1 mois, 1 an, 10 ans... Car tous concepts et idées sont faits pour évoluer avec un regard chaque jour renouvelé par les avancées scientifiques.

Partie I.

**Etat de l'art de la réponse
cellulaire à un stress radio-induit**

1. Les interactions des rayonnements ionisants avec la matière à l'échelle atomique : quelques notions de physique

1.1. Nature des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants se caractérisent par leur capacité à créer, a minima, des ionisations et/ou excitations en traversant la matière. C'est-à-dire qu'ils vont induire un mouvement dans le cortège électronique des atomes, soit en arrachant les électrons (ionisation) (*Figure 1.1.1, A*) soit en les faisant changer de couche électronique (excitation) (*Figure 1.1.1, B*). Suivant leur nature et leur énergie initiale, leur probabilité d'interaction avec la matière traversée ne sera pas la même. Ainsi, nous distinguons les particules ionisantes et les rayonnements électromagnétiques.

Les particules ionisantes possèdent une masse et une charge. C'est le cas des ions Hydrogènes (H^+), Hélium (He^{2+}), Fer (Fe^{2+}), par exemple, mais également des électrons ou positrons. Naturellement, les électrons/positrons et He^{2+} (particules β et α , respectivement) sont émis lors de la désintégration de radionucléides, c'est-à-dire lors de la transition d'un atome non stable vers un atome stable. Ces radionucléides peuvent être d'origine naturelle tels que l'Uranium 238 et le Carbone 14, ou artificielle tels que le Césium 137 et le Cobalt 60. Les protons et des ions accélérés sont issus de réactions nucléaires telles que celles qui ont lieu au sein du soleil, par exemple. Leur caractéristique ionisante peut également être obtenue artificiellement par accélération au sein d'accélérateurs de particules. Toutes ces particules ionisantes portent une charge énergétique qu'elles vont progressivement déposer lors de leur interaction avec la matière, en créant directement des ionisations et des excitations.

Les rayonnements électromagnétiques ionisants sont des photons ayant une longueur d'onde inférieure à 10 nanomètres. Nous distinguons les rayonnements X et les rayonnements γ . Les rayonnements X sont émis par la désexcitation d'un électron lorsqu'il change de couche électronique, qui peut avoir lieu lors de la désintégration de certains radionucléides. Les rayonnements γ , quant à eux, sont produits par la transition d'un noyau excité vers un noyau stable, et ceci souvent à

la suite d'une désintégration α ou β , comme dans le cas du Césium 137 et du Cobalt 60. De par leur origine, les spectres énergétiques des rayonnements X et γ , ne sont pas les mêmes. Dans le cas des rayons X, c'est un spectre énergétique continu qui est obtenu alors que pour les rayonnements γ se sont une ou plusieurs raies mono-énergétiques.

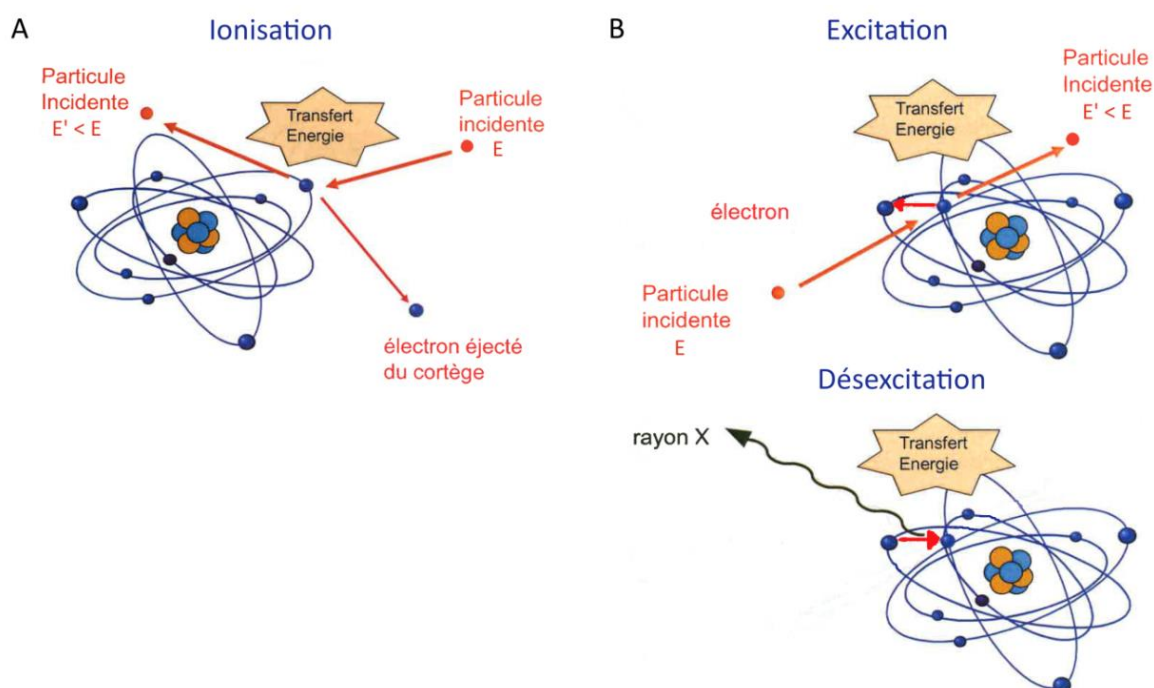


Figure I.1.1 : Interaction d'une particule ionisante avec un atome. (A) Une ionisation se produit quand la particule transfère une partie de son énergie (E) à un électron du cortège électronique et que cette énergie est suffisante pour qu'il soit éjecté de l'atome. La particule est déviée de sa course avec une énergie (E') moins importante ; **(B)** Une excitation se produit quand la particule transfère une partie de son énergie à un électron du cortège électronique, le faisant changer de couche électronique. Un rayon X est produit lors de la désexcitation de l'électron, c'est-à-dire lorsqu'il regagne sa position initiale. Adaptée du cours « Radioactivité » de l'INSTN.

1.2. Interaction des rayonnements X avec la matière au niveau atomique

Dans le cadre de ce travail de thèse, ce sont des rayonnements X issus d'un générateur de type médical qui ont été utilisés. Dans ce cas, les rayons X sont produits par accélération d'électrons entre une cathode et une anode généralement composée de tungstène ou de molybdène. L'impact des électrons sur

ce type de cible va induire l'excitation des électrons de la couche électronique des atomes de tungstène ou de molybdène. Leur désexcitation va libérer des rayons X avec un spectre d'énergie donné. En fonction de leur énergie qui est exprimée en électron volt (eV ; correspondant à environ $1,6 \times 10^{-19}$ joules), les photons n'interagissent pas de la même façon avec les atomes. Nous distinguons trois effets dont la probabilité d'apparition est directement liée à l'énergie du photon et à la matière exposée : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la production de paire (Figure I.1.2).

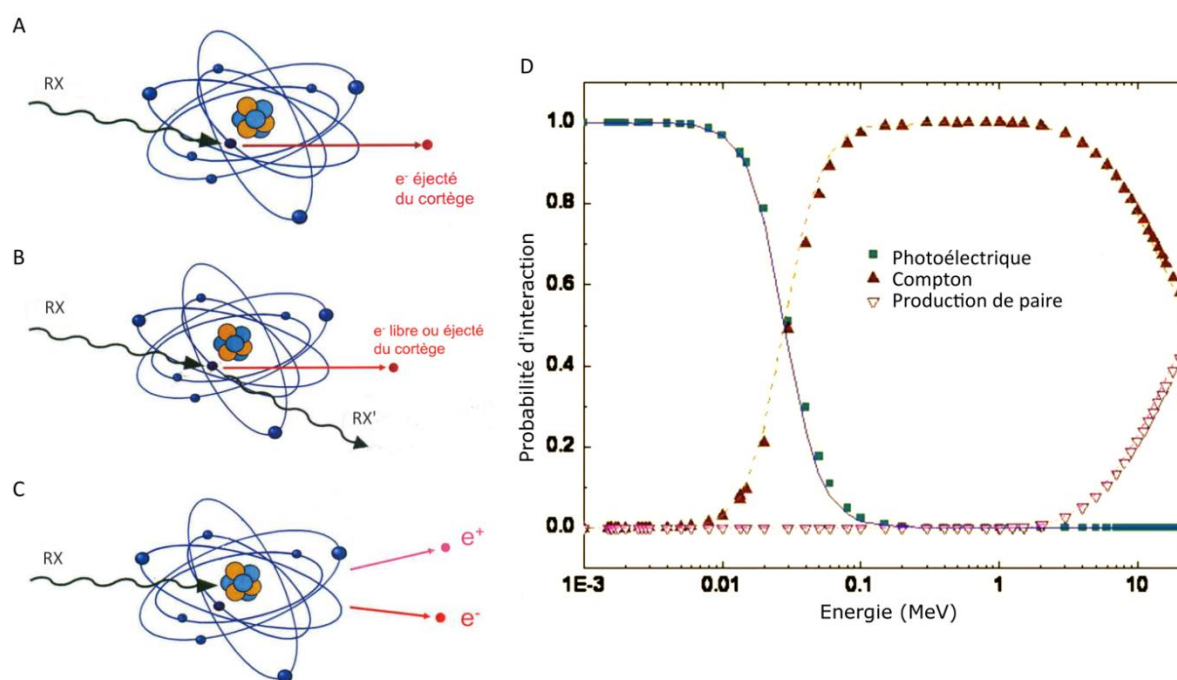


Figure I.1.2 : Effet des photons sur les atomes et probabilités d'occurrence suivant l'énergie. En fonction de l'énergie des rayons X, trois types d'interaction avec la matière sont possibles : **(A)** l'effet photoélectrique lorsque le rayon X transmet toute son énergie à un électron du cortège électronique de l'atome. Cette énergie est suffisante pour qu'il soit éjecté ; **(B)** la diffusion Compton lorsque le rayon X ne transmet qu'une partie d'énergie à un électron du cortège électronique de l'atome. Cette énergie est suffisante pour qu'il soit éjecté ; **(C)** la production de paire lorsque le rayon X impacte les électrons qui sont les plus proches du noyau de l'atome (appelé champs coulombien) produisant un électron et un positon. (Tirée du cours « Radioactivité » de l'INSTN). **(D)** Graphique représentant la probabilité qu'un photon produise un de ces trois effets lors de son interaction avec les molécules d'eau en fonction de son énergie initiale. Adaptée de (Gorjiara et al., 2011).

Dans les trois cas, il y a arrachage d'électrons ou production d'électrons/positons dits secondaires qui auront une énergie dépendante de celle

du rayon X incident. Ces électrons secondaires vont eux-mêmes créer des ionisations/excitations sur des atomes plus ou moins proches de l'interaction initiale. La répartition dans la matière de l'ensemble des ionisations/excitations produites, dépend de l'énergie des rayons X incidents (*Figure I.1.3*).

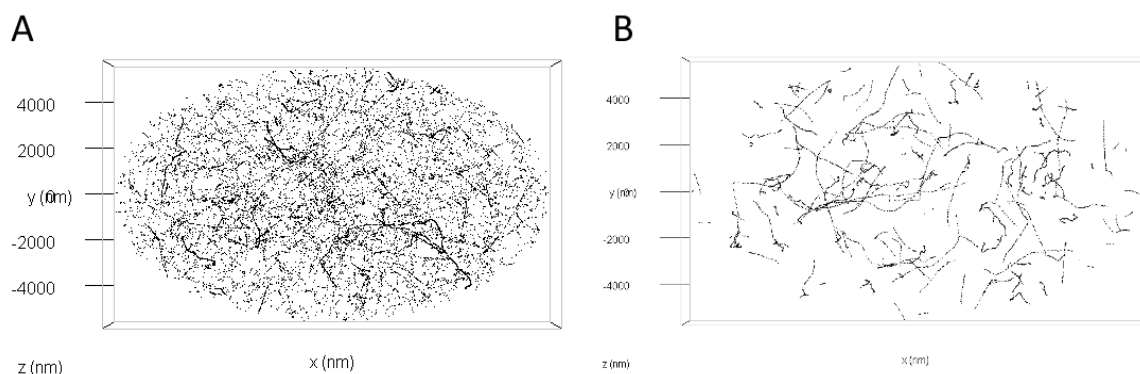


Figure I.1.3 : Répartitions des ionisations dans l'espace en fonction de l'énergie initiale des photons. Distribution dans l'espace des évènements d'ionisation des molécules d'eau dans un volume en trois dimensions X, Y et Z, correspondant à un noyau cellulaire. Simulations Monte Carlo faites pour une dose de 0,5 Gy et avec une énergie des photons incidents de : **(A)** 1.33 MeV (principalement de l'effet Compton) ou **(B)** 12 eV (principalement de l'effet photoélectrique. Travaux réalisés par Carmen Villagrasa et Gaëtan Gruel à l'IRSN.

La somme des énergies cédées à la matière irradiée lors des ionisations/excitations produites par les photons incidents et les électrons secondaires est nommée dose absorbée. Elle est exprimée en Gray (Gy) et correspond à des joules par kilogramme.

2. Les interactions des rayons X avec les composants cellulaires

Une cellule eucaryote est constituée de molécules qui sont toutes susceptibles d'être impactées et endommagées par les rayons X : pour commencer, l'eau sa composante principale ; ensuite, les lipides constituant les membranes, cytoplasmiques, nucléaires mais aussi celles de l'appareil de Golgi ou encore des mitochondries ; de plus, les protéines qu'elles soient incluses dans les membranes ou dans des complexes protéiques fonctionnels peuvent également être altérées ainsi que les acides nucléiques de l'ADN nucléaire ou mitochondrial et des ARNs.

2.1. Radiolyse de l'eau

Les molécules d'eau sont constituées de deux atomes hydrogène (H) liés à un atome d'oxygène (O) par des liaisons covalentes les rendant très stables. En interagissant avec les molécules d'eau, H_2O , les rayons X créent du dihydrogène (H_2), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et surtout des radicaux libres ($H^\bullet$, $^\bullet OH$, $HO_2^\bullet$ et électron aqueux, e_{aq}^-). Ces éléments appelés des espèces réactives de l'oxygène (ERO ; ROS en anglais) sont caractérisés par leur haute réactivité chimique et une durée de vie très courte. Leur formation peut être décrite en trois phases temporelles : une purement physique incluant les ionisations et excitations décrites précédemment, une seconde couplant des phénomènes physiques et chimiques au moment duquel il y a réorganisation des molécules d'eau touchées et formation des ROS et une troisième phase purement chimique au cours de laquelle les ROS diffusent dans le milieu et peuvent interagir avec d'autres molécules (*Figure 1.2.4*) (Le Caër, 2011).

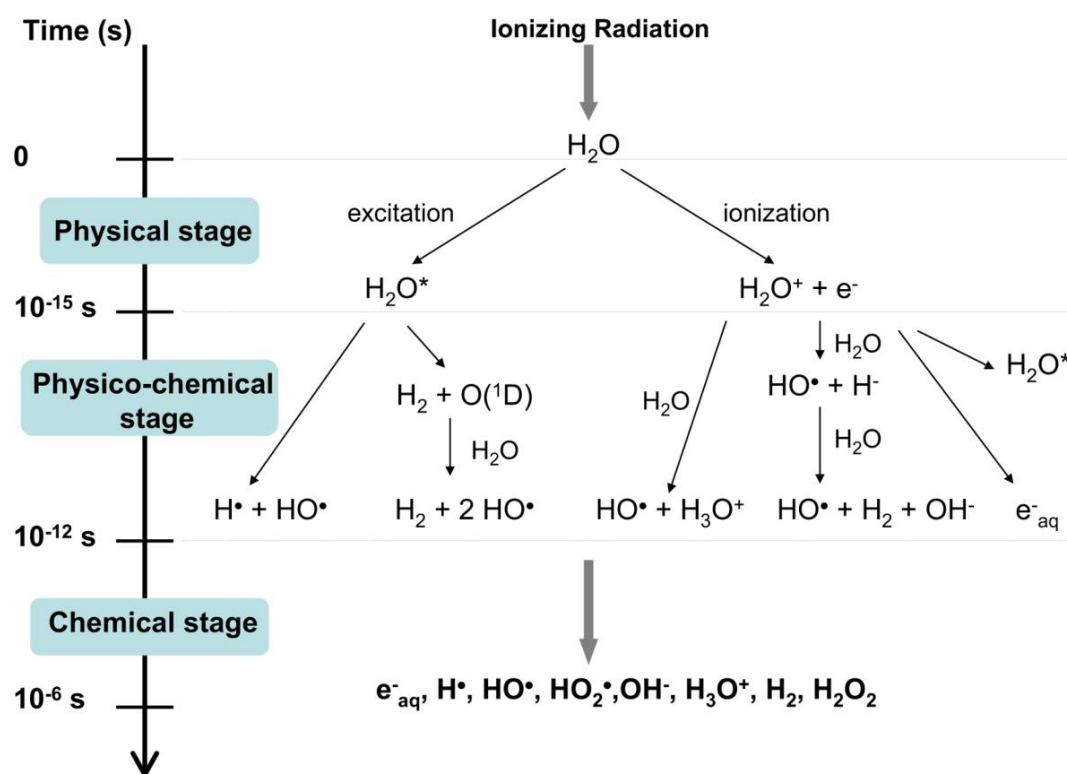


Figure I.2.4 : Cinétique de la radiolyse de l'eau. (Le Caër, 2011)

La production des ROS a des conséquences importantes car ils peuvent endommager les autres constituants cellulaires proches tels que les membranes lipidiques, les protéines et les acides nucléiques (pour une revue récente voir (Reisz et al., 2014)). Les dommages produits par les ROS sont regroupés sous le terme « effets indirects » des rayons X.

2.2. Altération des lipides membranaires

Les membranes cellulaires, telles que la membrane plasmique, nucléaire, mitochondriale, etc., permettent de délimiter et maintenir des constituants cellulaires dans des compartiments bien définis. Elles sont constituées majoritairement de lipides : phospholipides (en double couche), sphingolipides, stérols et glycolipides, mais également de protéines, constituant notamment les canaux ioniques. Les ionisations/excitations induites par les rayons X et les oxydations dues à la radiolyse de l'eau vont perturber la dynamique de ces structures complexes. La peroxydation et la fragmentation des lipides sont des

facteurs de l'altération des membranes pouvant induire l'augmentation de leur perméabilité et donc la perte de leur fonction de barrière (Girotti, 1998). De plus, le métabolisme des sphingolipides peut également être perturbé. En effet, la production des ROS stimule la relocalisation d'enzymes telle que l'acide sphingomyélinase (ASMase) qui hydrolyse la sphingomyéline (SM) conduisant à la production de céramide (*Figure 1.2.5*) (Corre et al., 2010). La perte des sphingomyélines affecte les propriétés structurales de la membrane. La production de céramide va induire le déclenchement de voies de signalisation des dommages membranaires pouvant conduire, selon leur importance à l'arrêt de la prolifération cellulaire, la sénescence ou encore l'apoptose (Corre et al., 2010; Corre et al., 2013).

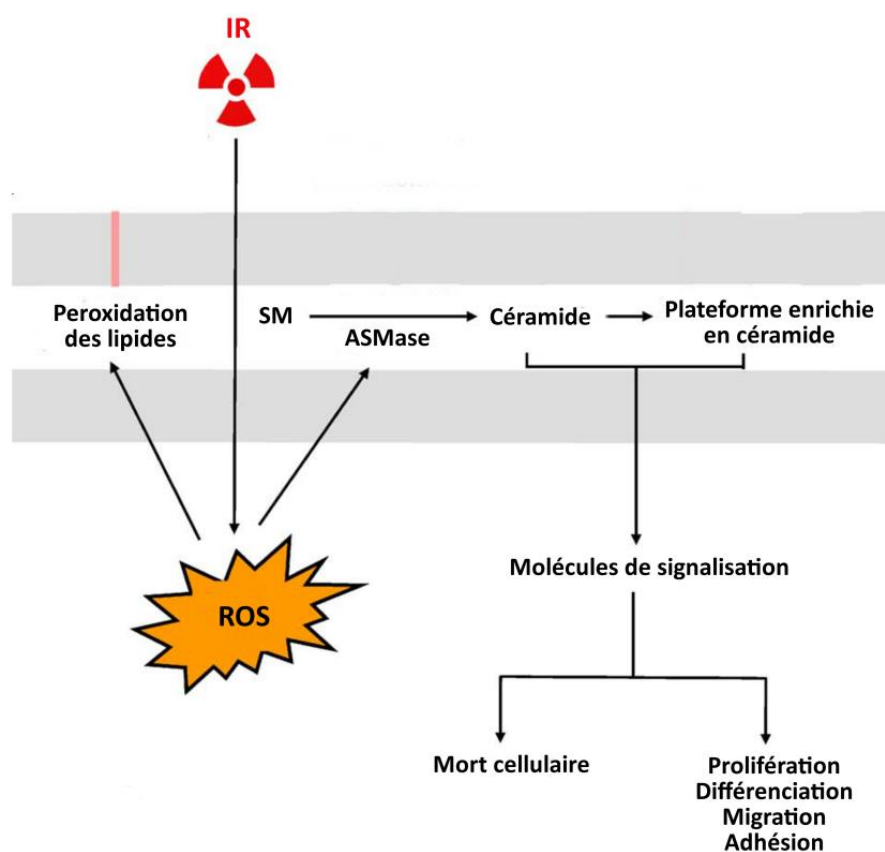


Figure 1.2.5 : Effets indirects des rayons X sur la membrane plasmique. La peroxydation des lipides ainsi que la voie de formation de la céramide sont représentées. Adaptée de (Corre et al., 2010).

2.3. Altération des protéines

Les protéines représentent plus de 50% de la masse cellulaire sèche (estimation basée sur des modèles bactériens). Elles entrent dans la composition des membranes cellulaires et de la chromatine. Elles interviennent également dans tous les processus cellulaires (métabolisme, réplication, transcription, traduction, réparation, transport...). Elles sont constituées d'une séquence d'acides aminés qui en se repliant prend une conformation spatiale particulière (structure tertiaire) leur conférant une activité spécifique (par ex. enzymatique). Lors de l'exposition aux rayons X d'une cellule, les conséquences au niveau cellulaire vont dépendre de la proportion de protéines impactées. Les altérations des protéines peuvent être des cassures ou des modifications dans la séquence en acides aminés, des carbonylations et des oxydations sur certains acides aminés (méthionine ou cystéine) (Reisz et al., 2014). Ces différentes altérations vont induire des changements de conformation impliquant la perte de leur activité. Il est important de voir que, de par leur fonction dans tous les processus cellulaires, l'altération du pool protéique disponible de la cellule est très délétère pour la réparation des dommages au sens large donc de sa survie. Il est intéressant de citer, une étude comparative de la résistance aux dommages de l'ADN de différentes espèces, allant des bactéries aux eucaryotes en passant par les archées, qui pose l'hypothèse que des mécanismes antioxydants efficaces préservant le pool protéique disponible pourraient participer au phénomène de radiorésistance observé chez certaines espèces telle que *Deinococcus radiodurans* (Daly, 2012).

2.4. Dommages de l'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est la molécule qui code l'information génétique d'une cellule. C'est une double hélice formée de deux brins d'acides nucléiques. Un acide nucléique est constitué d'une base purique (adénine et guanine) ou pyrimidique (thymine et cytosine) accrochée à un sucre (dextrose) qui est lié à un phosphate. Chaque brin est un enchainement de dextrose-phosphate et ce sont les liaisons hydrogènes entre les bases puriques et

pyrimidiques qui forment la double hélice. Les deux brins sont orientés dans le sens opposé l'un de l'autre (Figure I.2.6).

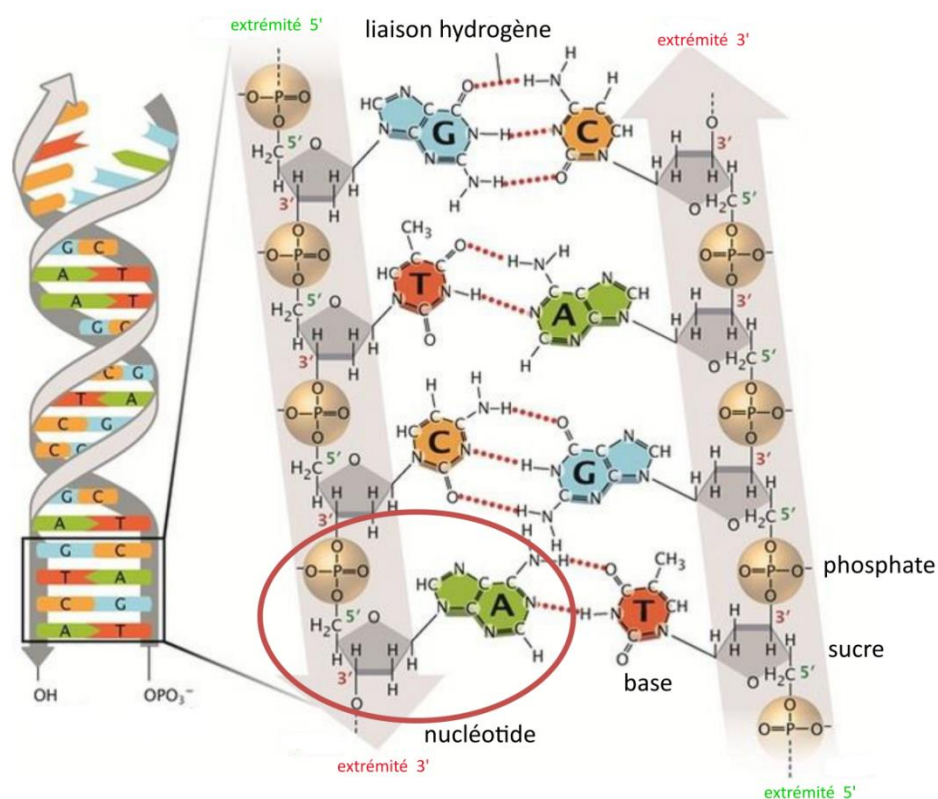
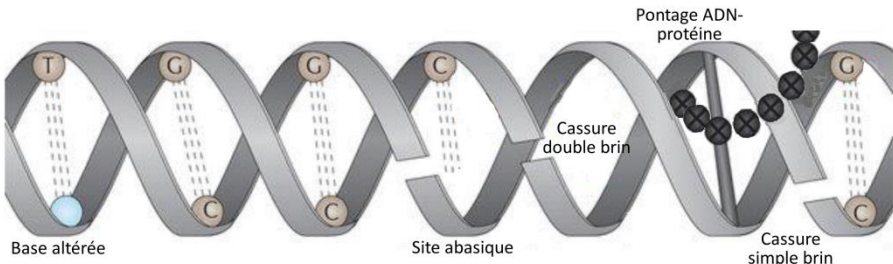


Figure I.2.6 : Structure de la double hélice d'ADN. L'unité de base est le nucléotide constitué d'un sucre (dextrose), d'un phosphate et d'une base (A pour adénine, T pour thymine, G pour guanine et C pour cytosine). Les couples sucre-phosphate se lient entre eux pour constituer le squelette d'un brin et les bases se lient entre elles pour maintenir les deux brins ensemble, soit A-T et G-C. Tirée du site internet « Scitable par Nature Education ».

Les dommages radio-induits de la molécule d'ADN peuvent avoir deux origines : le rayonnement ionisant lui-même, ou les ROS produits par la radiolyse de l'eau. Ils sont classés sous les termes : effet direct et indirect, respectivement. Cette distinction a été faite suite à des expérimentations utilisant des composés chimiques qui piègent les ROS (capteur ou scavenger en anglais) tels que le DMSO (diméthylsulfoxyde). Ces expériences ont permis de montrer que les ROS sont responsables d'environ 60-70% des dommages de l'ADN produits lors d'une irradiation (Ward, 1988). Il est à noter que ce qui est qualifié d'effet direct (30-40%) peut également inclure des effets indirects. En effet, lorsque les molécules d'eau, qui entourent de manière proximale la double hélice d'ADN, sont ionisées,

les ROS générés vont produire des dommages sur l'ADN quasi instantanément. Ces ROS ne sont pas captés par le DMSO. De ce fait, il est plus juste de parler effet « piégeable » ou « non piégeable » (scavengeable ou unscavengeable en anglais) (Ward, 1988).

Lorsque cette structure complexe qu'est l'ADN est exposée à des rayons X, différents types de dommages peuvent être induits, tels que des altérations de bases et de sucres, des pontages ADN-ADN, des pontages ADN-protéine ou encore des cassures de brin, simple et double. Ces différents types de dommages n'ont pas le même impact sur la cellule et ne seront pas reconnus et traités de la même manière (Figure I.2.7).



Type de dommage	Base altérée Site abasique	Pontage ADN-ADN ou ADN-protéine	Cassure simple brin	Cassure double brin
Fréquence par cellule et par Gy	950	150-180	1000	20-40
Mécanisme de tolérance lors de la réplication	Polymérase translesionnelles	Arrêt de la fourche de réplication Effondrement de la fourche Arrivée de la fourche opposée	Polymérase translesionnelles	Arrêt de la fourche de réplication Effondrement de la fourche Arrivée de la fourche opposée
Mécanisme de réparation	Réparation par excision de base (BER) ou de nucléotide (NER)	Réparation par excision de nucléotide (NER) Recombinaison homologue (HR)	Réparation par excision de base (BER) ou de nucléotide (NER)	Jonction des extrémités non homologues (NHEJ) Recombinaison homologue (HR)
Conséquences en absence de réparation	Mutations ponctuelles	Mutations ponctuelles Aneuploïdie Instabilité génomique	Mutations ponctuelles	Aneuploïdie Instabilité génomique

Figure I.2.7 : Principaux types de dommages induits par les rayons X. Ils sont représentés sur la double hélice d'ADN (Adaptée de (Helleday et al., 2014)). Puis un tableau récapitulant brièvement les différentes réponses cellulaires pour certains de ces dommages. Les fréquences de dommages sont tirées de (Costes et al., 2010; Rothkamm and Löbrich, 2003; Ward, 1988).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux cassures double-brin de l'ADN. Elles ne représentent qu'une faible proportion dans la masse globale des dommages générés par les rayons X (Figure I.2.7), cependant elles sont les plus délétères pour la cellule. En effet, la

réparation de ce type de lésion est complexifiée du fait de l'absence de brin matrice pour l'étape de resynthèse et de la possible perte de matériel génétique (*Voir chapitre 4.1.2*). Des lésions non ou mal réparées peuvent avoir de sévères conséquences sur la survie cellulaire ou la stabilité génomique (Badie et al., 1995).

Plus précisément, une cassure de chaîne correspond à une rupture entre le sucre et le phosphate, au niveau de la liaison phosphodiester 3' ou/et 5'. Dans les cellules humaines, le taux des cassures estimées pour 1 Gy est de 1000 par cellule pour les cassures simple-brin (CSB) et 20-40 par cellule pour les cassures double-brin (CDB) (*Figure I.2.7*), (Costes et al., 2010; Rothkamm and Löbrich, 2003; Ward, 1988). La notion de CDB est relativement complexe. En effet, en théorie une CDB est composée de deux CSB sur les brins opposés (*Figure I.2.8*). Ce fait soulève la question de distance maximale à laquelle doivent se trouver ces deux ruptures de chaîne pour former une CDB. La valeur usuellement considérée est une dizaine de paires de base (Bernhardt et al., 2003; Nikjoo et al., 1997).

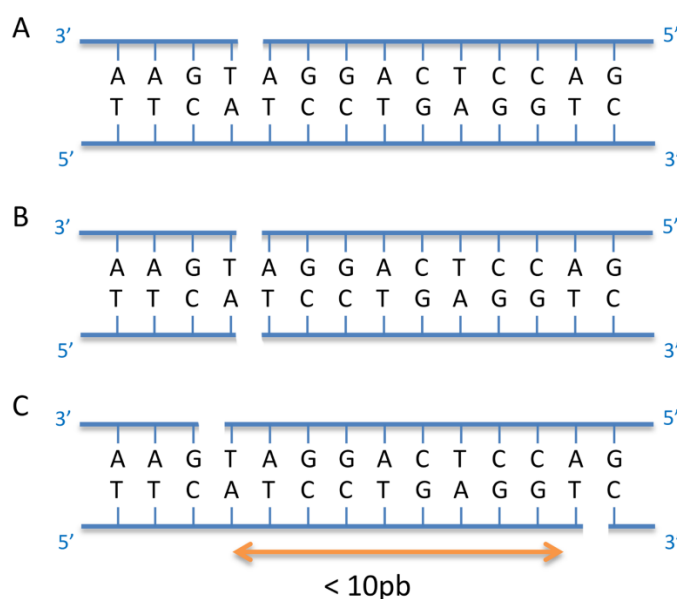


Figure I.2.8 : Cassures des brins de l'ADN. (A) Cassure simple-brin, (B) cassure double-brin, franche et (C) deux cassures simple-brin sur les brins opposés assimilées à une cassure double-brin.

Il est important de noter également qu'en fonction de la répartition des ionisations/excitations dans l'espace et de l'organisation tridimensionnelle de l'ADN, il y a une probabilité plus ou moins grande de former des dommages de l'ADN multiples très localisés (Ward, 1988). Ils sont appelés dommages complexes

car leur promiscuité les rend difficile à réparer augmentant ainsi le taux d'erreur de réparation (translocation) et la létalité cellulaire.

3. Signalisation cellulaire de la cassure double-brin de l'ADN

La molécule d'ADN est organisée dans le noyau cellulaire eucaryote sous forme de chromatine. De par la régulation de son architecture, la chromatine permet de contrôler l'accessibilité de la molécule d'ADN aux protéines impliquées dans les processus de réplication, de transcription ou de réparation. Une cassure double-brin de l'ADN implique donc, non seulement, la perte de l'intégrité de la séquence d'ADN mais également la perturbation locale de la structure de la chromatine. Cette modification de la chromatine va induire la relocalisation successive de protéines qui vont signaler la localisation du dommage et maintenir les brins d'ADN lésés.

3.1. Structure de la chromatine

3.1.1. Organisation générale

A l'exception de la mitose, deux territoires chromatinien peuvent être distingués dans le noyau cellulaire eucaryote : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond aux zones décondensées de la chromatine. Ce sont majoritairement des gènes transcrits qui sont situés dans ces zones. En effet, la forme décondensée de la chromatine permet aux protéines liées à la transcription d'accéder à la molécule d'ADN. L'hétérochromatine, quant à elle, correspond aux zones condensées. Nous distinguons deux types d'hétérochromatine : une constitutive et l'autre facultative. L'hétérochromatine constitutive est toujours retrouvée au niveau des centromères et des télomères où sont localisées beaucoup de séquences répétées et peu de gène. L'hétérochromatine facultative correspond plutôt à des régions où le niveau de condensation de l'ADN est modulable. Elle participe à la régulation de l'expression des gènes qui s'y trouvent et ceci en fonction de l'état de différenciation ou du type cellulaire (Gaspar-Maia et al., 2011; Richards and Elgin, 2002). Cette différence d'état de la chromatine est principalement induite par un jeu de déplacement/modification des nucléosomes.

3.1.2. Nucléosome l'unité de base de la chromatine

Cette notion qu'au sein d'un noyau cellulaire eucaryote la molécule d'ADN est associée à des protéines est assez ancienne. C'est W. Flemming au environ des années 1880 qui donne le nom de chromatine à la structure présente dans le noyau car cette dernière a des affinités pour les colorants. C'est en 1884 que les histones sont découvertes et identifiées comme des nucléoprotéines par A. Kossel. Il faut ensuite attendre 1973-74, 20 ans après la mise en évidence de la structure en double hélice de l'ADN (Watson and Crick, 1953), pour que soit observé à l'aide de la microscopie électronique la conformation dite en « perles sur une chaîne » de la chromatine (Olins and Olins, 1974; Strätling et al., 1978). Les éléments répétés qui structurent la molécule d'ADN (Kornberg, 1974) sont appelés « nucléosomes » en 1975 (Kornberg, 1977; Oudet et al., 1975).

La structure du nucléosome est précisément décrite chez les mammifères par cristallographie en 1997 (Luger et al., 1997). Le cœur du nucléosome se constitue par l'assemblage d'hétérodimère : H3-H4 et H2A-H2B (Kornberg, 1974; Kornberg and Thomas, 1974; Luger et al., 1997), chacun des couples s'assemble en tétramère, l'ensemble formant donc un octamère (*Figure I.3.9*). Environ 145-147 paires de bases d'ADN sont enroulées autour de l'octamère d'histone (Luger et al., 1997; McGhee and Felsenfeld, 1980). L'histone H1, quant à elle, est adjacente au cœur du nucléosome et permet le maintien de la structure en « collier de perle de nucléosomes » de la chromatine (Happel and Doenecke, 2009; Muyldermans and Travers, 1994; Widom, 1998).

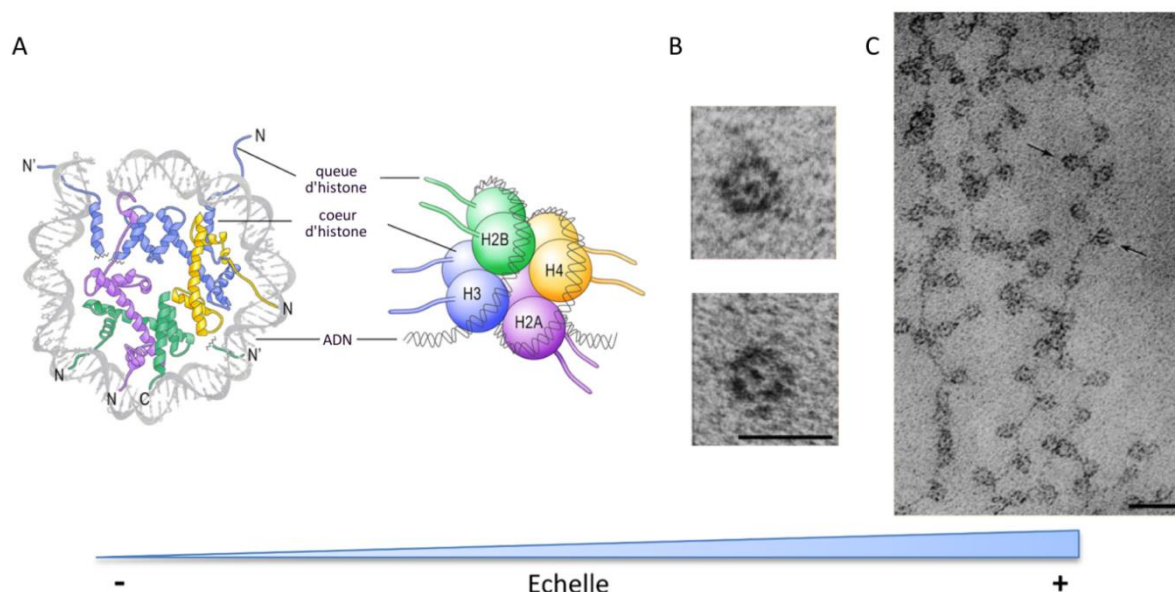


Figure 1.3.9 : Structure d'un nucléosome. (A) Représentation schématique d'une vue de la structure tertiaire des histones avec la double hélice d'ADN qui s'enroule autour, et à droite représentation d'ensemble du nucléosome avec les quatre histones canoniques : H2A-H2B et H3-H4 (Gräff and Mansuy, 2008). (B) Photographie en microscopie électronique de nucléosomes isolés. La barre d'échelle correspond à 10 nm. (C) Photographie en microscopie électronique la structure en « collier de perle » de la chromatine. La barre d'échelle correspond à 30 nm (Olins and Olins, 2003).

Les histones sont classées en deux grands groupes : les premières dites « canoniques » et les secondes appelées « variants ». Les histones canoniques sont H1, H2A, H2B, H3 et H4. Elles sont définies ainsi car elles constituent de manière prépondérante les nucléosomes (*Figure 1.3.10*). Elles ont la particularité d'être codées par des gènes organisés en groupe dans le génome (Albig et al., 1997; Braastad et al., 2004) et d'être exprimées de manière dépendante de la réplication de l'ADN (Marzluff et al., 2002; Osley, 1991; Stein et al., 1996; Wu and Bonner, 1981). De plus, leurs ARN messagers (ARNm) ne contiennent pas d'intron et possèdent une tige boucle à la place de la queue poly-adénillée usuellement retrouvée en 3' des ARNm eucaryotes (Dominski and Marzluff, 1999; Dominski and Marzluff, 2007; Whitfield et al., 2000). Ces tiges boucle situées en 3' des ARN messagers des histones médient leur dégradation lorsque la phase S se termine, participant ainsi à la régulation de l'expression des histones canoniques (Hoefig et al., 2013; Marzluff et al., 2008; Pandey and Marzluff, 1987).

Histone	Nombre de copies de gène	Expression durant le cycle cellulaire	Localisation	Fonction connue
H2A	15	DR	Tout le génome	Cœur histone
H2A.X	1	IR	Tout le génome	Réparation de l'ADN et intégrité du génome
H2A.Z	2	IR	Tout le génome	Activation/répression des gènes et ségrégation des chromosomes
MacroH2A	2	Possible IR	Chromosome X inactif	Répression des gènes
H2A.Bbd	3	IR	Chromosome X actif et euchromatine	Transcription active
H2B	17	DR	Tout le génome	Cœur histone
TSH2B	1	IR	Tout le génome des spermatozoïdes et au niveau des télomères des cellules somatiques	Transition chromatine à nucléoprotamine
H3.1	10	DR	Tout le génome	Cœur histone
H3.2	3	DR	Tout le génome	Cœur histone
H3.3	2	DR et IR	Tout le génome	Activation/répression des gènes et ségrégation des chromosomes
H3.4	1	IR	Dans le génome des spermatozoïdes et au niveau des nucléoles des cellules somatiques	ND
CENP-A	1	IR	Au niveau des centromères	Ségrégation des chromosomes
H4	14	DR	Tout le génome	Cœur histone

Figure I.3.10 : Rôles connus des histones canoniques et de leurs variants. Tableau présentant les différentes histones dont le rôle est connu. Pour chacune, il est indiqué le nombre de copie du gène dans le génome humain ainsi que le moment de leur expression (en fonction de la réplication, DR, ou indépendante de la réplication, IR). La localisation des histones et leur fonction connue sont également notées. H2A.Bbd pour H2A Barr body-deficient, TSH2B pour testis/sperm-specific H2B et CENP-A pour Histone H3-like centromeric protein A. Tirée de (Maze et al., 2014)

Les histones H2A, H2B et H3 possèdent plusieurs isoformes non alléliques. Ces isoformes sont définies comme variant d'une histone par homologie de séquence des gènes (Talbert et al., 2012). A la différence des gènes codants pour les histones « canoniques », ceux codants pour les variants d'histone sont isolés dans le génome et sont généralement transcrits indépendamment de la phase du cycle cellulaire (Wu et al., 1982). Leurs ARNm présentent des introns et une queue poly-adénylée comme la plupart des ARNm (Mannironi et al., 1989; Millar, 2013). Différents rôles des variants d'histone ont été mis en évidence (*Figure I.3.10*), nous pouvons citer par exemple le variant d'histone H2A.X qui est impliqué dans la

signalisation des dommages de l'ADN et dont les fonctions seront détaillées plus bas. Certains variants sont impliqués dans l'activation ou la répression des gènes et, de ce fait, seront préférentiellement retrouvés dans l'e- ou l'hétérochromatine, c'est le cas de H2A.Z, MacroH2A, H2A.Bbd, TSH2B et H3.3 (*Figure I.3.10*).

3.1.3. Changement d'état de la chromatine

Les histones ont un rôle important dans les changements d'état de la chromatine participant ainsi à la régulation de l'expression des gènes (Allfrey et al., 1964). Ces changements interviennent au cours de la transcription, de la phase du cycle cellulaire et de la réparation des dommages (Lusser and Kadonaga, 2003). Pour cela, trois modalités ont été décrites : la modification post-traductionnelle (MPT) des histones (*Figure I.3.11, A*), le remodelage de la chromatine par échange (déposition/reposition) de nucléosomes (*Figure I.3.11, B*) et celui par déplacement de nucléosomes le long de la double hélice d'ADN (*Figure I.3.11, C*) (Saha et al., 2006).

Les MPT des histones ont lieu majoritairement au niveau des acides aminés situés sur les queues C- ou N-terminales des histones (*Figure I.3.11 A*), qui sont accessibles aux différents complexes protéiques nécessaires à réalisation de ces modifications. Sept types de MPT ont été mis en évidence: l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la sumoylation, l'ADP-ribosylation, l'ubiquitination et la biotinylation (Bannister and Kouzarides, 2011). Dans tous les cas, c'est la liaison covalente de ces groupements (acétyle, méthyle, phosphate...) qui induit un changement conformationnel des histones. Plusieurs acides aminés sur la queue d'une ou plusieurs des histones d'un même nucléosome peuvent être modifiés en même temps. C'est la mise en évidence de cette combinaison qui a conduit à la naissance du concept de code des histones (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000).

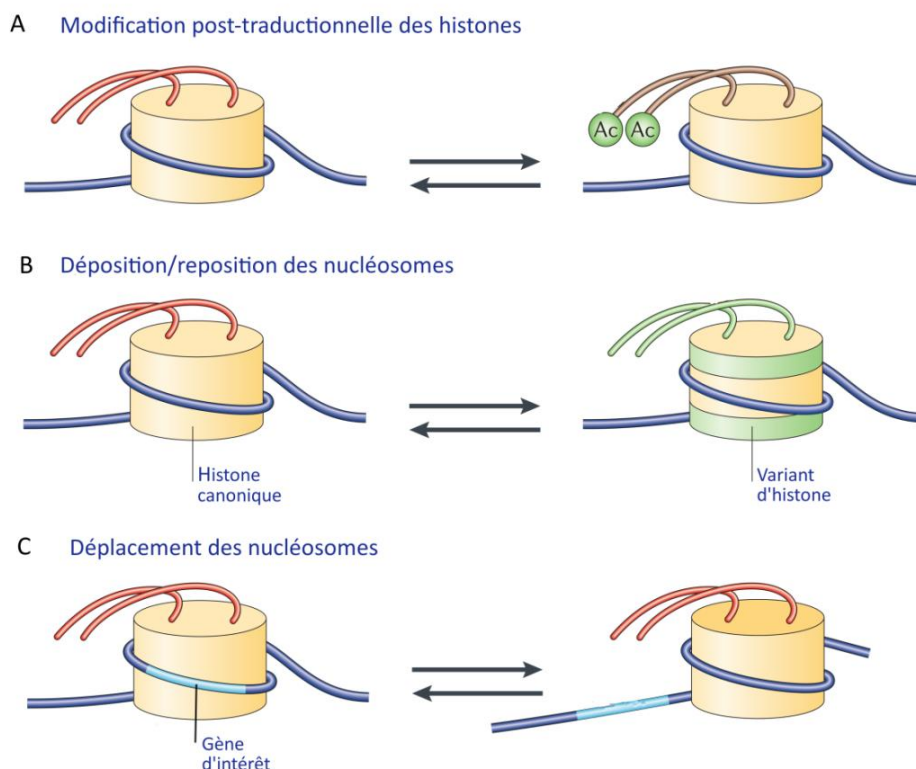


Figure I.3.11 : Dynamique des nucléosomes. Elle est de trois types : (A) MPT des histones, (B) remodelage des nucléosomes par échange du nucléosome ou (C) par déplacement de celui-ci le long de l'ADN. Adaptée de (Saha et al., 2006).

Le remodelage des nucléosomes est un phénomène qui se traduit soit par l'échange de nucléosomes, soit par déplacement de ces derniers le long de la molécule d'ADN (Figure I.3.11 B, C). Ces mécanismes nécessitent de l'énergie, obtenue par hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate). Ils permettent de rendre accessible ou au contraire de « fermer » la chromatine. Les différents acteurs protéiques identifiés agissent sous formes de complexes multiprotéiques contenant au moins une enzyme hydrolysant l'ATP, une ATPase. Ces dernières font partie de la famille Snf2 et sont classées en quatre groupes : SWI/SNF, INO80, ISW1 et CHD, définis sur la base des sous-unités catalytiques qu'elles possèdent (en plus de la région ATPase) (Flaus and Owen-Hughes, 2011; Hargreaves and Crabtree, 2011).

Pour illustrer ces phénomènes, nous pouvons revenir à la notion d'euchromatine et d'hétérochromatine (Figure I.3.12). En effet, cette dynamique d'ouverture et de fermeture de la chromatine est orchestrée par les MPT des histones et le remodelage des nucléosomes (Figure I.3.12). L'euchromatine est particulièrement

riche en histone H3 triméthylée sur la lysine 4 (H3K4me3) et en histone H3 acétylée (H3ac). Les groupements acétyles présents sur l'histone H4 (H4ac) ainsi que les variants d'histone H2A.Z-H3.3 et H2A.Bbd permettent la décondensation de la chromatine (Robinson et al., 2008). Ces variants d'histone sont impliqués dans la déstabilisation des nucléosomes, facilitant l'échange ou le déplacement de ces derniers (Campos and Reinberg, 2009). A l'inverse, les zones d'hétérochromatine sont caractérisées par un enrichissement en histone H3 triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3) et histone H4 triméthylée sur la lysine 20 (H4K20me3). Le variant d'histone macroH2A est également retrouvé dans ces zones et associé à un blocage de la transcription des gènes (Bannister and Kouzarides, 2011; Campos and Reinberg, 2009; Richards and Elgin, 2002).

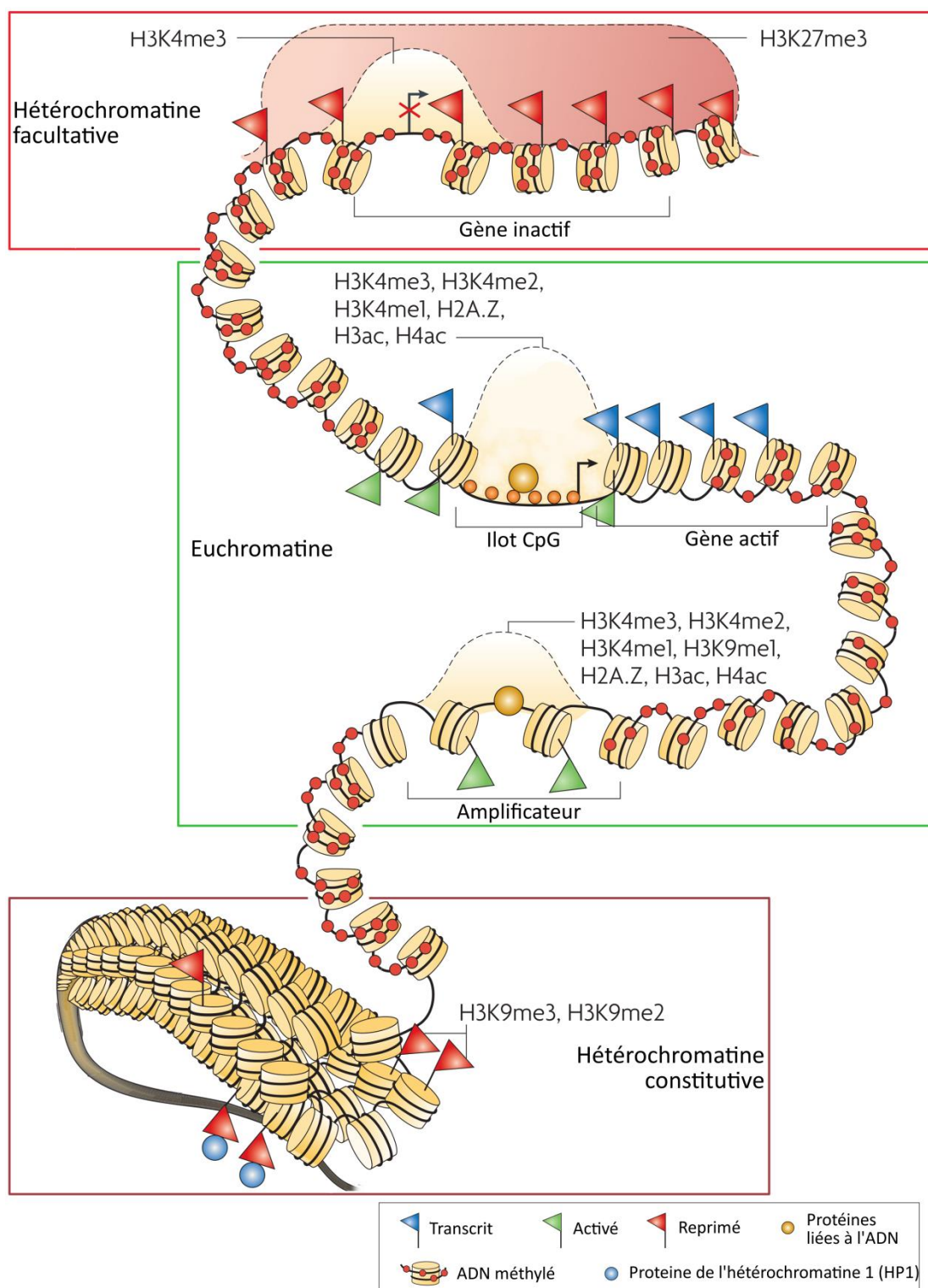


Figure I.3.12 : Dynamique de la chromatine et implication des MPT des histones et du remodelage des nucléosomes. Différentes MPT d'histones sont indiquées en fonction de l'état de la chromatine : euchromatine (encadré vert), hétérochromatine constitutive (encadré rouge foncé) ou facultative (encadré rouge). De plus au sein de l'euchromatine, différentes MPT d'histones sont distinguées en fonction du rôle de la séquence d'ADN : gène transcrit, séquence amplificatrice de transcription ou îlot CpG. Adaptée de (Schones et al., 2011).

3.2. Modulation de l'organisation de la chromatine suite à des dommages de l'ADN

3.2.1. Etat de la chromatine au moment du dommage

Lors d'une exposition aux rayons X, l'énergie se dépose de manière stochastique au sein de la cellule. Lorsqu'une cellule est en interphase, une faible proportion d'hétérochromatine est observée, 10-15% suivant le type cellulaire et l'organisme (Yunis and Yasmineh, 1971). Si les dommages de l'ADN ont lieu dans l'euchromatine, ils peuvent être réparés très rapidement du fait de l'accessibilité de la molécule d'ADN. Ainsi une partie des cassures double-brin ayant lieu dans l'euchromatine sont résolues en moins d'une heure (Lorat et al., 2012). Ce n'est pas le cas des cassures induites au sein de l'hétérochromatine. L'aspect très condensé de la chromatine va de facto augmenter la probabilité de formation de groupes de dommages de l'ADN, les rendant ainsi potentiellement plus complexes. De plus, la condensation de la chromatine va rendre les cassures de l'ADN difficilement accessibles aux protéines de réparation (Cowell et al., 2007; Kim et al., 2007), impliquant un délai de réparation plus long (Goodarzi et al., 2008). Un phénomène de relaxation des zones d'hétérochromatine endommagées est nécessaire, induisant une apparente mobilité des cassures vers l'extérieur de l'hétérochromatine (Chiolo et al., 2011; Downs et al., 2007). Ainsi, les nucléosomes (i.e. les histones) jouent un rôle prépondérant voir même précurseur dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, et ceci en ayant un impact direct sur les modifications de conformation de la chromatine nécessaires au traitement de ces derniers.

3.2.2. Modulation de la chromatine et signalisation des dommages de l'ADN

Suite à une rupture de chaîne d'ADN, un changement de conformation localisé de la chromatine est induit par le relâchement du surenroulement de la molécule d'ADN (pour revue (Cann and Delleire, 2011)). Ce changement initial est proposé comme un des principaux senseurs du dommage déclenchant sa

signalisation (Bakkenist and Kastan, 2015). Cependant, la manière dont est détecté ce relâchement dans la structure de la chromatine reste peu clair. Il est à noter que si les ruptures de chaînes sont induites au niveau de site de transcription ou de réplication, le blocage de leur avancée peut également être un facteur déclenchant la signalisation du dommage (Ljungman, 2005).

Dans un contexte d'hétérochromatine, il y a nécessité d'ouvrir la chromatine pour rendre le dommage accessible aux protéines de réparation. Pour cela, H3K9me3, MPT d'histone constitutive des régions d'hétérochromatine, permet la fixation du complexe TRRAP-TIP60, dont l'activité acétyltransferase de TIP60 acétyle les lysines de l'histone H4 participant à la relaxation de la chromatine (Fischle, 2009; Murr et al., 2006; Sun et al., 2009). Un autre acteur a été mis en évidence dans cette chorégraphie, le variant d'histone H2A.Z via le remodelage des nucléosomes. C'est le complexe NuA4, contenant la protéine ATPase p400, qui procède au remplacement de l'histone H2A par le variant d'histone H2A.Z (Altaf et al., 2009) contribuant ainsi à l'ouverture de la chromatine en synergie avec l'acétylation de l'histone H4 (*Figure I.3.13*) (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015; Price and D'Andrea, 2013; Xu et al., 2012).

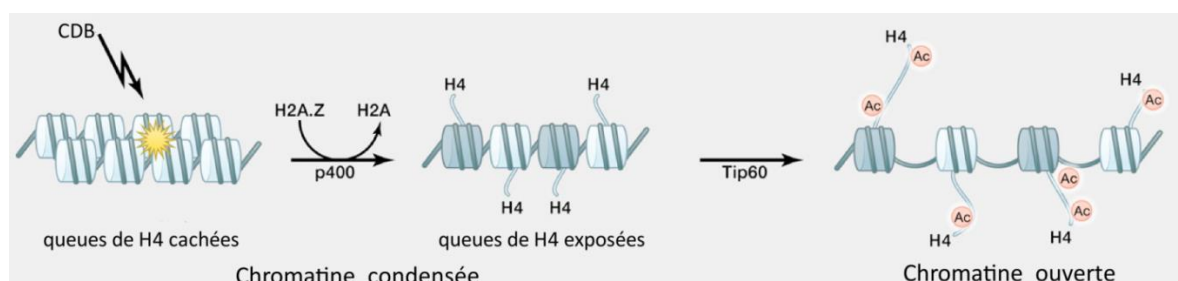


Figure I.3.13 : Implication du variant d'histone H2A.Z dans la relaxation de la chromatine. Adaptée de (Price and D'Andrea, 2013).

En plus de leur rôle dans l'ouverture de la chromatine, les MPT des histones participent également à la signalisation des dommages. En plus de la phosphorylation du variant H2A.X, qui sera détaillée au chapitre suivant, nous pouvons citer la diméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me2), l'ubiquitination de la lysine 15 de l'histone H2A (H2AK15ub) et l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac). Ces MPT des histones sont impliquées dans la mutuelle exclusion, au niveau des dommages de l'ADN, de deux protéines de

signalisation, l'une impliquée dans la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et l'autre dans la réparation par recombinaison homologue (HR) : 53BP1 (p53 binding protein 1) et BRCA1 (breast cancer 1), respectivement (Chapman et al., 2012; Daley and Sung, 2014; Panier and Boulton, 2014). Il est intéressant de noter que la dichotomie 53BP1/BRCA1 est une étape importante de signalisation différentielle de ces deux voies principales de réparation des CDB (Chapman et al., 2012; Daley and Sung, 2014). La protéine 53BP1 possède des domaines de reconnaissance de H4K20me2 et de H2AK15ub, qui permettent son maintien au niveau du dommage (pour revue, Panier and Boulton, 2014). A contrario, l'acétylation de H4K16 par le complexe TIP60 serait un des acteurs de l'exclusion, de la protéine 53BP1, de la zone endommagée (Du Toit, 2013; Hsiao and Mizzen, 2013; Tang et al., 2013). En effet, l'acétylation de H4K16 rendrait inaccessible le groupement diméthyle de sa lysine 20 (Panier and Boulton, 2014). H4K16ac en empêchant la fixation de la protéine 53BP1 permettrait l'association de la protéine BRCA1 au niveau de la cassure double brin (*Figure I.3.14*) (Tang et al., 2013).

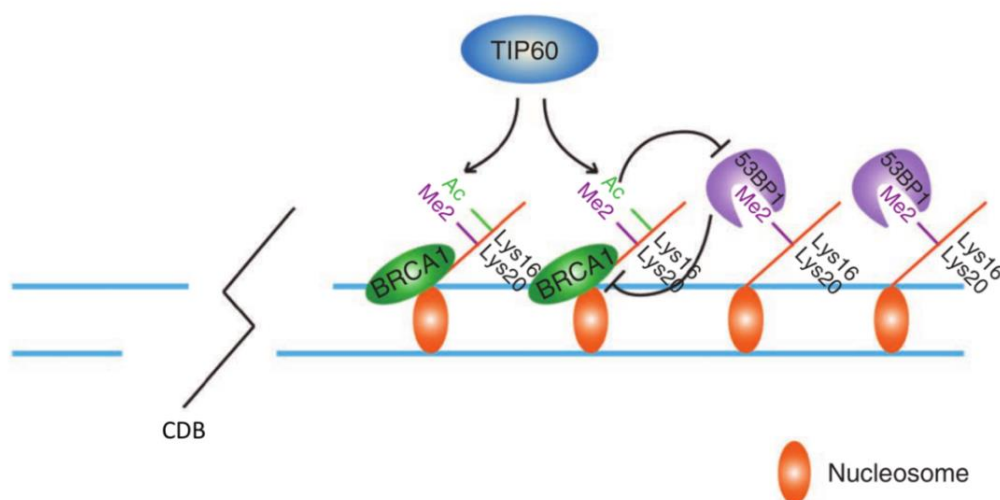


Figure I.3.14 : Modèle de relation antagoniste entre les protéines 53BP1 et BRCA1 pour l'accrochage au niveau d'une CDB. Il est basé sur un jeu de MPT sur l'histone H4. (Tang et al., 2013).

3.3. Cas particulier du variant d'histone H2A.X

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le variant d'histone H2A.X a un rôle dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN (*Figure I.3.10*). Il a été

mis en évidence à la fin des années 1990, que la phosphorylation de la sérine 139 du variant d'histone H2A.X (γ H2AX) est une MPT d'histone majeure dans la signalisation des cassures double brin (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999).

3.3.1. Quelques notions de phylogénie

L'histone H2A.X est un des variants de l'histone H2A. Il est présent dans presque tous les eucaryotes de *Giardia lamblia* (protozoaire flagellé de l'ordre des Diplomonadida) à l'humain (Figure I.3.15) (Malik and Henikoff, 2003). Plusieurs équipes ont réalisé des reconstitutions d'arbres phylogéniques, montrant son origine comme para ou polyphylétique suivant les espèces (Malik and Henikoff, 2003; Talbert and Henikoff, 2010; Thatcher and Gorovsky, 1994). Au sein du génome humain, le gène codant pour l'histone H2A.X se situe dans le chromosome 11 (bras q position 23). Contrairement à la plupart des gènes codants pour des variants d'histone, celui codant pour l'histone H2A.X a la particularité d'être alternativement transcrit en deux ARNm, les deux possèdent une tige boucle comme les ARNm des histones canoniques qui sont transcrits en fonction de la réplication. Par contre l'un des deux possède également une queue polyadénylée en 3' terminal, impliquant une transcription de ce dernier de façon indépendante de la réplication (Mannironi et al., 1989).

		100	110	120	130	140
H2A	Humain (mammifère)	L G K V T I A Q G G V L P N I Q A V L L P K K T E S H H K A K G K				
H2A.X	Humain (mammifère)	L G G V T I A Q G G V L P N I Q A V L L P K K T S A T V G P K A P S G G K K A T Q A S Q E Y				
H2A.X	Souris (mammifère)	L G G V T I A Q G G V L P N I Q A V L L P K K S S A T V G P K A P A V G K K A S Q A S Q E Y				
H2A.X	Arabidopsis (plante)	L G S V T I A N G G V L P N I H Q T L L P S K - (8) - - - - - V G K N K G D I G S A S Q E F				
H2A	<i>S. cerevisiae</i> (levure)	L G N V T I A Q G G V L P N I H Q N L L P K K - (12) - - - - - S A K A T K A S Q E L				
H2A.X	<i>Giardia</i> (protiste)	F A N V T I R E G G V A R S A K E G R E G K G - (16) - - - - - S H R S Q D L				

Figure I.3.15 : Comparaison des séquences en acides aminés de l'histone H2A et du variant d'histone H2A.X de plusieurs espèces. Alignement des séquences d'acides aminés en commençant à la position 97 jusqu'au bout terminal COOH. Les résidus conservés sont en gras. Inspirée de (Redon et al., 2002).

Le variant d'histone H2A.X est présent dans 2 à 20 % des nucléosomes suivant le type cellulaire (Rogakou et al., 1998). La séquence protéique de H2A.X diffère de celle de H2A par l'addition d'un motif SQ-(E/D) en C-terminal. Ce motif est très conservé au sein des eucaryotes (Malik and Henikoff, 2003; Redon et al., 2002). Des expériences chez la levure ont mis en évidence que la charge négative

du motif H2A SQE (*Figure I.3.15*) favorise l'ouverture de la structure de la chromatine (Downs et al., 2000).

3.3.2. Les modifications post-traductionnelles du variant d'histone H2A.X

Lors de la réponse aux dommages de l'ADN plusieurs MPT ont été décrites sur l'histone H2A.X : acétylation, ubiquitination et phosphorylation (*Figure I.3.16*).



Figure I.3.16 : Séquence en acides aminés du variant d'histone H2A.X et MPT associées. Les acides aminés notés en gras correspondent au domaine du cœur d'histone. Les MPT sont indiquées, A pour acétylation, P pour phosphorylation et U pour ubiquitination. Il est à noter que la séquence du variant H2A.X est similaire à celle de l'histone H2A (129 acides aminés) jusqu'à l'acide aminé de la position 120. Il peut donc être supposé que les MPT en amont sont communes aux deux histones. Inspirée de (Miller and Jackson, 2012; Xie et al., 2010).

Les acétylations ont lieu sur les lysines 5 et 36 au sein du cœur de l'histone H2A.X, elles ont été mises en évidence par spectrométrie de masse (Xie et al., 2010). Plus précisément, l'ajout d'un groupement acétyle sur la lysine 36 est constitutif. La perte de cette acétylation induirait une augmentation de la stabilité du nucléosome. Elle ne semble pas directement liée à la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Cependant, dans le contexte d'une impossibilité d'acétyler la position 36 de l'histone H2A.X (lysine remplacée par une arginine ou une alanine), une diminution de la survie de cellules irradiées est observée (Jiang et al., 2010). La lysine 5 serait quant à elle, acétylée en réponse aux dommages de l'ADN (Ikura et al., 2007; Kusch et al., 2004), cependant le rôle de cette acétylation n'est pas très clair. En effet, la perte de la lysine 5 ne semble pas avoir d'impact ni sur la réparation des dommages, ni sur la survie cellulaire (Jiang et al., 2010). Cependant, le remplacement de la lysine 5 par une arginine (impossibilité

d'acétyler) a montré que H2A/H2A.XK5ac est requis pour l'ubiquitination de H2A/H2A.X (Ikura et al., 2007). Cette ubiquitination de H2A/H2A.X se produit sur les lysines 119/120 et semble avoir un rôle important dans l'initiation de la réponse aux dommages de l'ADN (Huen et al., 2007; Pan et al., 2011).

La phosphorylation de la tyrosine 142 des H2A.X a été décrite comme constitutive. C'est sa déphosphorylation qui se produit en réponse à l'irradiation (Krishnan et al., 2009; Xiao et al., 2009). Cependant, cet aspect reste controversé car cette phosphorylation n'a pas été confirmée par spectrométrie de masse (Xie et al., 2010). Les phosphorylations de la thréonine 101 et de la thréonine 136 ont été mises en évidence par spectrométrie de masse (Li et al., 2010; Xie et al., 2010), mais aucun rôle dans la réponse cellulaire aux dommages n'a été mis en évidence à ce jour. C'est la phosphorylation de la sérine 139 (γ H2AX) qui est la MPT d'histone majeure dans la signalisation des cassures double brin (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999).

3.3.3. Rôles de la phosphorylation sur la sérine 139 de l'histone H2A.X (γ H2A.X)

3.3.3.1. Signalisation des cassures double-brin de l'ADN

Le rôle le plus caractérisé de γ H2A.X est la signalisation des cassures double-brin de l'ADN (CDB). En effet, γ H2A.X est observée en réponse à un traitement induisant des dommages de l'ADN, exposition aux rayonnements ionisants, à des agents chimiques tel que le 4-hydroxytamoxifen (OHT), *etc.* C'est en 1998 qu'a été montrée, pour la première fois, la corrélation entre l'augmentation de γ H2A.X et les CDB de l'ADN au sein de cellules de mammifères (Rogakou et al., 1998), ainsi que l'amplification de cette phosphorylation sur une région d'environ deux mégabases autour de la cassure (Rogakou et al., 1999). γ H2A.X est détectable à l'aide d'un microscope à fluorescence sous forme de foyers quelques minutes après l'exposition aux rayonnements ionisants (*Figure I.3.19*). C'est à 30 minutes après l'induction des dommages de l'ADN que le maximum de foyers γ H2A.X est détecté avant leur décroissance.

La phosphorylation de l'histone H2A.X est réalisée par des protéines kinases de la famille des phosphatidylinositol-3-OH-kinases (PIK), telles que ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) (*Figure I.3.18*), DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (*Tableau I.3.17*), (Andegeko et al., 2001; Burma and Chen, 2004; Burma et al., 2001; Rotman and Shiloh, 1999; Stiff et al., 2004). Les protéines ATM et DNA-PKcs sont recrutées simultanément au niveau des dommages de l'ADN (Caron et al., 2015; Shrivastav et al., 2009). La présence de ces kinases au niveau du dommage est dépendante de protéines de recrutement telles que NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) (associée au complexe MRN : MRE11/RAD50/NBS1), ATRIP (ATR interacting protein) (*Figure I.3.18*) et Ku80 (en hétérodimer avec Ku70) (Celeste et al., 2003; Falck et al., 2005; Zhou et al., 2006). De plus, l'ubiquitination de la lysine 119/120 de H2A.X semble également importante au démarrage de la signalisation des dommages de l'ADN. En effet, si elle est abolie, par mutation de la lysine en arginine, ATM n'est pas relocalisée au niveau des dommages et il y a une réduction de la formation de foyers γ H2A.X (Pan et al., 2011).

	Mode d'activation	Action	Références bibliographiques
ATM	- Activée en réponse à une perturbation de la structure de la chromatine - Autophosphorylation du dimère sur la sérine 1981 - Est recrutée sur le site du dommage de l'ADN par le complexe MRN	- Phosphoryle l'histone H2AX sur la sérine 139 - Bloque le cycle cellulaire - Intervention dans la réparation par NHEJ et RH	- Rotman et al., 1999 - Bakkenist et al., 2003 - Bakkenist et al., 2015
DNA-PKcs	- Sous unité catalytique du complexe DNA-PK associée aux protéines Ku70 et Ku80 - Phosphorylation sur la thréonine 2609 et sur la sérine 2056 en réponse à l'IR - ATM médie la phosphorylation sur la Thréonine 2609	- Phosphoryle l'histone H2AX sur la sérine 139 et la sérine/thréonine 136 - Intervention dans la réparation par NHEJ	- Kurimasa et al., 1999 - Chan et al., 2002 - Burma et al., 2004 - Chen et al., 2007 - Li et al., 2010
ATR	- Activée en cas de stress réplcatif (blocage des fourches de réplcation) - Et en réponse à une perturbation de la structure de la chromatine - Nécessite de l'ADN simple-brin (resection des bouts)	- Phosphoryle l'histone H2AX sur la sérine 139 - Bloque le cycle cellulaire - Intervention dans la réparation par NHEJ et RH - Intervient aussi lors du blocage des fourches de réplcation	- Zou et al., 2003/Carr 2003 - Cimprich et al., 2008 - Tomimatsu et al., 2009 - Bakkenist et al., 2015

Tableau I.3.17 : Protéines kinases de la famille des PIK impliquées dans la phosphorylation de l'histone H2A.X en réponse à des dommages de l'ADN.

γ H2A.X a été décrite comme une plateforme pour l'accrochage de protéines telles que MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1) (Figure I.3.18), 53BP1 ou BRCA1, qui vont guider le recrutement des protéines de la réparation (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002). Plus tard, des expériences de déplétion de H2A.X dans des cellules embryonnaires de souris ont montré que γ H2A.X ne semble pas indispensable au recrutement initial de ces protéines mais serait plutôt important au maintien de ces dernières au niveau des dommages de l'ADN (Celeste et al., 2003).

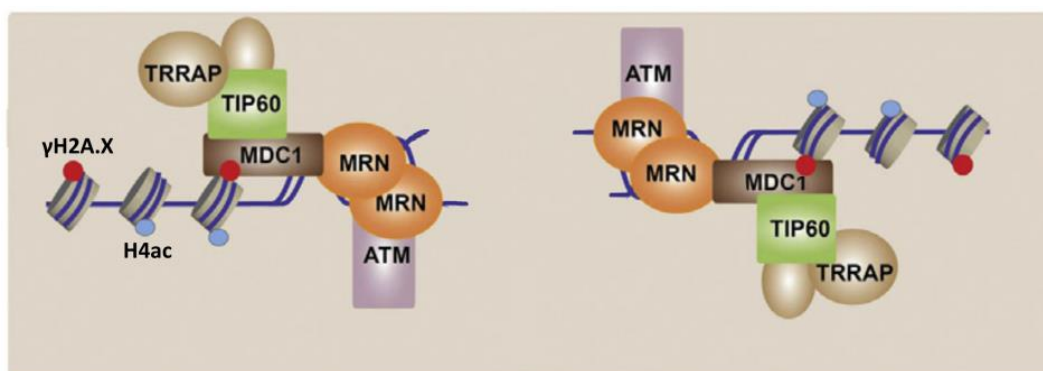


Figure I.3.18 : Premières étapes de la gestion cellulaire d'une CDB. Schéma récapitulatif de la mise en place de la signalisation d'une CDB avec la présence du complexe MRN, dont NBS1 permet l'arrivée d'ATM phosphorylée. ATM phosphoryle la sérine 139 du variant d'histone H2A.X (γ H2A.X) permettant l'accrochage de MDC1. Le complexe TRRAP-TIP60 quant à lui acétyle les lysines de H4 (H4ac) permettant l'ouverture de la chromatine (voir chapitre 3.2.2). Adaptée de (Gospodinov and Herceg, 2013).

3.3.3.2. Autres rôles constitutifs

La phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2A.X est également observée dans d'autres processus cellulaires impliquant la formation « physiologique » de CDB de l'ADN. Nous pouvons citer comme exemple les réarrangements des gènes codant pour les récepteurs et les immunoglobulines qui font partis du mécanisme de maturation des cellules lymphocytaires (recombinaison V(D)J pour Variable Diversity Joining) (Fernandez-Capetillo et al., 2004).

ATM et γ H2A.X seraient également impliquées lors de la transcription des gènes (exemple TGF β), (Singh et al., 2015). Ainsi, la phosphorylation de la sérine

139 et de la thréonine 136 de l'histone H2A.X (réalisée par DNA-PKcs et/ou ATM) impliquerait une déstabilisation du nucléosome par décrochage de l'histone H1 (Li et al., 2010), rendant l'ADN accessible au complexe de transcription (Beato et al., 2015).

La phosphorylation de l'histone H2A.X varie également selon la phase du cycle cellulaire et ceci indépendamment d'un stress exogène (*Figure 1.3.19*). En effet en phase S du cycle, lorsque l'ADN est en cours de réplication, une augmentation importante du taux de petits foyers γ H2A.X est observée au sein des noyaux. Le taux de γ H2A.X augmente également en mitose, mais cette fois de façon globale à l'ensemble des chromosomes (Ichijima et al., 2005; McManus and Hendzel, 2005; Tu et al., 2013). Comme dans le cas de la réponse aux dommages de l'ADN, l'histone H2A.X est phosphorylée par ATM, DNA-PKcs ou ATR (Burgess et al., 2014; Ichijima et al., 2005; Jette and Lees-Miller, 2015; McManus and Hendzel, 2005; Shang et al., 2014; Tu et al., 2013). Cependant, le rôle de cette phosphorylation est moins clair. Les travaux de Burgess et al., suggère que l'importante condensation de la chromatine pourrait être à l'origine du déclenchement de l'activation d'ATM/ATR et donc de la phosphorylation du variant d'histone H2A.X (Burgess et al., 2014). La même année, une équipe travaillant sur le point de contrôle de la mitose, au moment de l'assemblage du fuseau mitotique, a mis en évidence la présence d'ATM et de γ H2A.X au niveau des kinétochores et ceci en prometaphase (Eliezer et al., 2014). Après la formation du kinétochore, la phosphorylation de H2A.X pourrait être étendue sur l'ensemble du chromosome, mais à ce jour, ce mécanisme reste encore à élucider.

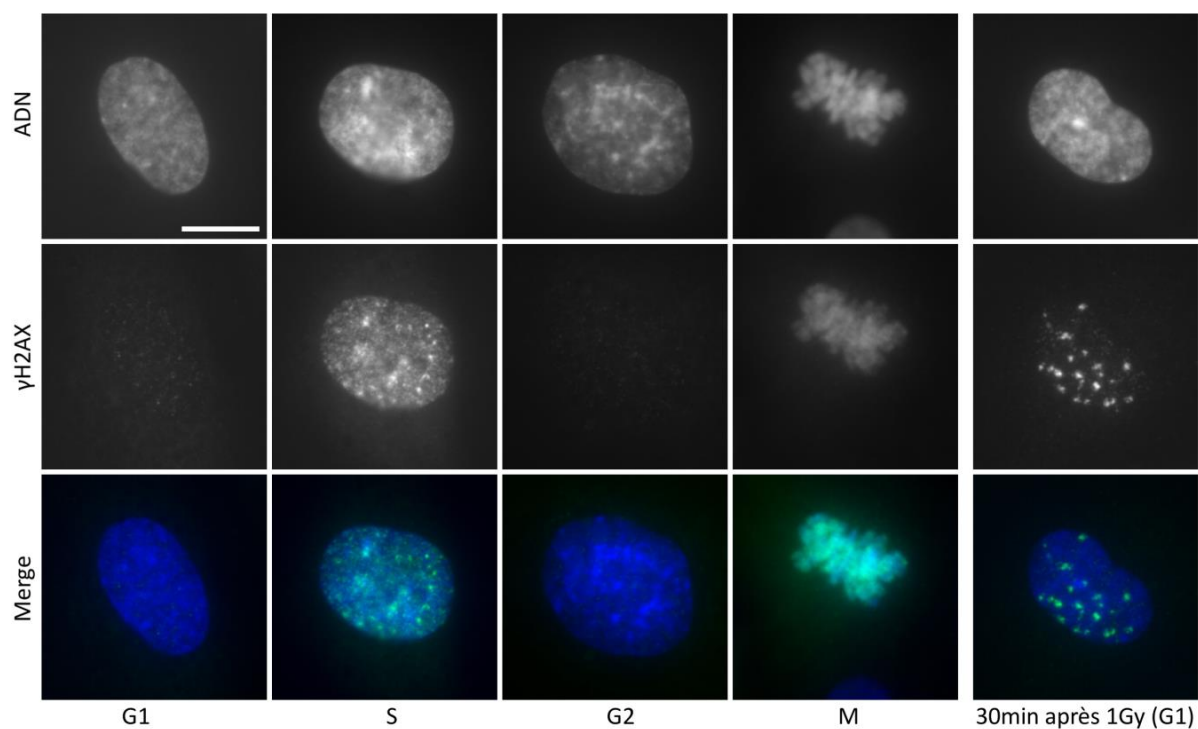


Figure I.3.19 : Phosphorylation de l'histone H2A.X sur la sérine 139 dans les différentes étapes du cycle cellulaire et en réponse aux dommages de l'ADN. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

4. Gestion cellulaire des cassures double-brin de l'ADN et devenir cellulaire

La signalisation des CDB est suivie d'un arrêt dans la progression du cycle cellulaire permettant le déroulement du processus de réparation des dommages. Les mécanismes moléculaires mis en place pour l'arrêt du cycle et la réparation des dommages sont étroitement dépendants de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules lors de l'exposition à un stress génotoxique. De plus, la mauvaise voir l'absence de réparation des dommages peut avoir différents impacts, allant de l'instabilité génomique à la mort cellulaire ou la sénescence.

4.1. Perturbation du cycle cellulaire

4.1.1. Description générale du cycle cellulaire

Le cycle d'une cellule en prolifération est composé de quatre grandes phases : G1, S, G2 et M. Dans le cas de cellules somatiques, il permet le passage d'une cellule mère à deux cellules filles et donc d'accroître la population cellulaire. C'est donc un processus essentiel au maintien de l'homéostasie tissulaire d'un organisme. Durant les phases G1, S et G2, les cellules sont dites en interphase. La chromatine est relâchée et organisée en zones plus ou moins condensées d'hétéro- et d'euchromatine. C'est au cours de ces phases que peut avoir lieu la transcription des gènes.

La réplication de l'ADN a lieu spécifiquement en phase S. Elle implique l'ouverture de la double hélice d'ADN et la dépose des nucléosomes permettant la duplication des deux brins d'ADN, puis la reconstitution de la chromatine par le repositionnement des nucléosomes sur les deux doubles hélices néoformées (Probst et al., 2009). En phase G2, la chromatine est donc dupliquée.

C'est durant la mitose que la chromatine se condense pour former les deux chromatides sœurs qui constituent les chromosomes. Les deux chromatides sœurs sont ensuite séparées pour être réparties dans les deux cellules filles. La mitose se déroule en cinq phases : prophase/prométaphase, métaphase, anaphase, télophase

et cytotdiérèse. En prophase, les chromatides sœurs commencent à se condenser, dans le noyau, et forment des chromosomes rattachés par un centromère. En parallèle dans le cytoplasme, les deux centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule et à partir de ces derniers, un fuseau mitotique commence à se développer. Ce fuseau mitotique est constitué de trois types de microtubules : les microtubules polaires qui relient les centrosomes entre eux et les microtubules kinétochoriens qui lient les centrosomes aux centromères des chromosomes. A ceux-ci, s'ajoutent les fibres de l'aster, microtubules qui maintiennent les centrosomes à la membrane plasmique. La membrane nucléaire se dissocie à la fin de la prophase et c'est également à ce moment que des complexes protéiques, appelés kinétochores, se forment au niveau des centromères des chromosomes. C'est au niveau des kinétochores que s'accrochent les microtubules kinétochoriens. Durant la métaphase les chromosomes s'organisent à équidistance des deux centrosomes pour former la plaque métaphasique. Lorsque tous les kinétochores sont accrochés aux microtubules et que les chromosomes sont biens alignés, les chromatides sœurs sont séparées et tirées vers les deux centrosomes, c'est l'anaphase. Une fois les chromosomes aux deux pôles de la cellule les membranes nucléaires se reforment et les chromosomes se décondensent pour former deux noyaux, nous sommes donc en présence d'une cellule binucléée, cette étape est appelée télophase. La cytotdiérèse est la toute dernière étape du cycle où la membrane plasmique se sépare pour former les deux cellules filles.

Suivant l'état de différenciation et le type cellulaire les phases du cycle sont plus ou moins longues. Certains types cellulaires passent par une cinquième phase dite G0, où les cellules arrêtent de se diviser, elles sont dites en quiescence. C'est le cas des lymphocytes, par exemple.

La progression d'une cellule dans le cycle est contrôlée par un ensemble de protéines : les kinases dépendantes des cyclines (CdK), les cyclines (*Figure 1.4.20*) ainsi que des activateurs et inhibiteurs de CdK. C'est le jeu de localisation et d'expression de ces différentes protéines qui guide la progression du cycle cellulaire.

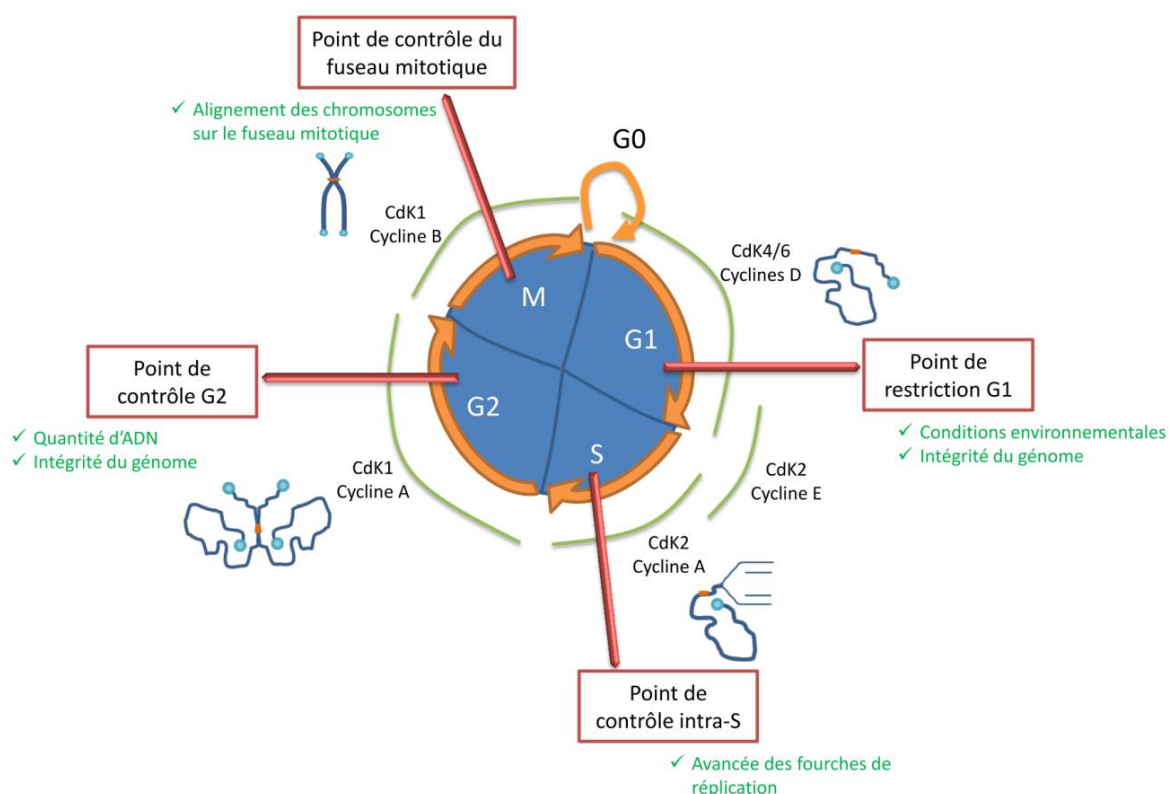


Figure I.4.20 : Vue d'ensemble du cycle cellulaire. Pour chacune des principales phases du cycle, G1, S, G2 et M, les complexes protéiques Cdk-cyclines sont indiqués. L'état de la chromatine et la proportion d'ADN sont représentés associés à chaque phase. Le trait orange correspond au centromère et les boules bleues aux télomères. Pour chacune des phases, le point de contrôle est indiqué ainsi que les conditions permettant la progression à travers le cycle.

Les Cdk ont une concentration stable durant tout le cycle cellulaire. C'est la régulation de la concentration des cyclines qui agit sur l'activité des Cdk impliquant l'avancée de la cellule dans le cycle cellulaire. Les complexes cycline D-Cdk4/Cdk6 sont essentiels dans la phase G1. Ainsi, la cycline D est exprimée aussi longtemps que dure la phase G1. La cycline E est également retrouvée en phase G1, elle s'associe à Cdk2 pour réguler le passage vers la phase S. Ensuite, c'est la cycline A qui se lie à Cdk2 permettant la progression en phase S. Pour les phases G2 et M, c'est Cdk1 qui entre en jeu en s'associant successivement avec la cycline A, lors de la phase G2, puis la cycline B, lors de la phase M (*Figure I.4.20*), (pour revue (Vermeulen et al., 2003)).

En plus de l'association avec les cyclines, les Cdk sont activées par phosphorylation/déphosphorylation sur certaines de leurs thréonines et tyrosines. Nous pouvons citer comme exemple, les protéines kinases Wee1 et Myt1 qui

interviennent pour phosphoryler Cdk1 et l'inactiver, et Cdc25 qui intervient pour déphosphoryler Cdk1 permettant de l'activer (Lew and Kornbluth, 1996).

Un autre grand groupe de protéines intervient dans la progression du cycle cellulaire par la régulation de l'activité des Cdk, ce sont les inhibiteurs des Cdk (CKi). Nous pouvons distinguer deux familles : INK4 et Cip/Kip. Les CKi de la famille INK4 inactivent spécifiquement Cdk4 et Cdk6, impliquant un maintien en phase G1. Nous pouvons citer, entre autres, les protéines p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) et p19 (INK4d). Les CKi de la famille Cip/Kip tels que p21 (Waf1 ou Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2) inhibent également les Cdk de la phase G1 mais également le complexe cycline B-Cdk1 présent en phase M. De plus, les protéines de cette famille ont d'autres rôles connus, notamment p21 qui inhibe aussi la synthèse de l'ADN en bloquant la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Il est à noter que p21 est sous contrôle transcriptionnel de la protéine p53 bien connue comme ayant un rôle de suppresseur de tumeur et pour son implication dans la réponse aux stress génotoxiques.

Chacune des phases du cycle possèdent un point de contrôle permettant la vérification : (i) de la présence de conditions environnementales favorables (phase G1), (ii) de l'intégrité du génome (phases G1 et G2), (iii) du déroulement de la réplication (phase S), et (iv) de l'alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique (phase M) (*Figure 1.4.1*) (Alberts et al., 2007). La détection d'une anomalie par l'un des quatre points de contrôle entraîne un blocage dans la progression du cycle cellulaire jusqu'à la résolution du problème.

4.1.2. Arrêt du cycle cellulaire lié à la phase du cycle

L'endommagement de l'ADN est l'un des motifs de l'arrêt dans la progression du cycle cellulaire. Les principaux acteurs de cet arrêt sont les interactions entre les protéines impliquées dans la réponse aux dommages et les protéines régissant les points de contrôle du cycle cellulaire (Kastan and Bartek, 2004). Ces acteurs diffèrent un peu en fonction de la phase du cycle au cours de laquelle sont générés les dommages (*Figure 1.4.21*).

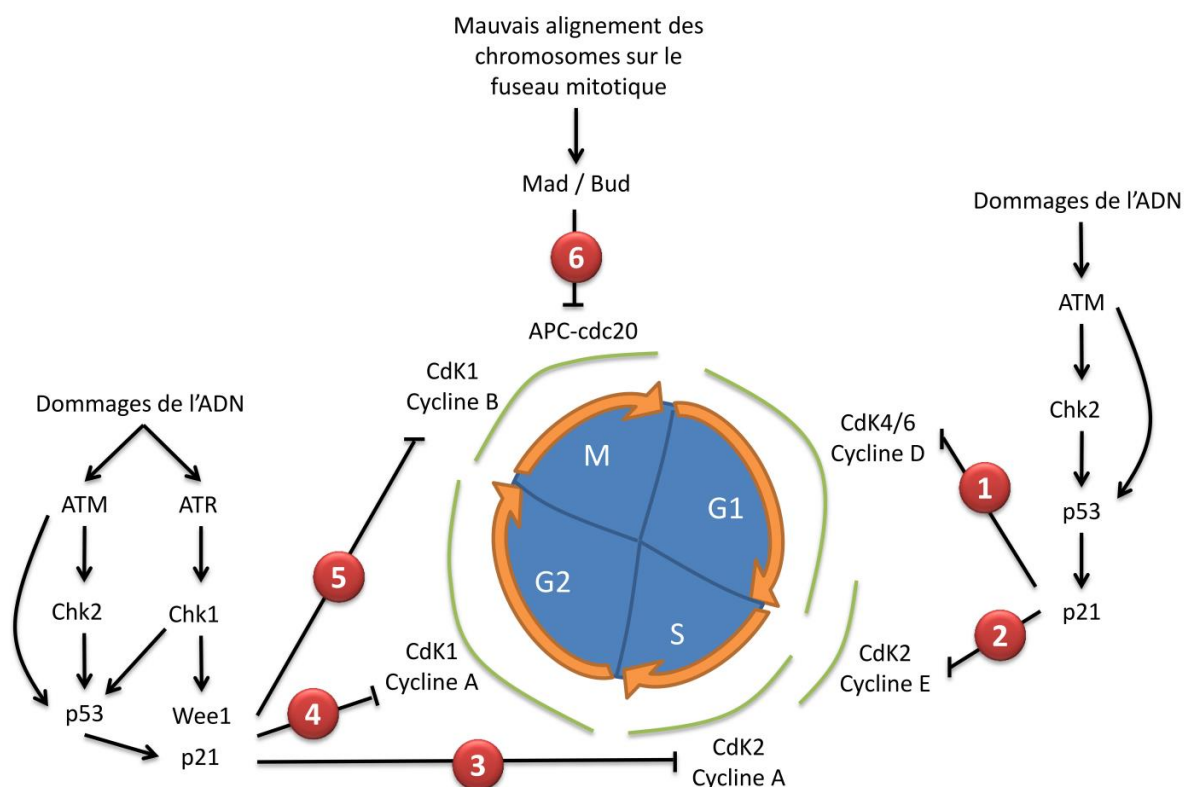


Figure I.4.21 : Activation des points de contrôle du cycle cellulaire suite à des dommages de l'ADN. Dans ce schéma simplifié, nous pouvons distinguer six points correspondant à un arrêt en phase G1 (1), durant la transition G1/S (2), au cours de la phase S (3), de la phase G2 (4), au début de la phase M (5) ou encore lors de l'alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique entre la métaphase et l'anaphase (6). Les principaux acteurs sont ATM, ATR phosphorylant les protéines p53, Chk1 et Chk2, bloquant ainsi par l'intermédiaire des protéines p21 ou Wee1 les différents complexes Cdk-cyclines du cycle. Le point de contrôle entre la métaphase et l'anaphase est le seul à faire intervenir les protéines Mad ou Bud pour bloquer la sous unité cdc20 du complexe APC (Shaltiel et al., 2015; Vermeulen et al., 2003).

Les protéines kinases ATM/ATR sont les principaux déclencheurs des cascades conduisant à l'arrêt du cycle notamment en phosphorylant les protéines Chk1, Chk2 (Check Point 1, Check Point 2) et en activant la protéine p53 (Deckbar et al., 2011; Shaltiel et al., 2015; Shibata et al., 2010). Comme nous l'avons vu précédemment la protéine p53 est un activateur transcriptionnel de la protéine p21, CKi qui bloque la progression dans le cycle en inhibant la formation des complexes cycline/Cdk. En plus de son rôle central dans l'arrêt du cycle cellulaire, la protéine p53 intervient également dans l'entrée en mort ou en sénescence cellulaire (Kuerbitz et al., 1992).

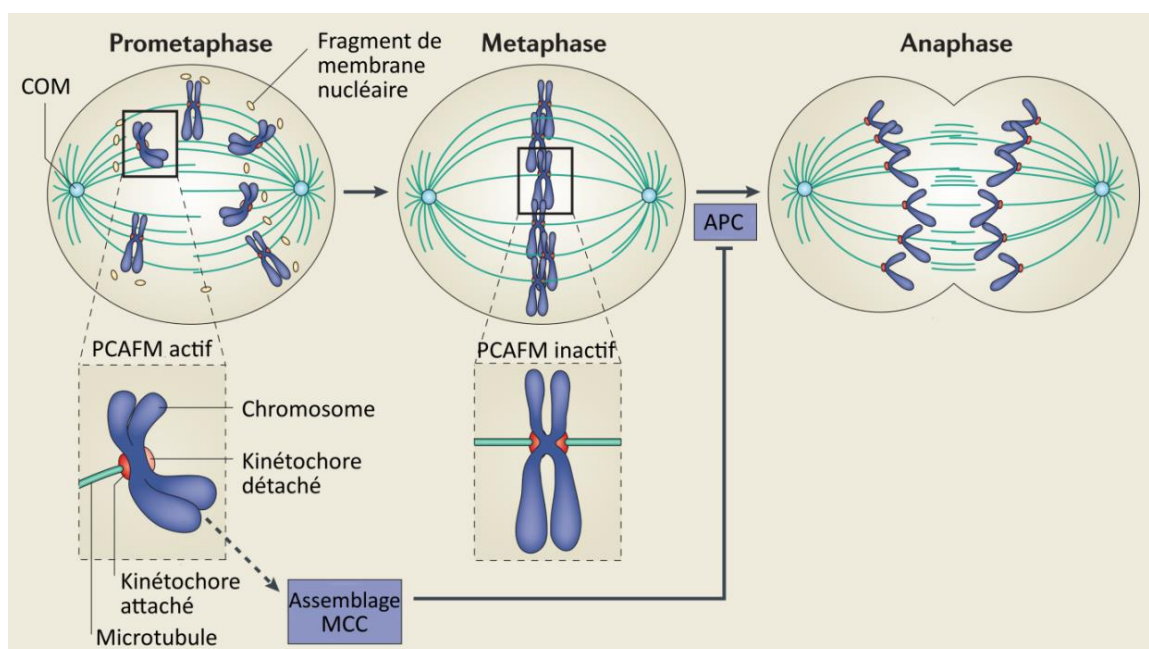


Figure I.4.22 : Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique en condition normale. Le PCAFM est actif au cours de la prométaphase lorsque les microtubules sont en cours d'accrochage sur les kinétochores des chromosomes. En métaphase, le PCAFM est désactivé si les kinétochores sont bien alignés sur les microtubules pour former la plaque métaphasique. C'est le complexe APC qui permet le passage en anaphase où les chromatides sœurs seront séparées. Tant que le PCAFM n'est pas désactivé le complexe MCC (Mitotic checkpoint complex) bloque le complexe APC (Anaphase-Promoting Complex) et la mitose est bloquée en métaphase (voir aussi le paragraphe 4.1.2 « Arrêt du cycle cellulaire lié à la phase du cycle »). Tirée de (Vitale et al., 2011).

Le dernier point de contrôle du cycle est celui de l'assemblage du fuseau mitotique (PCAFM), activable entre la prométaphase et l'anaphase. Il bloque la séparation des deux chromatides sœurs vers les centrosomes tant que les chromosomes ne sont pas alignés sur le fuseau mitotique. C'est un jeu de tension mécanique au niveau des microtubules (Foley and Kapoor, 2013). Le complexe MCC (Mitotic checkpoint complex) contenant, en outre, les protéines Mad (Mitotic Arrest Deficient) et Bud (Budding Uninhibited by Benomyl), intervient dans ce cas pour inhiber la sous unité cdc20 du complexe APC (Anaphase-Promoting Complex) (Figure I.4.21 et Figure I.4.22) (pour revue, Vermeulen et al., 2003). Tant que le PCAFM est activé, le complexe MCC bloque le complexe APC et empêche l'entrée en anaphase. Lorsque les chromosomes sont accrochés de chaque côté aux microtubules par leur kinétochore, le PCAFM est désactivé et les chromatides sœurs sont séparées (Figure I.4.22).

4.2. Réparation des dommages de l'ADN

4.2.1. Réparation de la séquence lésée de l'ADN

Après la signalisation des dommages de l'ADN, deux mécanismes principaux de réparation des CDB sont possibles : la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) (*Figure I.4.23*).

Le mécanisme de réparation le plus courant, quel que soit la phase du cycle cellulaire, est NHEJ. En effet, la réparation par NHEJ se fait pas simple jointement des deux extrémités d'ADN lésées et n'implique pas la présence d'un brin d'ADN homologue (Rothkamm et al., 2003; Shibata and Jeggo, 2014). Elle est peu conservative car la cassure peut entraîner une perte de plusieurs nucléotides qui, dans ce cas, ne seront pas resynthétisés (Lieber, 2008). La voie NHEJ consiste en un jointement des deux extrémités lésées, avec peu voir, pas de résection des bouts 3' de l'ADN (*Figure I.4.23 A*). Pour cela, l'hétérodimère pKu70/80 vient se fixer de part et d'autre de la CDB au niveau des bouts d'ADN libres (Walker et al., 2001). De ce fait, il empêche la résection des extrémités 3' par l'exonucléase Exo 1 (Shao et al., 2012; Sun et al., 2012). Ensuite DNA-PKcs accompagnée de la protéine Artemis, arrivent sur le lieu de la CDB. DNA-PKcs en phosphorylant Artemis lui permet acquérir une activité d'endonucléase. Ainsi, Artemis « nettoie » la CDB en 3' et 5' permettant la formation d'extrémités franches (Ma et al., 2002). Le complexe ligase IV-XRCC4 peut ensuite agir en liguant les deux extrémités de la double hélice d'ADN (*Figure I.4.23 A*) (Ma et al., 2004).

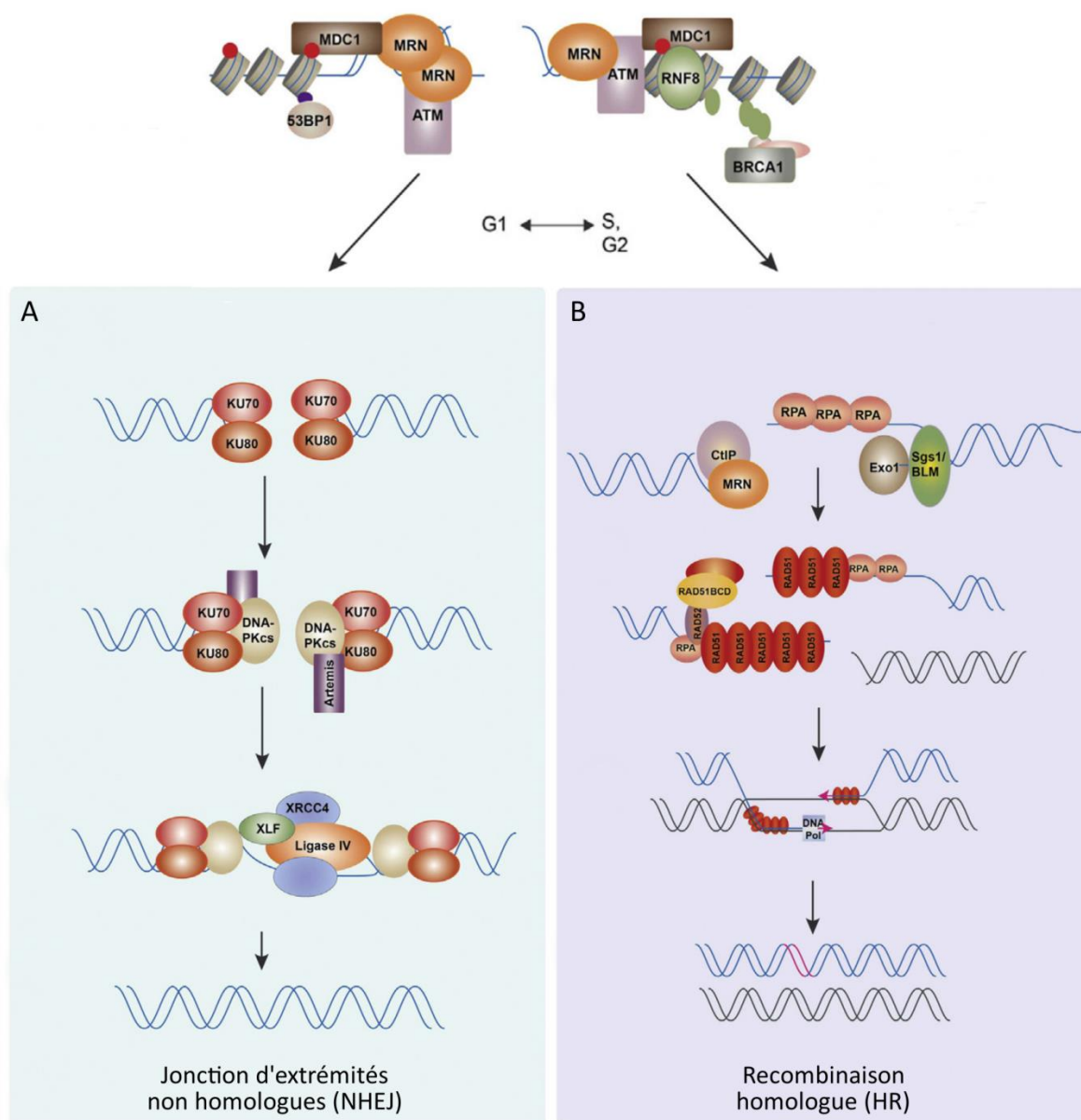


Figure I.4.23 : Voies de réparation des CDB de l'ADN en fonction de la phase du cycle cellulaire. Durant toutes les phases du cycle cellulaire, lorsque 53BP1 se fixe au niveau de la CDB, c'est la voie de réparation par NHEJ (A) qui est privilégiée, alors que la voie de réparation par RH (B) n'a lieu que durant les phases S et G2 du fait de la présence de la chromatide sœur. Dans ce cas, c'est BRCA1 qui se fixe au niveau de la CDB. Adaptée de (Gospodinov and Herceg, 2013).

Lorsque les CDB ont lieu en phase S et en début de G2, les deux chromatides sœurs sont présentes dans le noyau, la partie d'ADN lésée peut être réparée à l'aide de la séquence homologue située sur la chromatide sœur non endommagée, ce processus est appelé HR. La réparation par HR est fidèle, du fait de l'utilisation d'une séquence homologue comme matrice de réparation, (Karanam et al., 2012;

Shibata and Jeggo, 2014). Ce mécanisme nécessite une grande résection de ces extrémités 3' permettant la formation d'ADN simple-brin (*Figure I.4.23 B*). Dans ce cas, pKu70/80 sont éliminés permettant la résection, des brins dans le sens 3'-5', faite par des protéines ayant des activités d'exonucléase et endonucléase telles qu'Exo 1, Mre11 et CtIP. L'ADN simple-brin formé est protégé par la protéine RPA (replication protein A). RPA est ensuite remplacée par la protéine Rad 51 permettant l'initiation de l'appariement et l'invasion du brin de la chromatide homologue pour former un duplex d'ADN homologue (jonction de Holliday). Ce mécanisme permet à l'ADN polymérase de synthétiser un nouveau brin à partir du brin homologue (*Figure I.4.23 B*). A la fin de la synthèse du nouveau brin, la jonction de Holliday est résolue par des nucléases telles que MUS81-EME1, SLX1-SLX4 et GEN1, et des topoisomérases (Wechsler et al., 2011), (pour revue générale (Thompson, 2012)).

4.2.2. Restauration de la chromatine

La signalisation et la réparation des CDB induisent un remodelage de la chromatine, impliquant une modification de l'épigénome par MPT des histones et échanges d'histones. Une fois la séquence nucléotidique réparée, que ce soit par la voie de réparation NHEJ ou HR, une restauration de la structure initiale de la chromatine doit s'effectuer pour préserver la stabilité génomique (Dabin et al., 2016; Smerdon, 1991; Soria et al., 2012). Deux aspects peuvent être distingués : i) le retour à l'état initial des MPT des histones, et ii) le remplacement des nucléosomes.

Nous avons vu précédemment que le variant d'histone H2A.X est phosphorylé sur sa sérine 139 juste après l'induction des dommages permettant leur signalisation. Une fois le dommage réparé, γ H2A.X doit être déphosphorylée. Deux modèles de déphosphorylation de γ H2A.X après réparation ont été proposés. Dans le premier, γ H2A.X serait directement déphosphorylée au niveau de la chromatine par une phosphatase, la protéine PP2A (protein phosphatase 2A) (*Figure I.4.24, point 1*). Ceci est étayé par la colocalisation de PP2A avec γ H2A.X, et également par l'inhibition de l'élimination de γ H2A.X lorsque l'expression de PP2A est bloquée, par l'utilisation d'ARN interférence (Chowdhury et al., 2005).

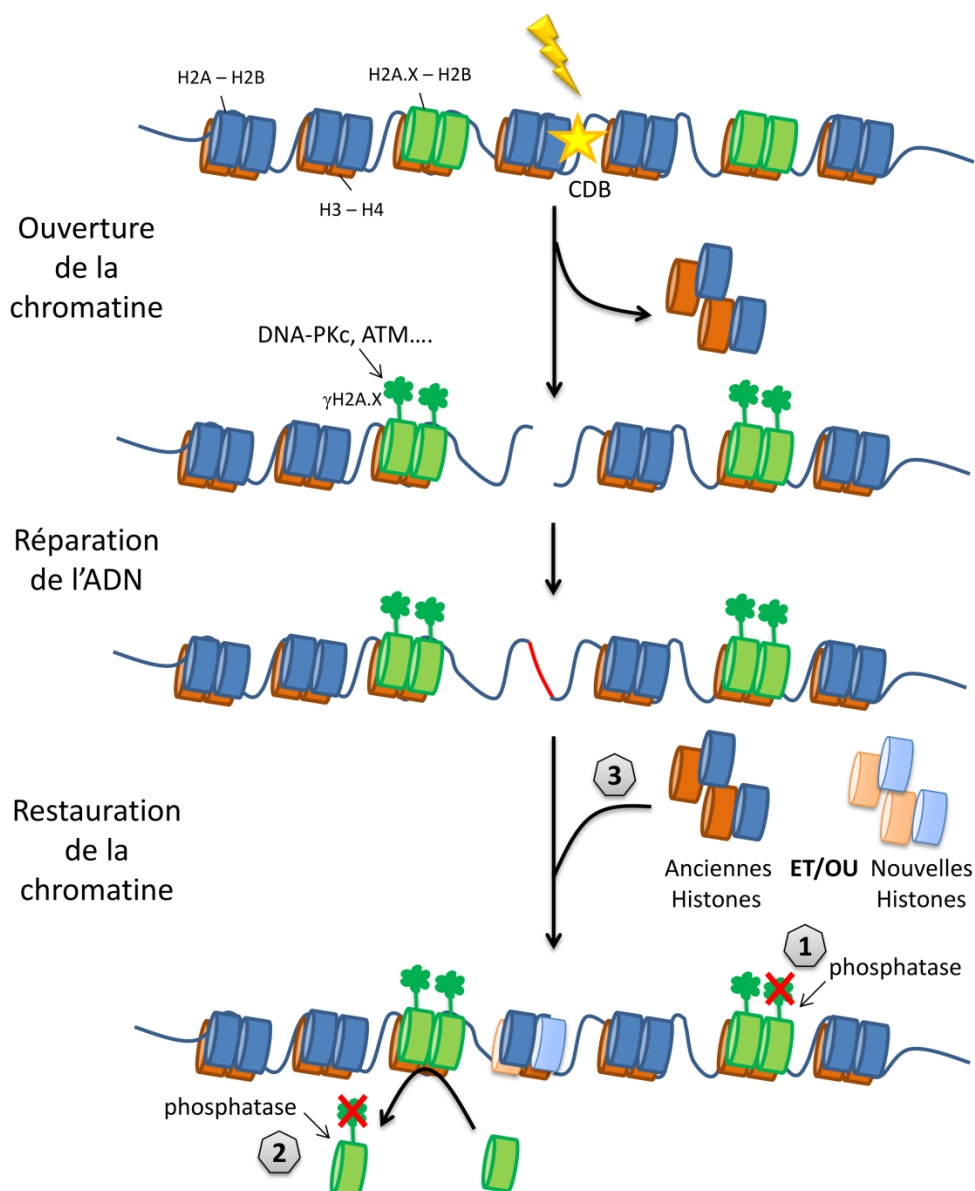


Figure I.4.24 : Modèle de la dynamique de la chromatine après des CDB. Après induction de CDB (étoile jaune), trois grandes étapes peuvent être mises en lumière : l'ouverture de la chromatine par la déposition de nucléosomes et la signalisation de la CDB par la phosphorylation du variant d'histone H2A.X (trèfle vert) ; la réparation de l'ADN et la restauration de la chromatine après réparation. Durant cette dernière étape, nous avons distingué la déphosphorylation γ H2A.X pouvant impliquer deux processus distincts (1 et 2) et le repositionnement de nucléosomes (3). Inspirée de (Adam et al., 2013; Heo et al., 2008; Svetlova et al., 2010).

Dans le deuxième modèle, il y aurait d'abord déposition du variant H2A.X phosphorylé puis déphosphorylation. Dans ce cas, il a été montré dans un système acellulaire que le complexe FACT catalyse la réaction d'échange du couple H2B-H2A.X phosphorylé avec H2B-H2A.X non phosphorylé (Heo et al., 2008). Une fois

déposé, γ H2A.X serait déphosphorylée également par une phosphatase, la protéine PP2C γ (protein phosphatase 2C γ) (Kimura et al., 2006), (*Figure 1.4.24, point 2*). Ce modèle est alimenté par le constat que l'inhibition des phosphatases, par la caliculine A, n'empêche pas la décroissance du nombre de foyers γ H2A.X avec le temps alors que γ H2A.X est toujours observé par western blot. Ceci laisse supposer que la disparition des foyers γ H2A.X n'est pas obligatoirement la conséquence de la déphosphorylation de γ H2A.X et que sa déposition ne nécessite pas de déphosphorylation (Nazarov et al., 2003; Svetlova et al., 2007).

La reformation des nucléosomes déposés ou déplacés nécessaire à la restauration de la chromatine ne se fait pas simplement en reposant les anciens couples d'histone (histones parentales) déposés lors de l'ouverture de la chromatine (avant la réparation) mais également par le positionnement de nouveaux couples d'histones (*Figure 1.4.24, point 3*). Ceci a été montré, en réponse à un stress aux UVC, notamment pour les couples d'histones H3-H4 par l'incorporation des variants d'histone H3.1 et H3.3 (Adam et al., 2013; Polo et al., 2006). C'est le cas également pour l'incorporation du variant d'histone H2A.Bbd, observée dans le cas d'une resynthèse d'ADN lors de la réparation par HR (Sansoni et al., 2014). Les protéines chaperonnes d'histones (HIRA, SPT16 et CAF-1) sont des acteurs dans le repositionnement des variants d'histone H3.3 et H3.1 lors de la restauration de la chromatine (Adam et al., 2013; Polo et al., 2006; Zhu and Wani, 2010). Ce type d'étude n'a pas été réalisé dans le cadre de la réponse aux rayonnements ionisants et mériterait d'être exploré, d'autant plus que la présence de nouvelles histones/MPT d'histone positionnées sur le site d'une ancienne CDB pourraient constituer une empreinte/cicatrice du dommage (Dabin et al., 2016; Orłowski et al., 2011; Soria et al., 2012; Zhu and Wani, 2010).

4.3. Devenirs cellulaires possibles

Tout ce qui a été décrit dans la partie précédente détaille les grands processus nécessaires à un retour à l'état initial de l'ADN et de la chromatine après des dommages. Cependant un écueil dans la réalisation de ces processus peut avoir un impact sur le devenir des cellules endommagées, en plus du taux d'endommagement des cellules et de la complexité de ces dommages cela

peut dépendre aussi du type cellulaire étudié et des conditions expérimentales ou environnementales (carence en nutriment, *in vivo/in vitro*, ...). Lorsque les dommages ne sont pas ou mal réparés, différents processus peuvent se mettre en place : la mort cellulaire, la sénescence, la catastrophe mitotique ou l'instabilité génomique au sein des générations suivantes (*Figure I.4.25*).

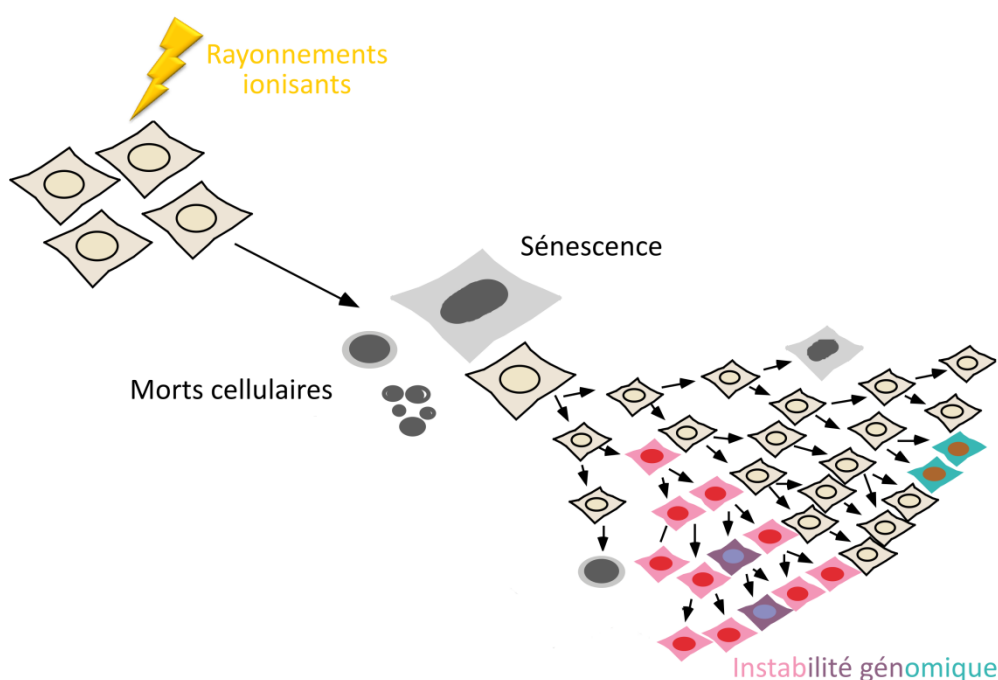


Figure I.4.25 : Devenirs cellulaires après exposition aux rayonnements ionisants. Représentation de trois devenir possibles : la mort cellulaire, la sénescence et l'instabilité génomique des générations cellulaires suivantes lorsque les cellules endommagées peuvent encore se diviser (cellules de couleur rose/rose foncé et verte). Adaptée de (Suzuki et al., 2003a).

4.3.1. La mort cellulaire radio-induite

L'une des principales conséquences des rayonnements ionisants, surtout à forte dose, est la mort cellulaire. C'est d'ailleurs, l'effet escompté pour l'éradication des cellules tumorales en radiothérapie. Une cellule morte est caractérisée par la perte de façon irréversible de la perméabilité de sa membrane plasmique et/ou par sa fragmentation complète (Galluzzi et al., 2014a). Dans le cas de la mort radio-induite, nous pouvons distinguer : l'apoptose, l'autophagie, l'oncose (avec une fin nécrotique) (*Figure I.4.26*) et la mort mitotique. Elle peut survenir immédiatement après l'exposition (surtout observée à forte dose) ou avec

un délai plus ou moins long (mort différée). Ce délai est dépendant de la quantité et de la complexité des dommages (Favaudon, 2000).

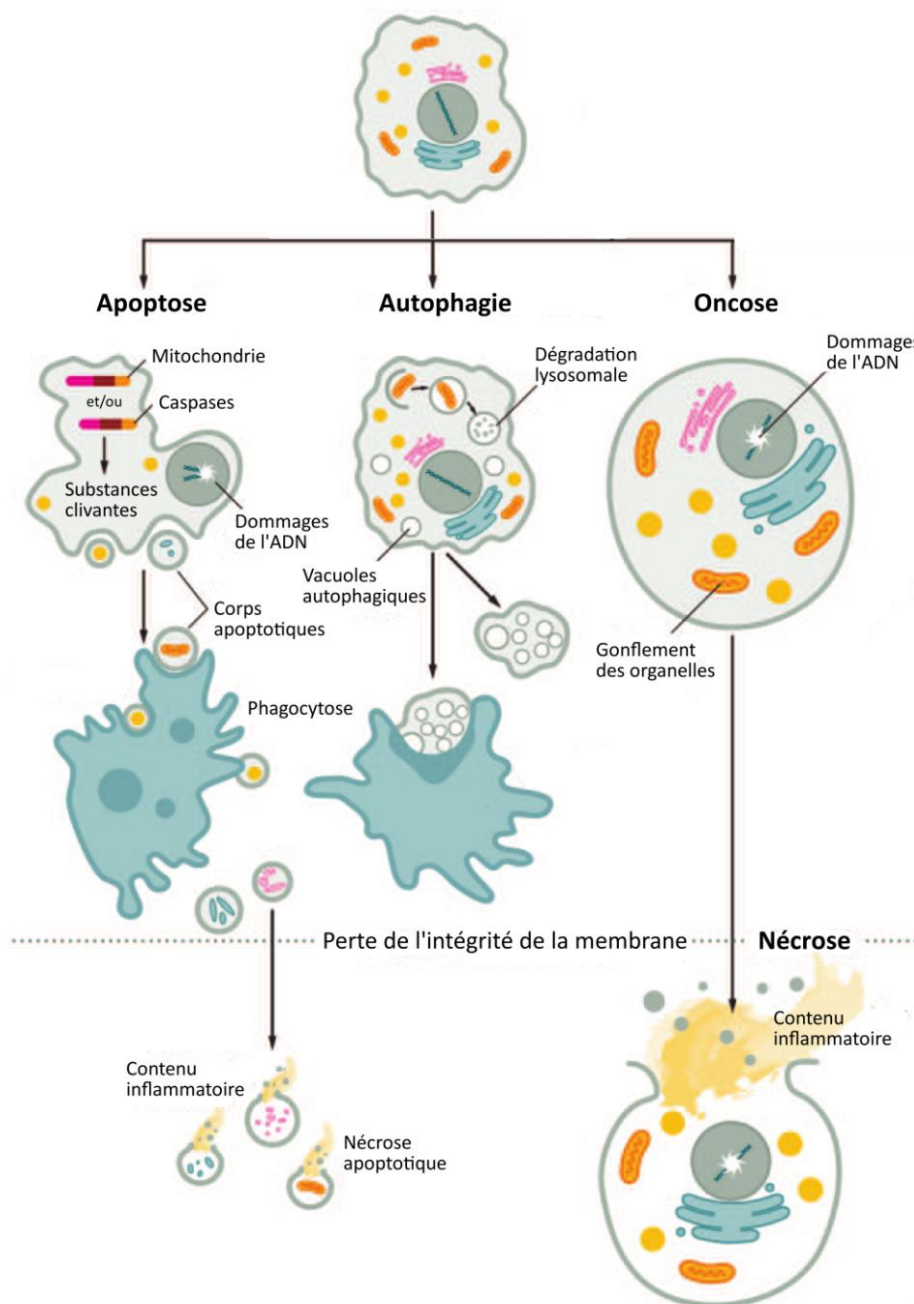


Figure I.4.26 : Morts cellulaires radio-induites. Représentation simplifiée de trois morts cellulaires : l'apoptose, l'autophagie et l'oncose/nécrose. Dans le processus de mort apoptotique des corps sont formés et peuvent être, au sein d'un organisme entier, phagocytés par des cellules phagocytaires ou les membranes peuvent être dégradées avec libération du contenu dans le milieu extracellulaire (nécrose apoptotique). Dans le processus d'autophagie, la cellule libère des lysosomes qui seront, au sein d'un organisme entier, phagocytés. L'oncose, se traduit par un gonflement général des organelles de la cellule, elle se finit en nécrose lorsque la membrane plasmique est lysée et libère son contenu dans le milieu extracellulaire. Adaptée de (Fink and Cookson, 2005).

4.3.1.1. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort qui se produit dans différents processus cellulaires tels que le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire chez l'adulte et la défense contre des agents pathogènes. Elle est également beaucoup décrite dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants. Il existe deux voies principales à l'origine du déclenchement de la mort cellulaire apoptotique : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La première implique l'activation de récepteurs de mort de la superfamille du TNF (Tumoral necrosis factor) situés au niveau de la membrane plasmique, elle est principalement décrite lors des processus immunologiques. La deuxième voie est la principale décrite en réponse à une irradiation. Elle peut être activée par les dommages de l'ADN de manière dépendante de la protéine p53. En effet, p53 est un facteur de transcription impliqué dans l'activation de l'expression de gènes pro-apoptotiques telles que PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), p53AIP1, BAX et APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1). La voie intrinsèque de déclenchement de l'apoptose peut également être provoquée par des dommages aux membranes et la production en grande quantité de céramides (voir le *paragraphe 2.2. « Altération des lipides membranaires »*). Que l'activation initiale ait lieu par les dommages de l'ADN et/ou des membranes, les mitochondries ainsi qu'un ensemble de protéines de la superfamille Bcl-2 sont au centre de cette voie d'activation. La phase finale au niveau moléculaire est l'activation en cascade de protéines ayant une activité cystéine-protéase : les caspases. La caspase-3 est l'un des membres les plus en aval de cette cascade. Elle est responsable de la mise en œuvre de la phase effectrice de l'apoptose (pour revue, (Jin and El-Deiry, 2005)).

Morphologiquement, l'apoptose se caractérise par : l'arrondissement de la cellule, la rétractation des pseudopodes (blocage de la mobilité), la réduction du volume cellulaire et la condensation de la chromatine. Il y a ensuite la fragmentation de l'ADN et de la membrane nucléaire conduisant à la formation de corps apoptotiques. Ensuite s'effectue un bourgeonnement de la membrane plasmique qui garde, néanmoins, son intégrité jusqu'au stade final de l'apoptose et enfin, uniquement *in vivo*, une phagocytose des corps apoptotiques formés (*Figure I.4.26*) (Kerr et al., 1972). Il est important de noter que l'étape de fragmentation de l'ADN ne va pas sans l'activation de la phosphorylation sur la sérine 139 de

l'histone H2A.X dans l'ensemble du noyau (Rogakou et al., 2000). Une autre MPT sur le variant d'histone H2A.X a été associée au processus apoptotique : la phosphorylation sur la tyrosine 142 (H2A.XY142). En effet, dans le processus normal de réponse à un dommage de l'ADN, H2A.XY142 est déphosphorylée (Krishnan et al., 2009; Xiao et al., 2009). Cook et al., ont décrit l'ambivalence du couple γ H2A.X/H2A.XY142 déphosphorylée versus γ H2A.X/H2A.XY142 phosphorylée : le premier initiant les voies de réparation par la fixation de protéines telles que MDC1 et Rad50, et le second initiant l'entrée en apoptose par la fixation de protéines pro-apoptotiques (notamment après des irradiations de 5 Gy et plus) (Cook et al., 2009). La phosphorylation de la sérine 14 de l'histone H2B a également été corrélée avec l'apoptose induite par les UV (Cheung et al., 2003).

4.3.1.2. L'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire indispensable à la dégradation et au recyclage des protéines, des ribosomes et des organites telles que les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou encore l'appareil de Golgi (Klionsky and Emr, 2000; Yang and Klionsky, 2010). Ce phénomène peut se déclencher en condition physiologique, dans des cellules normales en privation de nutriment ou de facteur de croissance (Galluzzi et al., 2014b; Mancias and Kimmelman, 2016), mais également en réponse à différent stress cellulaire tels que les rayonnements ionisants. La majorité des études mettant en évidence des phénomènes d'autophagie en réponse aux rayonnements ionisants le font dans un contexte de cellules cancéreuses (Chaurasia et al., 2016; Yao et al., 2003).

La mort cellulaire par autophagie implique des processus régulés par les gènes de la famille Atgs (Autophagy-related genes) (Hall and Giaccia, 2012; Levine and Klionsky, 2004). Elle commence par la séquestration d'une partie du contenu cytoplasmique dans des vésicules à double membrane connue sous le nom autophagosomes. C'est le complexe protéique LC3 (lipidation of microtubule-associated protein 1 light chain 3) associée à la protéine ATG8 qui permet la fixation de constituants cytoplasmiques à la membrane de l'autophagosome facilitant ainsi leur séquestration (Mancias and Kimmelman, 2016). Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes par un processus dépendant

des microtubules. Cette fusion provoque la dégradation, par des hydrolases lysosomales, de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu (*Figure I.4.26*) (pour revue, (Fink and Cookson, 2005; Galluzzi et al., 2012)).

C'est récemment qu'un lien a été mis en évidence entre le phénomène d'autophagie et les dommages de l'ADN, notamment avec les protéines entrant dans la réponse cellulaire aux dommages telles que ATM, PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase) (Rodríguez-Vargas et al., 2012) et également p53 par l'activation de la transcription de gènes pro-autophagiques (pour revue, (Vessoni et al., 2013)). En plus de la présence de γ H2A.X, d'autres MPT d'histones ont été étudiées dans le déploiement du processus d'autophagie, et notamment dans la formation des autophagosomes. Nous pouvons citer, H4K4me3, H4K20me3, H3K9me2, H3K56ac et enfin H4K16ac (Füllgrabe et al., 2013; Füllgrabe et al., 2014a). Cependant aucune n'a été étudiée dans le contexte d'un stress génotoxique.

4.3.1.3. L'oncose/nécrose

L'oncose finissant par un processus de nécrose a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée, cependant, des études montrent que son exécution peut être finement régulée par un ensemble de voies de transduction du signal et de processus cataboliques (Festjens et al., 2006; Golstein and Kroemer, 2007). Des récepteurs de mort de la superfamille du TNF tels que TNF-R1, Fas et TRAIL-R sont notamment impliqués dans le déclenchement du processus d'oncose. En réponse aux dommages de l'ADN, l'oncose peut être initiée par les protéines PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase). Les protéines PARP participent à la réponse cellulaire aux dommages en synthétisant une chaîne de poly ADP-riboses à partir d'ADN simple brin. Pour cette réaction, PARP utilise du NAD^+ (nicotinamide adenine dinucléotide) comme substrat (Herceg and Wang, 2001). Cependant, NAD^+ joue aussi le rôle de coenzyme entrant dans le métabolisme de l'ATP. Une activité excessive de PARP, causée par une quantité importante de dommages, va induire la décroissance de NAD^+ (nicotinamide adenine dinucléotide). Cette diminution du taux de NAD^+ va impliquer l'altération de la balance énergétique de la cellule participant au

déclenchement du processus d'oncose (Kirkland, 1991; Thies and Autor, 1991; Walisser and Thies, 1999), pour revue (Fink and Cookson, 2005).

Morphologiquement, elle se caractérise par une altération mitochondriale (avec formation de ROS), une dégradation des lipides, un gonflement du cytoplasme et des organelles et une augmentation de la perméabilité membranaire. Le terme nécrose est utilisé lors de l'étape de lyse de la membrane cytoplasmique et de libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire (*Figure 1.4.26*) (Favaudon, 2000; Golstein and Kroemer, 2007; Kroemer et al., 2009). La libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire participe, au niveau d'un organisme, au processus inflammatoire associé à la nécrose tissulaire.

4.3.1.4. Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique n'est pas une mort cellulaire en soi mais un évènement qui peut conduire à différentes situations létales (*Figure 1.4.27*) (Galluzzi et al., 2012; Vitale et al., 2011). Elle est fréquemment observée en réponse à une exposition aux rayonnements ionisants (Favaudon, 2000).

La catastrophe mitotique peut être provoquée par des dommages de l'ADN mal réparés induits en phase S et G2 ou des altérations du fuseau mitotique induits en phase M, conduisant à des problèmes d'alignements des chromosomes (Castedo et al., 2004). La catastrophe mitotique peut conduire directement à la mort cellulaire sans achèvement de la phase M, elle est appelée mort mitotique (*Figure 1.4.27, point 1*). Dans ce cas, la phase finale de cette mort est phénotypiquement proche de celle de l'oncose, à savoir, un gonflement du cytoplasme et une augmentation de la perméabilité membranaire (Tubiana, 2008).

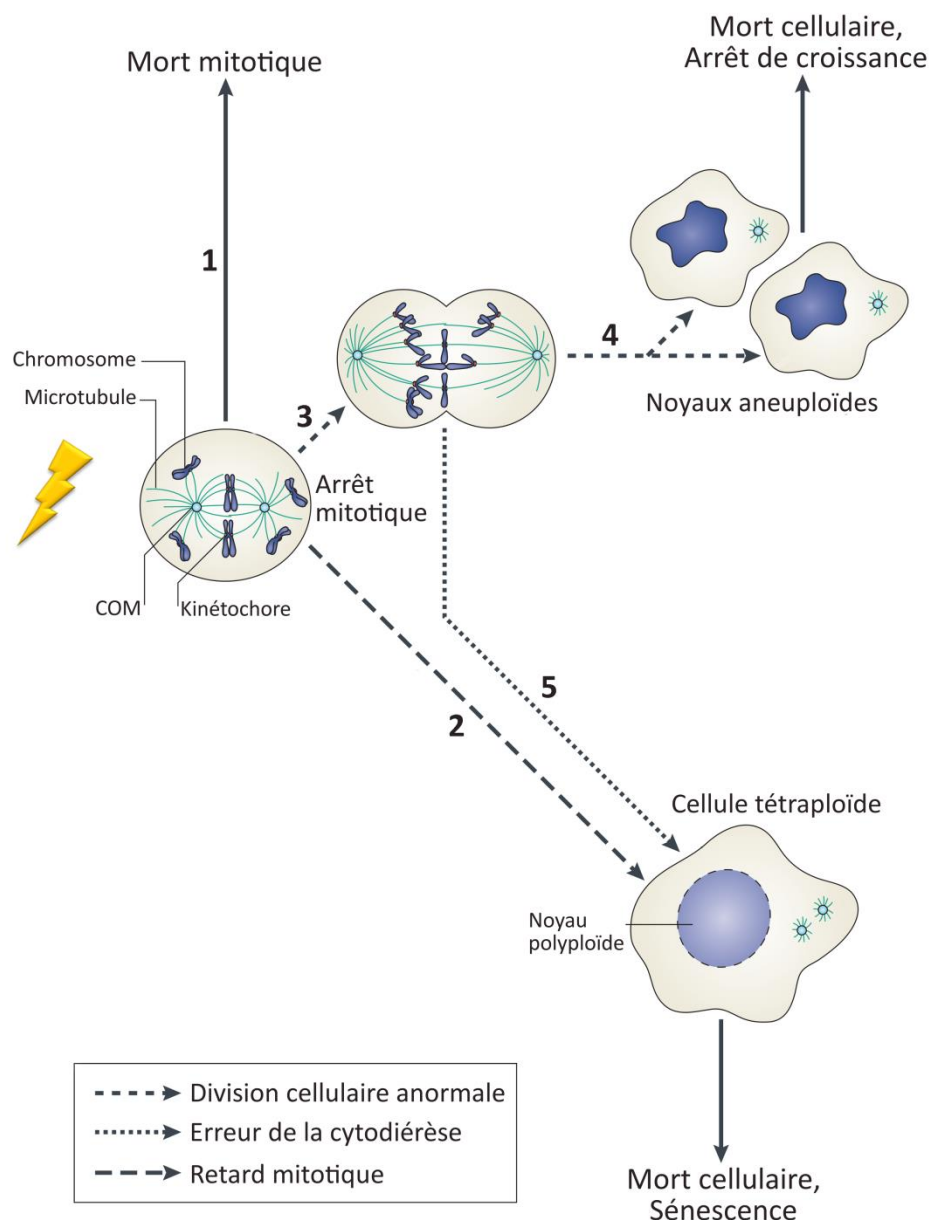


Figure I.4.27 : Catastrophe mitotique et mort cellulaire. Lorsqu'une cellule commence la mitose avec des dommages de l'ADN non ou mal réparés le PCAFM s'active, il y a arrêt mitotique. Puis, soit le PCAFM reste activé et la cellule part vers une mort mitotique (1) ou il n'y a pas séparation des cellules filles avant la décondensation des chromosomes et la cellule survit avec un génome tétraploïde (2). La cellule endommagée peut également effectuer la métaphase si le PCAFM est inactivé (3) et soit finir la mitose et engendrer des cellules filles aneuploïdes (par exemple) (4), soit ne pas effectuer la cytotéière et rester tétraploïde (5). Dans les cas où la cellule survie, il y aura instabilité génomique. Adaptée de (Vitale et al., 2011).

Une mauvaise réparation des dommages de l'ADN peut conduire à la formation d'aberrations chromosomiques. Suivant la nature des aberrations chromosomiques, un mauvais alignement sur le fuseau mitotique est possible

induisant un blocage mécanique et/ou du PCAFM conduisant à la formation d'une cellule tétraploïde (*Figure I.4.27, point 2*). Une rupture du chromosome aberrant, due à la tension exercée (*Figure I.4.27, point 3*), peut provoquer une répartition asymétrique du matériel chromosomique entre les deux cellules filles (*Figure I.4.27, point 3 et 4*) ou un blocage de la phase M et la formation d'une cellule tétraploïde (*Figure I.4.27, point 5*). Des aberrations chromosomiques de type anneau centrique et chromosome dicentrique peuvent induire ce genre de situation (*Figure I.4.28, A et B, respectivement*) (Carrano and Heddle, 1973). La mauvaise répartition du matériel chromosomique peut également impliquer une perte sous forme de micronoyau. En effet un micronoyau peut contenir un fragment voir même un chromosome entier qui, n'étant pas aligné sur le fuseau mitotique se retrouve exclu des deux noyaux fils (Fenech et al., 2011).

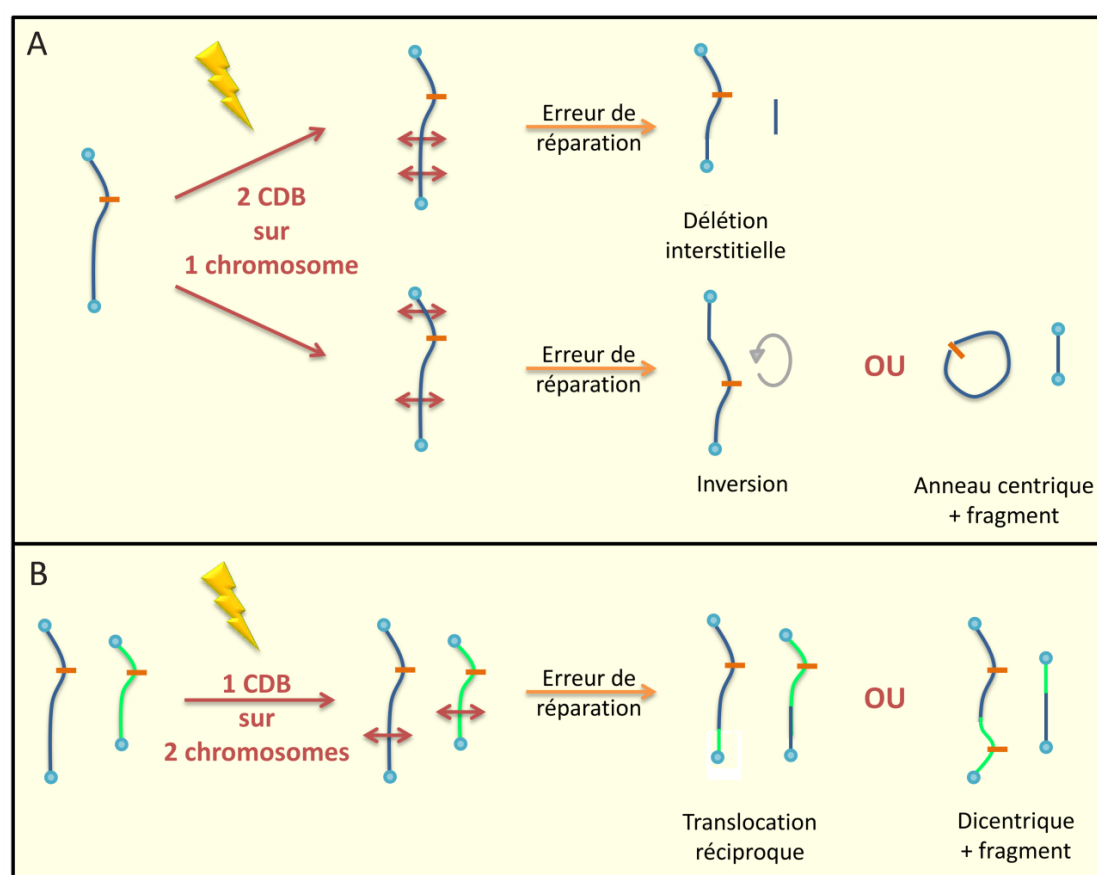


Figure I.4.28 : Différents types d'aberrations chromosomiques. Nous nous sommes placés dans le cas où les CDB sont faites en phase G1 quand l'ADN est en une copie dans le noyau. **(A)** Remaniements possibles lorsque deux CDB (flèches rouges à deux sens) se produisent sur le même chromosome. **(B)** Remaniements possibles lorsque deux chromosomes sont impliqués avec l'exemple simple d'une seule CDB (flèches rouges à deux sens) sur chacun d'entre eux.

Dans tous les cas, une mauvaise ségrégation des chromosomes est un vecteur d'aneuploïdie et d'instabilité génomique important pouvant conduire à terme une mort cellulaire dite différée ou à la sénescence (*Figure 1.4.27*) (Favaudon, 2000; Vitale et al., 2011).

4.3.2. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire se caractérise par un arrêt irréversible du cycle associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. Deux types de sénescence sont à distinguer de par leur cause : répllicative ou prématurée. La première est programmée, elle est due au raccourcissement des télomères au cours des divisions cellulaires successives (Bodnar et al., 1998; Harley et al., 1990). L'autre est induite à la suite d'un stress provoquant des dommages de l'ADN (rayonnements ionisants par exemple) ou l'activation de l'expression de l'oncogène ras (transposition virale par exemple) (Rodier et al., 2009; Rodier et al., 2011; Serrano et al., 1997). Ainsi, la sénescence radio-induite peut découler directement en réponse à un trop grand nombre de dommages ou faire suite à une catastrophe mitotique (*Figure 1.4.27*). Dans tous les cas, elle se caractérise par un arrêt du cycle, en phase G1, qui est lié à l'inhibition de la protéine PCNA et des complexes des cyclines D, E et A induite par la surexpression de la protéine p21WAF1 et p16INK4 (inhibiteurs des CDK). Cette surexpression est médiée par la protéine p53 (Rodier et al., 2009). Ce blocage du cycle est associé à la formation de zones d'hétérochromatine (Rai and Adams, 2012), impliquant le variant d'histone macroH2A (Schulz and Tyler, 2005; Zhang et al., 2005) et la déacétylation de H4K16 (Contrepois et al., 2012), induisant le silence de nombreux gènes notamment des gènes pro-proliférations (Narita et al., 2003). Cette modification de l'expression des gènes peut également entraîner une perturbation du phénotype cellulaire. En effet, les cellules sénescents ont une activité métabolique et surtout sécrétoire impliquant une possible action sur les cellules voisines. Elles sont caractérisables notamment par l'expression dans leur cytoplasme de la β -galactosidase (Dimri et al., 1995) et par l'excrétion de facteurs de croissance (Coppe et al., 2006), de protéases et de cytokines (IL-6, IL-8) (Kuilman et al., 2008). Ces cellules peuvent également présenter des foyers

nucléaires persistants contenant des protéines de la réponse cellulaire aux dommages telles que ATM, ATR et γ H2A.X (*Figure I.4.29*) et pouvant être localisés au niveau de l'ADN télomérique (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Fumagalli et al., 2012; Rodier et al., 2009; Rodier et al., 2011). Ces foyers nucléaires persistants sont associés avec des corps nucléaires PML (CN-PML, Promyelocytic leukemia protein) au sein de cellule en sénescence (Rodier et al., 2011). Les CN-PML sont des structures nucléaires sphériques et dynamiques (Lang et al., 2010) qui participent à la réponse cellulaire suite à un stress (Bernardi and Pandolfi, 2007). Ils sont notamment impliqués dans cette réponse de par leur rôle dans la régulation de la protéine p53 (Pearson et al., 2000; Takahashi et al., 2004).

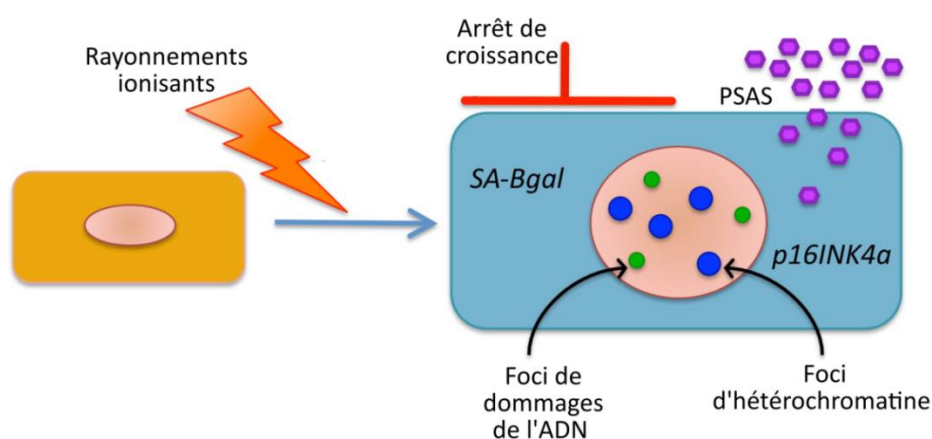


Figure I.4.29 : Marques des cellules en sénescence cellulaire. Les rayonnements ionisants peuvent induire de la sénescence prématurée. Elle se caractérise par un arrêt de croissance, la surexpression de certaines protéines telles que p16^{INK4a} et un profil sécrétoire important (PSAS). Au niveau de leur noyau, il y a présence de foyers d'hétérochromatine induisant l'extinction de gènes. Des foyers résiduels de dommage de l'ADN peuvent également être observés. Tirée de (Rodier and Campisi, 2011).

4.3.3. L'instabilité génomique radio-induite

L'instabilité génomique décrit un phénomène d'accumulation d'altération du génome se produisant au cours des générations issues de cellules exposées à un stress génotoxique (rayonnements ionisants, radiomimétiques chimiques, nucléases, etc.) (*Figure I.4.25*). Ces altérations peuvent être des mutations géniques, des réarrangements chromosomiques, la perte de chromosome ou de fragment chromosomique (*Figure I.4.28*) pouvant conduire à une létalité

cellulaire différée (*pour revue*, (Suzuki et al., 2003a)). L'instabilité génomique est décrite comme un des moteurs de la carcinogénèse (*pour revue*, (Huang et al., 2003; Little, 2000)). Elle augmente lorsque des gènes clés, tels que ceux qui codent pour la protéine p53 (suppresseur de tumeur) ou encore pour les protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN (ATM, DNA PK, *etc.*), sont mutés rendant impossible la production de protéines fonctionnelles (*pour revue*, (Negrini et al., 2010)).

Depuis quelques années, des études suggèrent qu'une mauvaise restauration de la chromatine après réparation de la séquence d'ADN peut également être un moteur d'instabilité génomique (Soria et al., 2012) et de modification de l'expression génique (Adam et al., 2013) transmissible aux générations cellulaires suivantes (Probst et al., 2009). C'est un domaine de recherche, actuellement, en plein essor.

Partie II.

Objectifs de thèse

Cela fait plusieurs décennies que nous savons que les rayonnements ionisants provoquent des dommages dans l'ensemble des compartiments subcellulaires et notamment au niveau de l'ADN et que ces dommages peuvent être létaux à plus ou moins long terme si ils ne sont pas correctement réparés par la cellule. Malgré son exactitude, cette vision reste pour le moins simpliste car la nature stochastique des rayonnements ionisants induit mécaniquement une combinatoire phénoménale de dommages. Ainsi, la nature des dommages mais également le contexte chromatinien dans lequel ils se produisent sont aléatoires d'une cellule à l'autre. A l'échelle d'une population cellulaire exposée, il y a donc une diversité de devenir cellulaires possibles et c'est certainement leur caractérisation et la quantification de leur proportion respective qui est aujourd'hui nécessaire à la compréhension du devenir pathologique des tissus irradiés. A ce jour, les phénomènes de réparations non-fidèles des dommages radio-induits sont relativement bien caractérisés, notamment via la formation des aberrations chromosomiques. Il n'en est pas de même dans le cas d'une absence de réparation qui est généralement associée à une mort inéluctable des cellules. Cependant, des travaux récents commencent à suggérer que ce phénomène de non-réparation pourrait également être lié à l'induction de la sénescence cellulaire ou d'une instabilité génomique. Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse a été de caractériser cette absence de réparation en étudiant sa fréquence au sein d'une population de cellules humaines normales irradiées et en analysant ses conséquences sur devenir cellulaire.

Dans ce travail, les cassures double brin de l'ADN ont été utilisées comme indicateurs de dommages de l'ADN, non seulement car elles sont particulièrement délétères pour les cellules mais également car il existe des outils pour les observer et les localiser dans les noyaux cellulaires. Ces cassures ont été suivies de façon indirecte par l'observation de la signalisation mise en place par la cellule juste après la formation des dommages. L'objectif général a été découpé en trois étapes. Tout d'abord, une étude de l'évolution de cette signalisation en fonction du temps et du taux de dommages initiaux a été menée. En a découlé, ensuite, l'exploration des cas de persistance de la signalisation des dommages dans le

temps et de leurs causes éventuelles. Et enfin, a été analysé l'impact de cette persistance sur le devenir des cellules et notamment sur leur division.

Partie III.

Matériels et Méthodes

1. Stratégie expérimentale

Pour répondre aux objectifs de ce travail, nous avons mis en place une stratégie expérimentale permettant une étude à l'échelle de populations de cellules primaires humaines normales exposées aux rayonnements ionisants.

La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN est dépendante de l'état de compaction de la chromatine et de la phase du cycle cellulaire. Nous avons donc choisi d'homogénéiser, autant que possible, cette réponse par l'induction des dommages de l'ADN dans des cellules synchronisées en phase G0/G1. De plus, nous avons mené cette étude sur des cellules endothéliales primaires, HUVEC, dont les zones d'eucromatine et d'hétérochromatine sont peu marquées dans le noyau.

Deuxième point important, nous avons choisi de réaliser l'essentiel des expériences sur la base de marquages en immunofluorescence et par la détection *in situ* des différents observables étudiés (*Figure III.1.1, A*). En effet, dans l'étude de la signalisation des dommages de l'ADN, des causes et potentielles conséquences, il est intéressant d'avoir accès à localisation des dommages de l'ADN au sein des noyaux et à une vision spatiale d'éventuelle colocalisation avec différentes protéines d'intérêts.

Le troisième point déterminant dans le choix de cette stratégie expérimentale est le souci d'avoir une vision probabiliste de l'occurrence des observables analysés à l'échelle d'une population cellulaire irradiée. Pour cela, nous avons utilisé une plateforme de microscopie à fluorescence couplée à un logiciel d'analyse d'images et nous avons développé une méthodologie d'analyse de masse des données générées (*Figure III.1.1 B et C*).

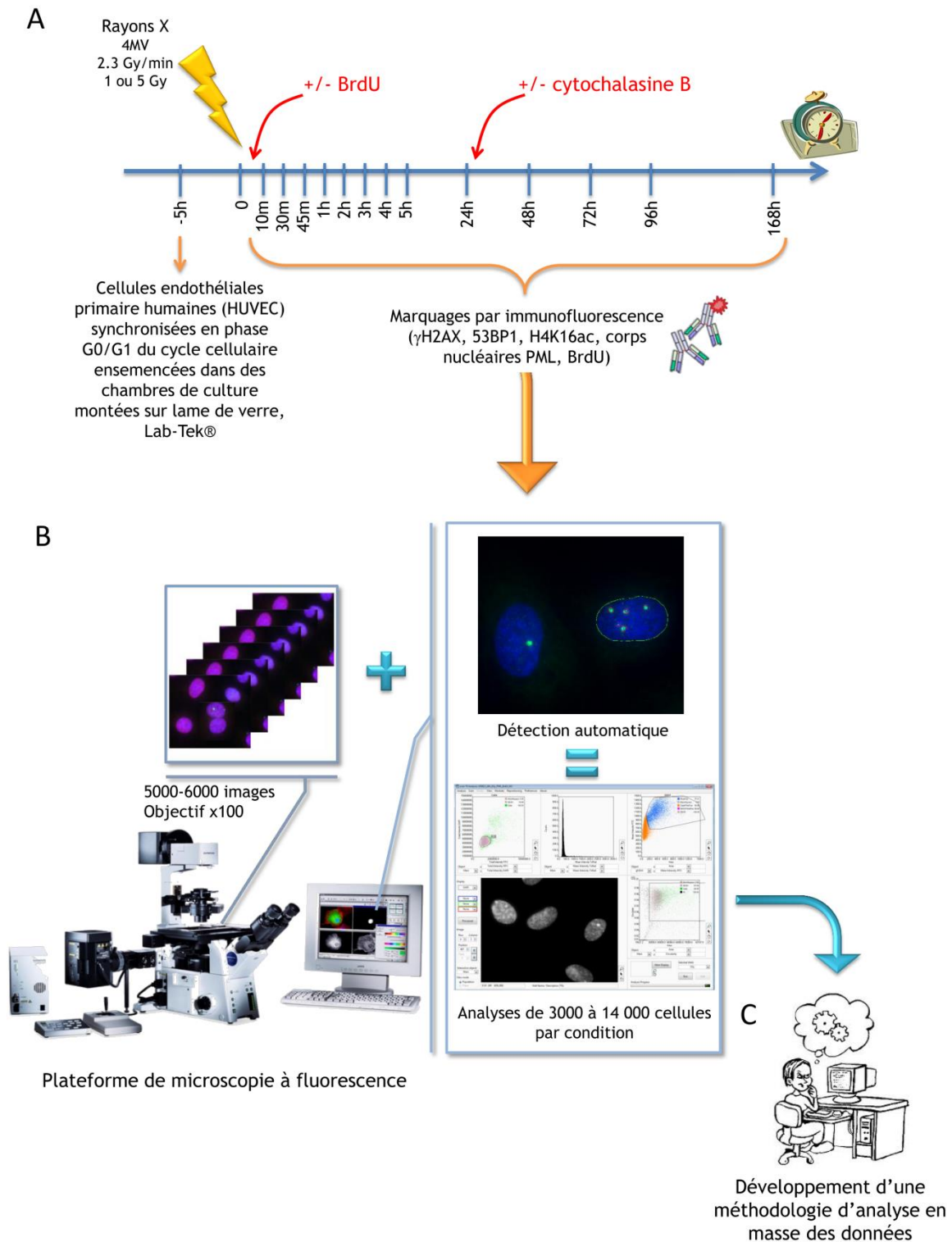


Figure III.1.1 : Stratégie expérimentale : (A) Choix d'expériences basées sur des marquages en immunofluorescence. (B) Utilisation d'une plateforme de microscopie à fluorescence couplée à un logiciel d'analyse d'images. (C) Développement d'une méthodologie d'analyse de masse des données générées

2. Modèle cellulaire et cultures

2.1. Modèle cellulaire

Des cellules endothéliales primaires issues de la veine ombilicale ou HUVEC ont été utilisées dans cette étude. Les HUVEC ont été isolées par la société Lonza (C2519A, lot 0000087758) à partir de tissus humains sains (3 individus féminins et 1 masculin). Au préalable, les donneurs ont été testés négatifs pour le VIH-1, l'hépatite B et l'hépatite C, et les cellules ont été testées négatives aux mycoplasmes, bactéries, levures et champignons. Nous avons évalué leur statut cytogénétique par M-FISH lors des passages 2 et 4 (Gruel et al., 2016). Aucune anomalie clonale n'a alors été observée, et les proportions de cellules XX et XY obtenues étaient en accord avec le groupe de donneur initial (3/1).

2.2. Culture cellulaire

2.2.1. Maintien des cellules en culture

Les cellules ont été achetées au passage P1. Pour les amplifier, les cellules ont été décongelées et une ampoule de 780 000 cellules a été ensemencée dans 3 boîtes de culture de 75 cm² soit environ 3400 cellules/cm². Elles ont été cultivées dans une étuve à 37°C, avec 95% d'humidité et 5% de CO₂ dans du milieu de culture EGM-2 optimisé pour la prolifération de ce type de cellules endothéliales. Ce milieu a été complété avec 5% de sérum fœtal bovin, de l'hydrocortisone, du hFGF-B, du VEGF, du R3-IGF-1, de l'acide ascorbique, du hEGF. Des antibiotiques ont également été ajoutés lors de la culture : la gentamicine et l'amphotéricine-B (EGM-2MV BulletKit, CC-3202, Lonza). Après 5 jours de culture, les cellules ont été trypsinées et congelées dans du milieu supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 600 000 cellules par ampoule de congélation (passage P2). Elles ont été stockées dans un congélateur à -150°C.

Pour le maintien en culture, le milieu de culture a été changé tous les 2-3 jours. Les cellules ont été repiquées lorsque la culture était à 80-90% de confluence. Lors du repiquage, les cellules ont été réensemencées à 3750 cellules/cm². Les cellules ont été utilisées à faible passage (P2-P4).

2.2.2. Condition d'ensemencement pour l'irradiation

Avant l'irradiation, les cellules ont été synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Pour obtenir des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire au moment de l'irradiation, nous les avons synchronisées par inhibition de contact, état qui est atteint lorsque les cellules sont à confluence. Pour cela, les cellules issues d'une ampoule de congélation P2 ont été ensemencées dans une boîte de 75 cm². Cinq jours après, lorsqu'elles ont été à confluence, les cellules ont été repiquées sur des lames de verre montées d'une chambre de culture, ou Lab-Tek II Nunc®, avec 2 ou 4 puits de culture (Thermo Fisher Scientific), comme suit :

- 50 000 cellules/cm², temps post-irradiation allant de 10 minutes à 5 heures,
- 30 000 cellules/cm², temps post-irradiation allant de 24 à 72 heures,
- 26 000 cellules/cm², temps post-irradiation 96 et 168 heures.

Elles ont ensuite été remises dans l'étuve à 37°C pour un temps d'adhésion de 5 heures avant d'être irradiées. Il a été vérifié que lors de l'irradiation la majorité des cellules étaient synchronisées en phase G0/G1 soit 88,2% ± 3% de la population cellulaire.

3. Condition d'irradiation

L'irradiation a été faite avec une plateforme Synergy Elekta qui est un accélérateur de rayons X de type médical. Les rayons X produits ont une énergie maximale de 4 MeV (4MVp). L'accélérateur a été calibré à l'aide d'une chambre d'ionisation (PTW 0125cc³) permettant de définir un coefficient de corrélation en kerma air entre les unités de la machine et le Gray. Deux doses différentes ont été

délivrées : 1 et 5 Gy, avec un débit de dose de 2,3 Gy/min et une incertitude sur la dose délivrée de 7%.

Les cellules ont été placées dans un incubateur à 37°C lors de l'irradiation. Après avoir été irradiées les cellules ont été remises en culture dans une étuve à 37°C pour des temps allant de 10 minutes à 7 jours. Durant ce laps de temps, les milieux de cultures n'ont pas été changés.

4. Traitement post-irradiation

4.1. Incorporation du BrdU

Pour contrôler la prolifération cellulaire, nous avons utilisé du BrdU (5-bromo-2'désoxyuridine). Le BrdU est un analogue de la thymidine pour lequel le groupe méthyle en position 5 du cycle pyrimidique a été remplacé par un groupement brome. Il a été mis en excès dans le milieu pour que, lors de la réplication de l'ADN, il soit incorporé dans le brin synthétisé à la place de la thymidine. L'incorporation du BrdU a été détectée à l'aide d'anticorps spécifiques (*Figure III.4.2*).

Juste après l'irradiation, 50 µM de BrdU (B-5002, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés au milieu de culture des cellules. Il a été maintenu tout le long de la culture jusqu'aux marquages par immunofluorescence aux temps post-exposition 5, 24, 48 et 72 heures. Il est important de noter que le phénomène de dilution du BrdU lors des divisions successives ne nous a pas permis d'étudier des temps au-delà de 72 heures. De plus, le BrdU ayant un effet génotoxique (*voir la partie IV « Résultats expérimentaux », chapitre 2 « Etude de l'impact des foyers persistants sur le cycle cellulaire »*), nous n'avons pas pu utiliser une concentration initiale plus forte, ni même en rajouter plusieurs fois durant la culture.

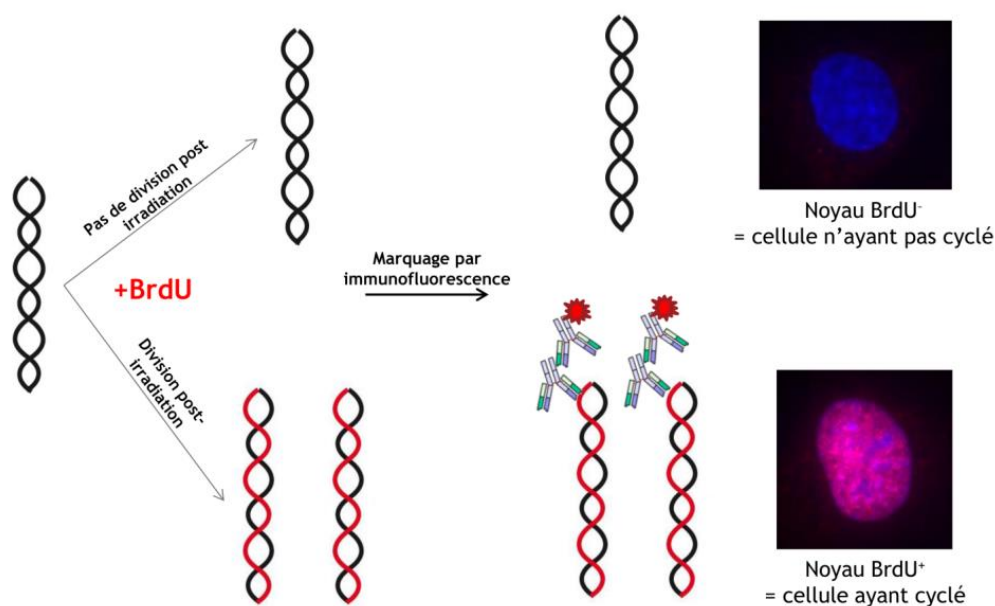


Figure III.4.2 : Représentation schématique du principe de détection du BrdU. La double hélice de l'ADN est représentée à droite. Deux cas de figure sont à envisager. Le panel du bas montre le cas où l'ADN est répliqué, le BrdU est incorporé à la place de la thymidine, cette incorporation est ensuite détectée à l'aide d'anticorps spécifiques du BrdU. Ici, l'immunomarquage est relevé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 594. Une image d'un noyau marqué est donnée pour indication. Le panel du haut montre le cas où l'ADN n'est pas répliqué. Une image d'un noyau non marqué est donnée pour indication (marquage uniquement au DAPI).

4.2. Cytochalasine B

Nous avons utilisé la cytochalasine B pour bloquer la cytodivision et obtenir des cellules binucléées (deux noyaux fils dans le cytoplasme de la cellule mère). En effet, la cytochalasine B bloque la formation des filaments d'actine et ainsi empêche la constriction de la membrane cytoplasmique lors de la séparation des deux cellules filles. Cependant de par son mode d'action, elle devient toxique pour les cellules à partir d'une certaine dose. Une gamme de concentration allant de 0,2 à 4 $\mu\text{g/ml}$, a donc été testée au préalable, par vidéo microscopie en contraste de phase, pour obtenir la concentration qui limite l'effet cytotoxique et optimise l'obtention de cellules binucléées. Les cellules ont été incubées pendant 48 heures avec les différentes concentrations, puis une observation qualitative (état des cellules) et quantitative (nombre de cellules binucléées) du film obtenu ont été effectuées. La concentration de 0,35 $\mu\text{g/ml}$ a été retenue. L'incubation des

cellules irradiées et non irradiées a été faite avec 0,35 µg/ml de cytochalasine B, ajouté au milieu de culture 24 heures après l'irradiation. Les cellules ont été marquées après 24 heures de traitement, soit 48 heures après l'irradiation.

5. Marquages par immunofluorescence

5.1. Protocole de marquage par immunofluorescence

A chaque temps post-irradiation, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (tampon phosphate, 14190-094, Life Technologies), fixées dans une solution de PFA à 4% (paraformaldéhyde, 199431LT, Affymetrix) et perméabilisées avec 0,5% de Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich). Les anticorps primaires qui ont été utilisés dans cette étude ont pour cible γH2A.X, 53BP1 et CN-PML. Ils sont décrits dans le *tableau III.5.3*. Les anticorps ont été dilués dans du PBS 1X avec 2% (poids/volume) de BSA (albumine de sérum bovin, A9418, Sigma-Aldrich) et incubés avec les cellules pendant 1 heure à température ambiante. Après lavages au PBS 1X avec 2% de BSA puis au PBS 1X seul, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires. Les anticorps secondaires utilisés sont décrits dans le *tableau III.5.3*. Ils ont été dilués dans du PBS 1X avec 2% de BSA et incubés avec les cellules pendant 1 heure à température ambiante. L'ADN a été ensuite marqué avec du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole ; 0,2 µg/ml ; 1050A, Euromedex) et les lames ont été montées avec du ProLong® Antifade (P36930, Life Technologies). Vingt-quatre heures après séchage, les lames ont été congelées.

Dans le cas où nous avons étudié la prolifération cellulaire par incorporation de BrdU dans l'ADN néoformé, nous avons effectué un immunomarquage avec des anticorps anti-BrdU. Pour détecter l'incorporation de BrdU, une étape de dénaturation de l'ADN a été faite entre la fixation à la PFA et la perméabilisation. Pour cela, une incubation des cellules, 30 minutes à température ambiante dans de l'acide chlorhydrique 1 M (PROLABO) a été réalisée. Le protocole d'immunomarquage a ensuite été effectué comme décrit précédemment.

Cible		γ H2A.X	53BP1	H4K16 acétylée	BrdU	Corps nucléaires PML
Anticorps primaire	Nature et Hôte	IgG1 monoclonal produit chez la souris	IgG polyclonal produit chez le lapin	IgG polyclonal produit chez le lapin	IgG2a monoclonal produit chez le rat	IgG polyclonal produit chez la chèvre
	Dilution	1/800	1/1000	1/500	1/200	1/250
	Référence	05-636 clone JBW301 Upstate	A300-272A Bethyl Laboratories	07-329 Upstate	ab6326 clone BU1/75 (ICR1) Abcam	sc-9862 Santa Cruz Biotechnology
Anticorps secondaire	Nature et Hôte	anti-IgG de souris produit chez l'âne	anti-IgG de lapin produit chez la chèvre	anti-IgG de lapin produit chez l'âne	anti-IgG2a de rat produit chez l'âne	anti-IgG de chèvre produit chez le poulet
	Fluorochrome	FITC	Alexa Fluor 647	Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 594	Alexa Fluor 647
	Dilution	1/100	1/1000	1/1000	1/500	1/500
	Référence	AP192F Chemicon	A21245 Life Technologies	A21207 Life Technologies	A21209 Life Technologies	A21469 Life Technologies

Tableau III.5.3 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés dans l'étude. Pour chacune des cibles, les caractéristiques des anticorps primaires et secondaires sont détaillées. Pour les fluorochromes : FITC (isothiocyanate de fluorescéine) avec un pic d'émission à 488 nm, l'Alexa Fluor 594 avec un pic d'émission à 594 nm et l'Alexa Fluor 647 avec un pic d'émission à 647 nm. Les taux de dilutions des anticorps primaires et secondaires ont été définis à l'aide d'une gamme de dilution et d'une analyse du rapport signal/bruit de fond.

5.2. Validation des anticorps utilisés

Pour vérifier la spécificité des anticorps primaires dirigés contre H4K16ac et les CN-PML, nous avons mis en place un protocole de blocage des anticorps en utilisant les peptides qui ont servi à les produire. Pour se faire, l'anticorps primaire a été pré-incubé 30 minutes à température ambiante avec son peptide à une concentration finale de 1 μ g/ml. Le mélange a ensuite été utilisé comme tel pour le marquage. Des contrôles ont été effectués en parallèle, à savoir, un marquage classique avec les anticorps primaires et secondaires, et un marquage avec uniquement le peptide bloquant et l'anticorps secondaire. L'anticorps primaire a été validé si la pré-incubation du peptide bloque la fixation de l'anticorps sur sa cible. Pour observer cela, nous avons comparé l'intensité de fluorescence moyenne dans le noyau avec ou sans pré-incubation avec le peptide (*Figure III.5.4*). Ce qui est attendu est une absence de fluorescence dans les noyaux ayant été incubé avec le mélange peptides - anticorps primaires (*Figure III. 5.4*).

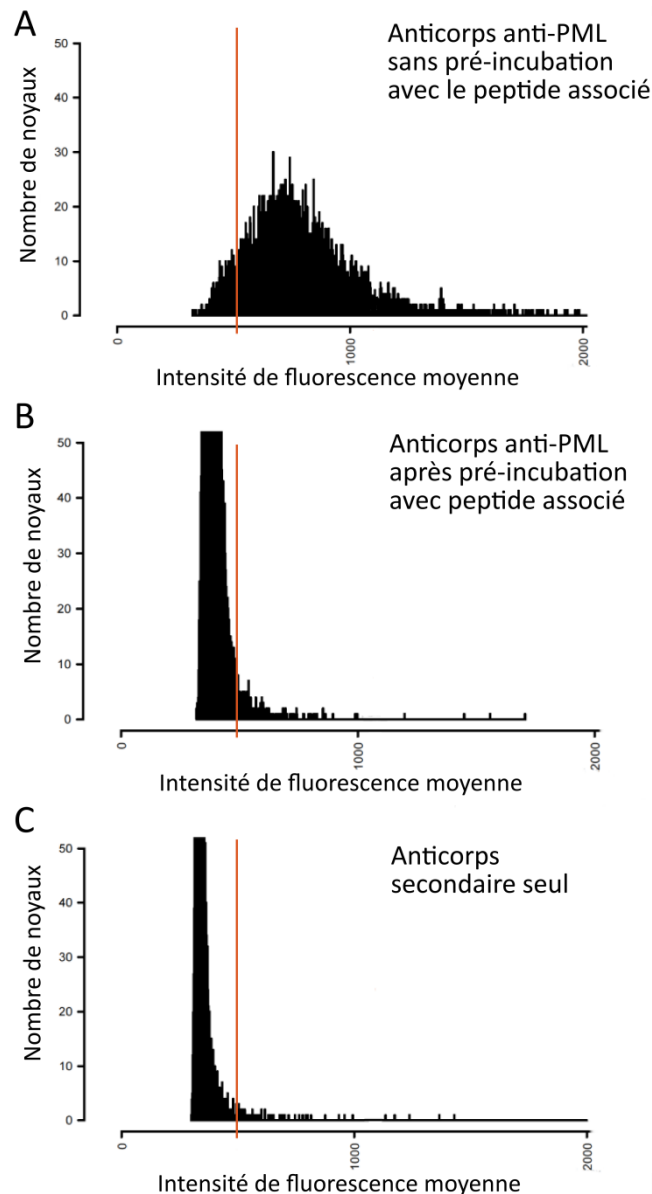


Figure III.5.4 : Exemple d’une validation d’anticorps avec l’anticorps anti-PML. Histogrammes montrant l’intensité de fluorescence moyenne associée à PML (Alexa Fluor 647). **(A)** L’anticorps anti-PML a été incubé seul avec les cellules puis le marquage a été révélé par une incubation avec l’anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. **(B)** L’anticorps anti-PML a été préalablement incubé avec son peptide. Le mélange a ensuite été incubé avec les cellules. Le marquage a été révélé par une incubation avec l’anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. **(C)** Uniquement l’anticorps secondaire couplé à un fluorochrome a été utilisé. L’analyse a été à l’aide du logiciel *Scan^R Analysis* sur environ 8000 noyaux par condition.

L’anticorps anti-BrdU a été validé par comparaison de l’intensité de fluorescence du marquage sur des cellules ayant été incubées en absence ou en présence de BrdU dans la culture. Les anticorps anti- γ H2A.X et anti-53BP1 ont été validés par comparaison entre des conditions irradiées et non irradiées.

Une procédure de validation a également été mise en place pour les anticorps secondaires. L'intensité de fluorescence a été comparée entre des marquages effectués avec l'anticorps secondaire seul et des marquages où l'anticorps primaire a été incubé avant.

5.3. Acquisition par microscopie à fluorescence

A partir des lames marquées en immunofluorescence, des images ont été acquises sur un microscope inversé à fluorescence IX81 d'Olympus. Un objectif avec un grossissement de x100 (UPLSAPO, Olympus) à immersion dans l'huile avec une ouverture numérique de 1,4 a été utilisé. Il est monté sur une tourelle, permettant un déplacement en profondeur de champs (Z) pour la mise au point et la prise d'image sur différents plans focaux. Une lampe xenon/mercure a été utilisée avec quatre couples de filtres de longueurs d'onde d'excitations et d'émissions de fluorescence suivantes : 402 nm $\pm$ 15 nm / 455 nm $\pm$ 50 nm (pour le DAPI) ; 490 nm $\pm$ 20 nm / 525 nm $\pm$ 36 nm (pour le FITC) ; 555 nm $\pm$ 25 nm / 605 nm $\pm$ 52 nm (pour l'Alexa Fluor 594) et 645 nm $\pm$ 30 nm / 705 nm $\pm$ 72 nm (pour l'Alexa Fluor 647). Le microscope est couplé à une caméra Orca R² CCD (Hamamatsu) et une platine motorisée IM IX2 (Märzhäuser), permettant un déplacement sur deux axes X et Y. Le logiciel *Scan^R Acquisition* (Olympus) pilote l'ensemble du microscope.

6. Méthodologie analytique

6.1. Analyses des images

L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel d'analyse d'image *Scan^R Analysis* (Olympus). L'algorithme de segmentation des objets, Edge (Canny, 1986), a été utilisé pour détourer les noyaux dans le canal DAPI (objet principal), les foyers γ H2A.X dans le canal FITC (sous-objet 1) et les foyers 53BP1 ou CN-PML dans le canal Alexa Fluor 647 (sous-objet 2) (*Figure III.6.5*). Cet algorithme trace

les bords des objets au point de contraste entre la fluorescence de l'objet et celle du bruit de fond. Ensuite les bords sont fermés et la forme ainsi détournée constitue l'objet détecté (*Figure III.6.5*). Les paramètres de détection d'objets ont été définis indépendamment pour tous les objets et sous-objets analysés.

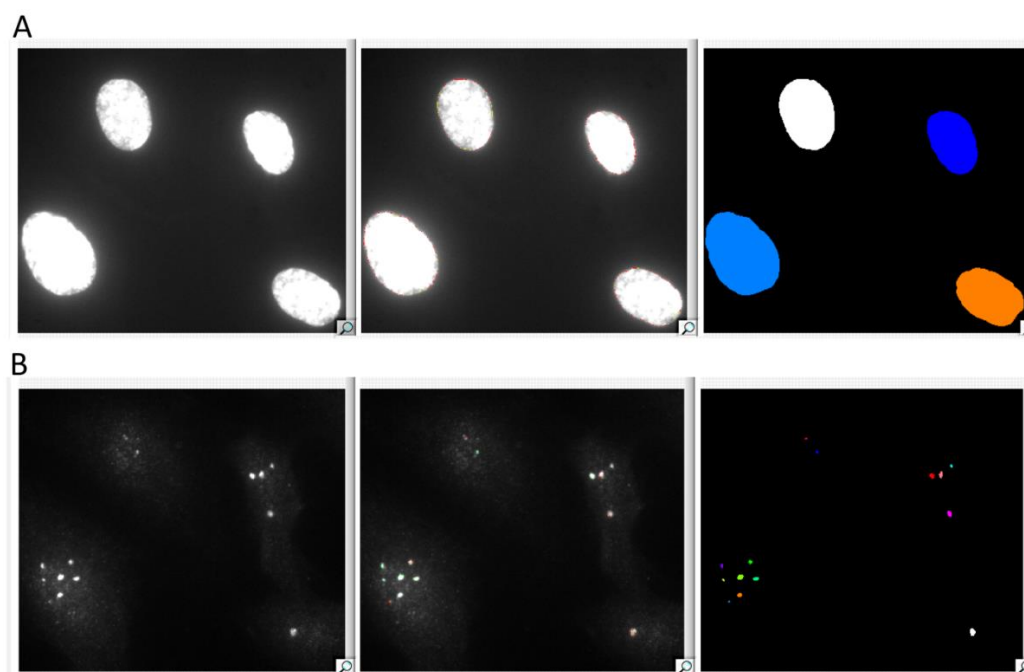


Figure III.6.5 : Détection automatique des objets. Utilisation du module Edge (Canny, 1986), pour détecter les noyaux avec le canal DAPI (objet principaux, **A**), les foyers γ H2A.X avec le canal FITC (sous-objet 1, **B**). La première colonne d'image correspond aux images brutes, la seconde à la première étape de la détection qui est le détournage (rouge ou vert) des objets détectés et la troisième à la deuxième étape de la détection qui correspond à la fermeture des détournages et à l'affichage des objets effectivement détectés par l'algorithme.

Une fois la détection automatique des noyaux et des foyers effectuée, une première sélection basée sur l'aire et la circularité des noyaux a été effectuée par la définition d'une région dans le nuage de points correspondant aux objets principaux (noyaux) (*Figure III.6.6*). Cette étape a permis de sélectionner uniquement les noyaux isolés (« cellules », *Figure III.6.6*, 1), en supprimant de l'analyse les objets correspondant à des groupes de noyaux ou à des débris. A partir de la sélection des noyaux isolés, une deuxième sélection a été faite sur la base des niveaux d'intensité totale de fluorescence de DAPI (ADN) en fonction des niveaux d'intensité totale de fluorescence de FITC (signal γ H2A.X) des noyaux (*Figure III.6.6*, 2). Cette étape a permis de sélectionner les noyaux en fonction de

leur phase du cycle cellulaire : G0/G1 et G2 (Gruel et al., 2016; Löbrich et al., 2010).

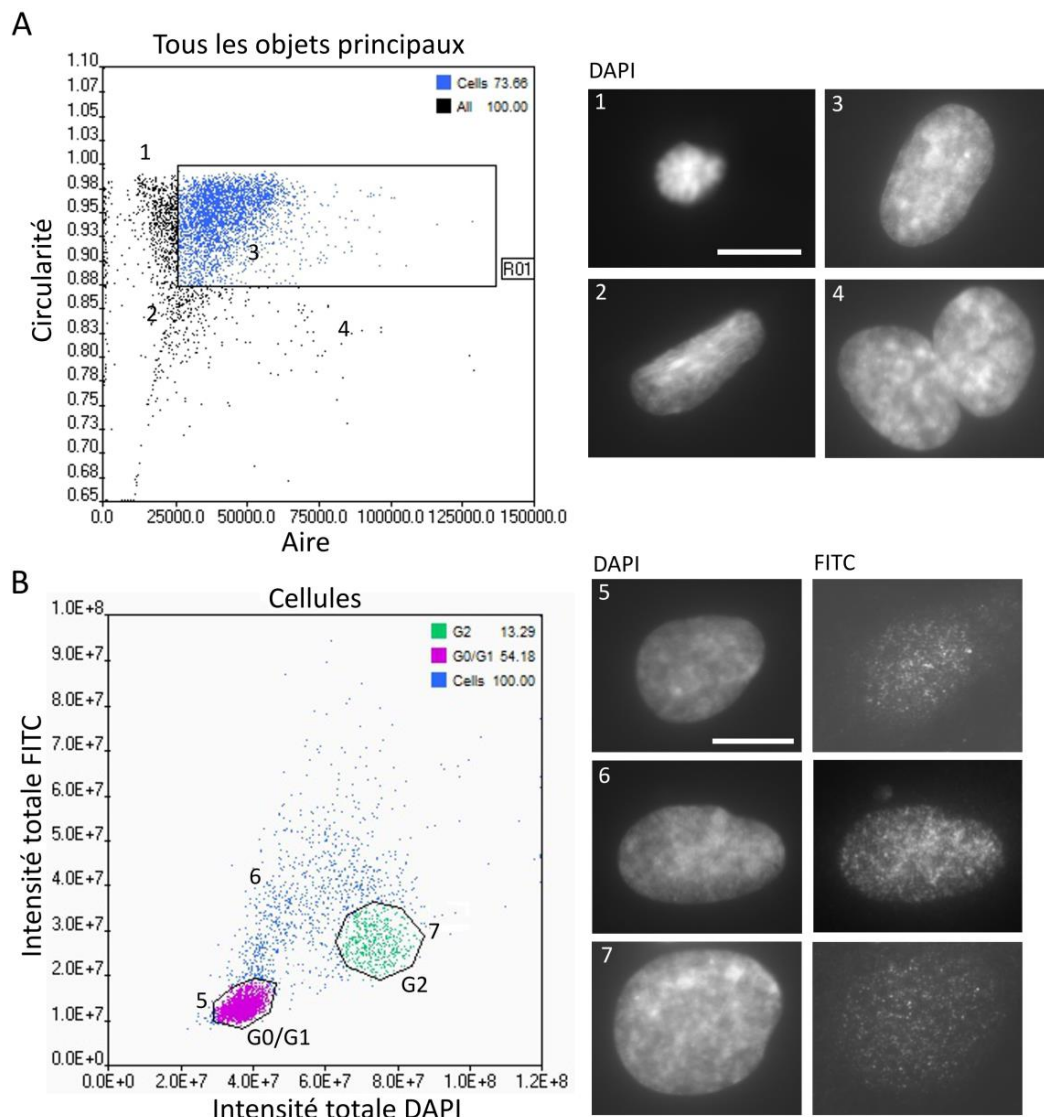


Figure III.6.6 : Analyse des noyaux. (A) Graphiques représentant la circularité des noyaux en fonction de leur aire. Une région « cellules » est établie sur cette base pour définir les noyaux analysables (3, bleu), ainsi sont éliminés les petits noyaux et les fragments de noyaux (1), les noyaux pliés (2) et les doublons (4). (B) Graphiques représentant pour les noyaux l'intensité totale de fluorescence de FITC (signal global γ H2A.X) en fonction de l'intensité totale de fluorescence de DAPI (ADN). Deux régions sont établies sur cette base pour définir les cellules en phase G0/G1 (5) et en phase G2 (7). Les cellules en phase S (6) sont exclues de l'analyse. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

L'analyse d'image a permis l'obtention d'un fichier texte, pour les objets principaux et pour chaque sous-objet, qui répertorient les mesures faites sur chaque noyau / foyer γ H2A.X / foyer 53BP1 / CN-PML (Tableau III.6.7). De plus,

chaque détournage d'objet, noyau et foyer, a été utilisé comme un masque pour l'obtention de valeurs d'intensité de fluorescence dans chacun des canaux utilisés (DAPI, FITC, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647). Aussi pour les foyers γ H2A.X, par exemple, nous avons obtenu des valeurs d'intensité en FITC (fluorochrome utilisé pour le détecter) mais également en DAPI (pour la quantité d'ADN) et en Alexa Fluor 647 (pour la localisation de 53BP1).

Paramètres objets/sousobjets	Caractéristiques	Paramètres spécifiques	Caractéristiques
Numéro de l'objet		Région "Cellules"	
Circularité		Région "G0/G1"	Spécifique aux objets principaux
Facteur de circularité		Région "G2"	
Taille du périmètre		Nombre de sous-objet dans l'objet	
Facteur d'élongation	Paramètres de forme mesurés sur les objets et sous-objets	Numéro de l'objet parent	
Aire		Région "Cellules" de l'objet parent	Spécifique aux sous-objets
Taille de l'axe majeur de l'ellipse		Région "G0/G1" de l'objet parent	
Taille de l'axe mineur de l'ellipse		Région "G2" de l'objet parent	
Ratio des axes de l'ellipse			
Orientation			
(angle de l'axe majeur de l'objet avec l'image)			
Intensité de fluorescence totale			
Intensité de fluorescence moyenne			
Intensité de fluorescence minimum	Pour chaque fluorochrome utilisé		
Intensité de fluorescence maximum			
Variation standard d'intensité de fluorescence			
X			
Y	Coordonnées dans la zone d'acquisition		
Z			
Numéro de l'image			
Centre X	Coordonnées dans l'image		
Centre Y			

Tableau III.6.7 : Paramètres obtenus avec l'analyse d'image. Deux parties sont à distinguer, les paramètres mesurés sur les noyaux (objet principaux) et sur les foyers γ H2A.X / foyers 53BP1 / CN-PML (sous-objets), et ceux mesurés spécifiquement pour les uns ou pour les autres. Les données d'appartenance à une région, sont données en code binaire (0/1) et sont issues des régions tracées lors de l'analyse (Figure III.6.6).

6.2. Analyses des données

Pour chaque condition de temps/dose, quatre fichiers textes contenant les mesures faites sur tous les noyaux, foyers γ H2A.X, foyers 53BP1, CN-PML, respectivement, ont été obtenus. L'analyse de cette grande quantité de données a été effectuée à l'aide d'un logiciel libre de programmation R (R Core Team, 2014), spécialisé dans l'analyse statistique et le traitement des données. Avec ce logiciel, tous les fichiers textes obtenus pour chaque catégorie d'objet (noyaux, foyers

γ H2A.X, foyers 53BP1, CN-PML) dans une même expérience ont été compilés. A partir de ceux-ci, nous avons réalisés des filtrations sur la base des régions G0/G1 et G2, pour isoler les sous populations d'intérêt. Nous avons ensuite travaillé plus spécifiquement sur ces sous populations, telles que les cellules ayant ou non incorporées du BrdU, les foyers γ H2A.X en fonction de leur aire, *etc.* (Figure III.6.8).

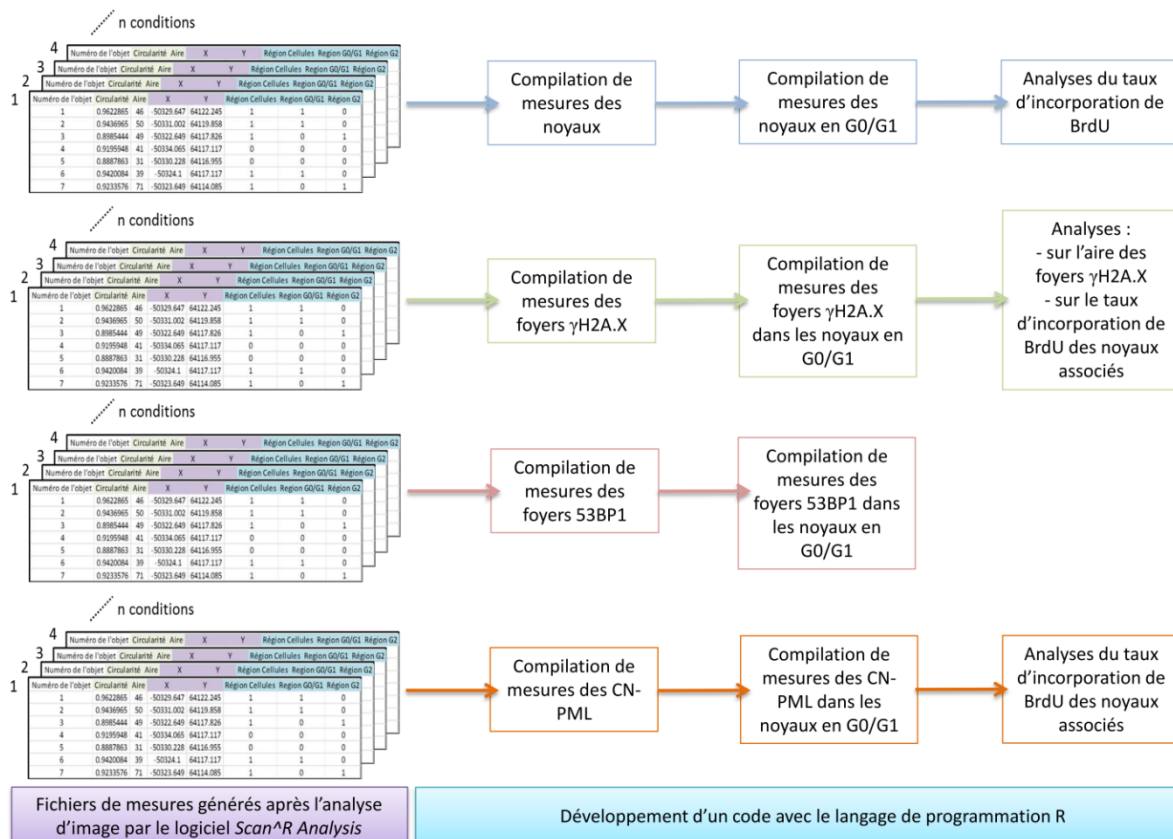


Figure III.6.8 : Traitements des données obtenus après l'analyse d'images. L'analyse d'images a permis d'obtenir des fichiers contenant des mesures sur les différentes catégories d'objets analysées (noyaux, foyers γ H2A.X, foyers 53BP1, CN-PML). Ces données ont été compilées et analysées à l'aide de logiciel de programmation R.

6.2.1. Analyses des foyers γ H2A.X

La cinétique d'évolution des foyers γ H2A.X au cours du temps a été étudiée à partir d'images obtenues après des immunomarquages avec des anticorps anti- γ H2A.X réalisés à des temps allant de 10 minutes à 7 jours après des

irradiations à 1 et 5 Gy (et les contrôles non irradiés correspondants). Nous avons analysé la quantité de ces foyers dans chaque noyau en phase G0/G1.

L'évolution de l'aire des foyers γ H2A.X a été étudiée au cours du temps à partir des mêmes expériences que précédemment. De la même manière que pour la quantité de foyers, leur aire est également un paramètre qui est directement mesuré par le logiciel d'analyse d'image. Ce paramètre d'aire est exprimé en pixel. Pour transformer l'aire donnée en pixel en une aire en micromètre carré (μm^2), la correspondance pixel- μm^2 a été mesurée en fonction de l'objectif du microscope utilisé et de la caméra. Ainsi, il a été défini que 1 μm^2 équivaut à 15,5 pixel pour un grossissement x100.

Nous avons également réalisé une analyse de la densité d'ADN et de H4K16ac (acétylation de la lysine 16 de l'histone H4) au niveau des foyers γ H2A.X sur la base des intensités de fluorescence moyennes associées à l'ADN (DAPI) ou à H4K16ac (Alexa Fluor 594).

6.2.2. Création de foyers simulés

Dans le but de comparer les densités d'ADN, d'H4K16ac, *etc.*, obtenues au niveau des foyers γ H2A.X avec le reste du noyau, nous avons simulé des foyers aléatoirement dans ce dernier. En effet, sachant que la répartition et l'organisation de l'ADN n'est pas homogène dans le noyau, prendre une valeur unique de densité d'ADN à l'échelle du noyau est biaisé. L'idéal est de pouvoir comparer la quantité d'ADN ou d'H4K16ac entre le lieu d'un dommage de l'ADN signalisé par un foyer γ H2A.X et celles de parties dans le noyau sans CDB signalisées. Pour cela, nous avons simulé des foyers aléatoirement dans les noyaux. A l'aide du logiciel de programmation R, nous avons codé, dans une matrice de la taille de l'image générée par l'acquisition (1024 lignes x 1344 colonnes), des carrés de « 1 » correspondant à des foyers aléatoirement répartis dans cette matrice (*Figure III.6.9*). Ces carrés avaient une aire tirée aléatoirement suivant la distribution des aires observées pour les foyers γ H2A.X radio-induits. La densité de carrés au sein de la matrice a également été tirée aléatoirement dans la distribution de densités de foyers par noyau obtenue pour les foyers γ H2A.X radio-induits. Le nombre de matrices a été généré en fonction du nombre d'images

acquises par condition expérimentale. Ces matrices ont ensuite été converties en images Tiff (Urbanek, 2013) (Figure III.6.9).

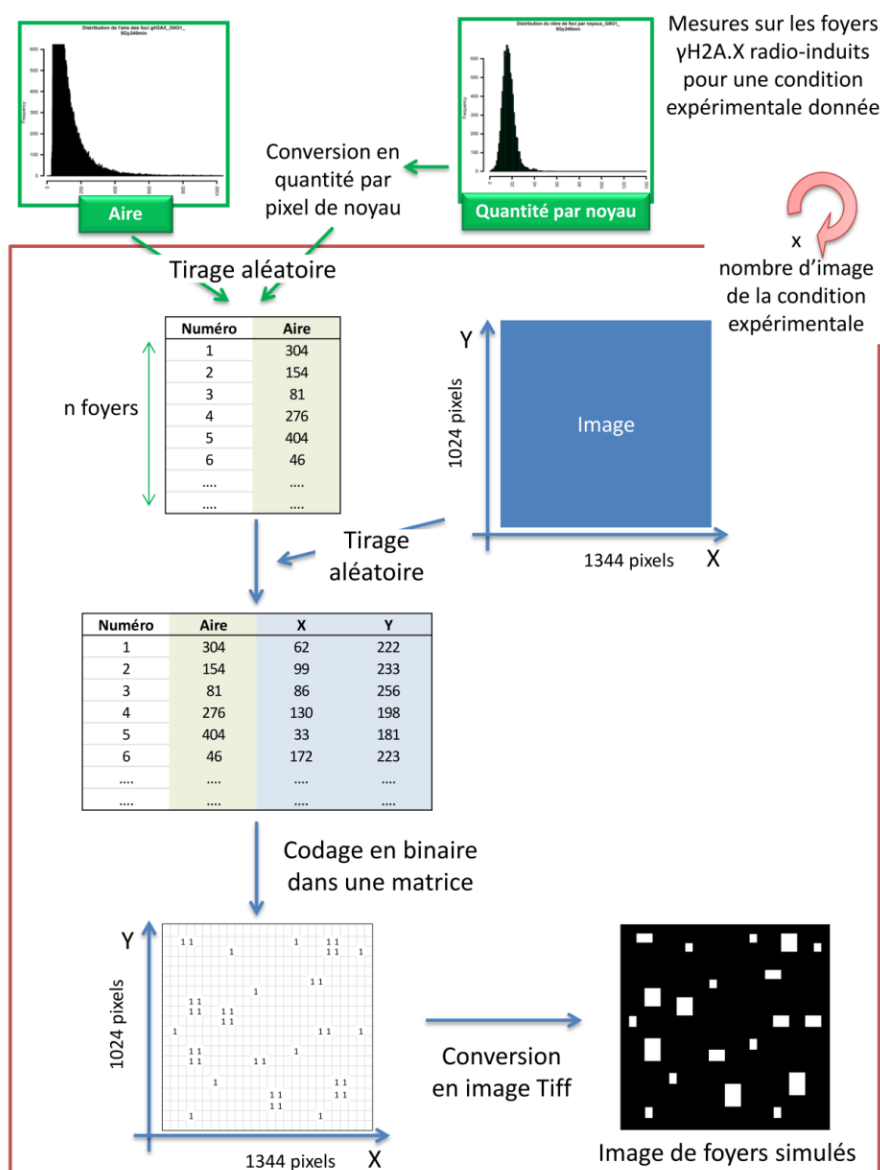


Figure III.6.9 : Etapes de création des images de foyers simulés. Les foyers simulés ont été créés à partir de mesures faites sur les foyers $\gamma\text{H2A.X}$ radio-induits pour une condition expérimentale donnée : aires et quantités par noyau. Les valeurs de quantités de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ par noyau ont été préalablement converties en quantités par pixel de noyau. Un tableau a été créé contenant un nombre de ligne tirée aléatoirement dans la distribution de quantité de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ par pixel de noyau. Ainsi chaque ligne correspondant à un foyer simulé. Pour chaque foyer simulé, une aire a été tirée aléatoirement dans la distribution des aires observées pour les foyers $\gamma\text{H2A.X}$ dans cette même condition expérimentale. Pour chaque foyer simulé a ensuite été tirée aléatoirement des coordonnées en X et Y dans une image de 1024 x 1344 pixel. A partir de ce tableau a été générée une matrice de taille 1024x1344, codé en binaire (0/1) et dont les « 1 » correspondent

aux foyers simulés avec l'aire et la position défini dans le tableau précédent. Cette matrice remplie de 0 et 1 a enfin été converti en image Tiff (Urbanek, 2013). Tout ce processus a fait l'objet d'un développement de code avec langage de programmation R (R Core Team, 2014).

Les foyers simulés aléatoirement ont été analysés de la même manière que les foyers γ H2A.X radio-induits après substitution des images FITC par les images générées. Les paramètres d'aire et de quantité de foyers par noyau des foyers simulés ont été mesurés et comparés avec ceux des foyers γ H2A.X radio-induits pour valider les foyers simulés (Figure III.6.10).

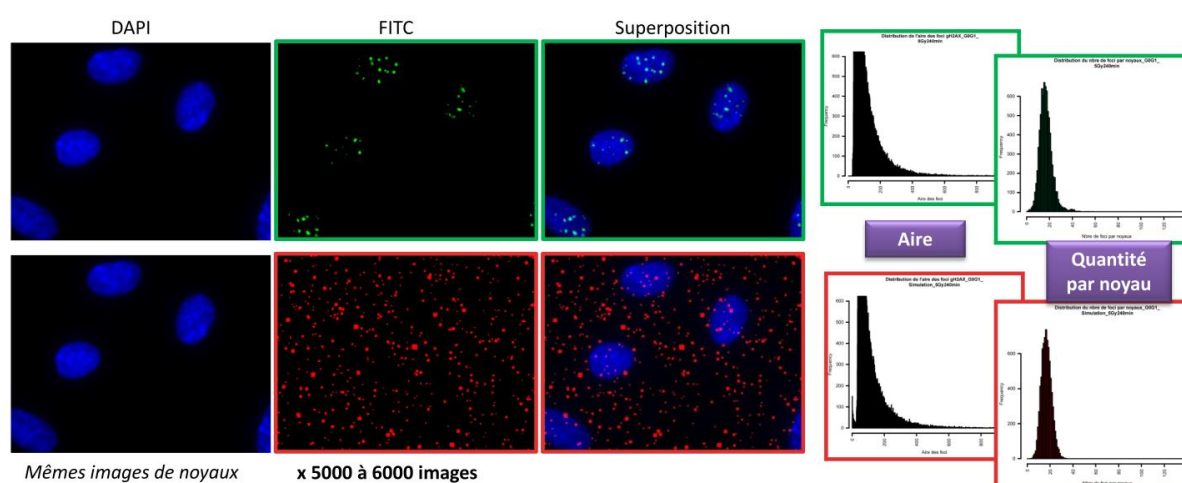


Figure III.6.10 : Analyses des foyers simulés aléatoirement. Les images de microscopie du haut correspondent aux noyaux en DAPI, aux foyers γ H2A.X radio-induits en FITC et à la superposition des deux. Les graphiques en histogramme entourés de vert correspondent aux valeurs d'aire et de quantité de foyers γ H2A.X par noyau observés pour une condition expérimentale donnée. Les images du bas correspondent aux mêmes noyaux en DAPI mais aux foyers simulés aléatoirement en rouge et à la superposition des deux. Les graphiques en histogramme entourés de rouge correspondent aux valeurs d'aire et de quantité de foyers par noyau calculés à partir pour les foyers simulés aléatoirement.

6.2.3. Colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X

La colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X a été analysée à partir d'images obtenues après des immunomarquages avec des anticorps anti- γ H2A.X et anti-53BP1 réalisés à des temps allant de 10 minutes à 7 jours après des irradiations à 1 et 5 Gy (et les contrôles non irradiés correspondants). Pour

analyser, de manière automatique pour un millier de foyers γ H2A.X, la colocalisation de 53BP1, deux étapes ont été nécessaires. Dans un premier temps, il a fallu déterminer à partir de quelle intensité de fluorescence un foyer 53BP1 a été détecté (signal 53BP1 positif). En d'autre terme, à partir de quelle valeur d'intensité de fluorescence le différentiel signal/bruit de fond devient suffisant pour que le logiciel d'analyse d'image détecte un foyer 53BP1. Pour cela, nous avons calculé un ratio d'intensité de fluorescence associée à 53BP1 en divisant la valeur d'intensité moyenne de fluorescence du foyer 53BP1 par celle du noyau correspondant. Ce ratio a été calculé pour chaque foyer 53BP1 de chacune des conditions expérimentales. Ainsi nous avons obtenu une distribution de ratio par condition expérimentale. La valeur minimale a été définie comme étant le seuil au-dessus duquel le signal 53BP1 devient positif. Dans un second temps, ce même ratio d'intensité de fluorescence associée à un signal 53BP1 a été calculé au niveau de tous les foyers γ H2A.X. Lorsque ce ratio est plus grand que le seuil de positivité du signal 53BP1 déterminé plus haut, il y a colocalisation de 53BP1 au niveau du foyer γ H2A.X. Le pourcentage de foyers γ H2A.X colocalisés avec 53BP1 a ensuite été calculé pour chaque condition expérimentale.

6.2.4. Association des CN-PML avec les foyers γ H2A.X

L'association des CN-PML avec les foyers γ H2A.X a été étudiée à partir d'images obtenues après des immunomarquages avec des anticorps anti- γ H2A.X et anti-CN-PML réalisés à des temps allant de 10 minutes à 7 jours après des irradiations à 1 et 5 Gy (et les contrôles non irradiés correspondants). A la différence de l'étude de la colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X, il n'y a pas obligatoirement de superposition entre les marquages de γ H2A.X et des CN-PML puisqu'il s'agit dans ce cas d'une association. L'association d'un CN-PML avec un foyer γ H2A.X radio-induit a donc été définie par la distance euclidienne qui existe entre eux, calculée grâce aux coordonnées dans l'image des deux objets. Pour un foyer γ H2A.X donné, les distances entre son centroïde et le centroïde de tous les CN-PML du noyau ont été calculées. Seule la distance la plus petite a été conservée pour l'analyse. Un foyer γ H2A.X a été considéré comme associé à un CN-PML si la distance entre lui et le CN-PML le plus proche est inférieure à 1 μ m. Le

pourcentage de foyers γ H2A.X associés à un CN-PML a été calculé pour chaque condition expérimentale. Nous avons ensuite appliqué cette procédure analytique aux foyers simulés aléatoirement dans le noyau. Les différences de pourcentage d'association à un CN-PML, des foyers γ H2A.X observés expérimentalement et des foyers simulés aléatoirement ont été comparées statistiquement par le test de Student.

6.2.5. Analyse de la prolifération cellulaire

Nous avons analysé les cellules en fonction de leur incorporation de BrdU et de la phase du cycle. Les analyses ont été faites à partir d'images obtenus après immunomarquages avec des anticorps anti-BrdU, anti- γ H2A.X, anti-53BP1 ou anti-CN-PML. Ces expériences ont été réalisées à des temps allant de 30 minutes à 72 heures après des irradiations à 1 et 5 Gy (et les contrôles non irradiés correspondants). Pour définir si une cellule avait incorporé du BrdU, nous avons fixé un seuil sur la base de l'intensité moyenne de fluorescence associé au BrdU intégrée au noyau dans les cellules non irradiées à 5 heures comparé à 24 heures (Figure III.6.11). Le test statistique de Student a été utilisé pour comparer les moyennes obtenues.

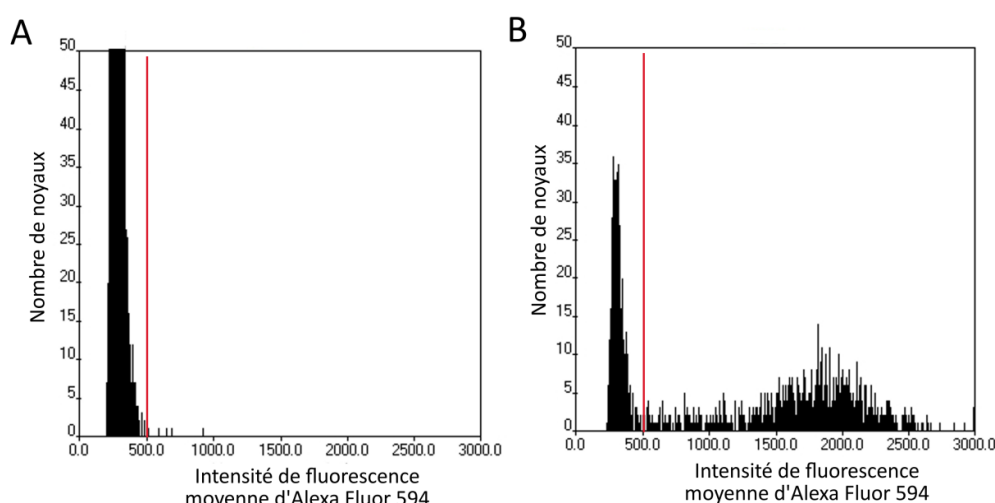


Figure III.6.11 : Visualisation de l'incorporation de BrdU. Histogrammes obtenus par l'analyse d'image via le logiciel *Scan^R Analysis*, représentant l'intensité de fluorescence moyenne des noyaux pour le fluorochrome associé au BrdU. Les valeurs tracées ont été obtenues pour les noyaux non irradiés après 5 heures (A) et 24 heures (B) d'incubation. La barre rouge correspond au seuil au-dessus duquel un noyau a été considéré comme BrdU positif.

6.3. Analyse des cellules binucléées

A la différence des expériences précédentes, l'analyse sur les cellules binucléées a été réalisée sur des cellules traitées à la cytochalasine B et au BrdU. A partir des images obtenues après immunomarquage avec des anticorps anti- γ H2A.X et anti-BrdU, 48 heures après 5 Gy, les cellules binucléées BrdU positives ont été dénombrées manuellement. Pour chaque cellule binucléée, le nombre de foyers γ H2A.X présents dans chacun des noyaux a été compté. Les cellules binucléées ont été classées en fonction de la différence du nombre de foyers γ H2A.X entre les deux noyaux et la proportion de chaque classe a été établie.

6.4. Analyse des anomalies de ségrégation mitotique

Nous avons évalué la présence d'anomalies de ségrégation mitotique au sein des cellules en phase G0/G1 ayant cyclé (BrdU positives), 48 heures après une exposition à 1 ou 5 Gy et dans le contrôle non irradié. A partir des images obtenues après immunomarcages avec des anticorps anti- γ H2A.X et anti-BrdU, la fréquence d'anomalies de mitoses a été calculée sur la base : i) du taux de cellules binucléées, indiquant un problème lors de la cytodierèse (sans ajouter aucune substance chimique), et ii) du taux de mauvaise ségrégation des chromosomes évaluée par la présence de micronoyaux ou de débris de pont nucléoplasmique dans des cellules mononucléées. L'analyse a été faite en distinguant les cellules avec ou sans signal γ H2A.X au niveau du noyau et/ou du micronoyau et/ou du pont nucléoplasmique.

Partie IV.

Résultats expérimentaux

1. Evolution temporelle de la signalisation des dommages de l'ADN

La dynamique des foyers γ H2A.X a été étudiée dans des cellules endothéliales primaires humaines (HUVEC) synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire et exposées à des doses de 1 et 5 Gy de rayons X à différents temps post-irradiation allant de 10 minutes à 7 jours. Les analyses ont porté sur le nombre de foyers γ H2A.X par noyau, leur aire, leur contenu en ADN, leur taux d'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac), la colocalisation de 53BP1 ainsi que la représentativité de ces différents paramètres dans l'ensemble de la population de cellules exposées. Tous les résultats présentés ici concernent uniquement les cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

1.1. Cinétique des foyers γ H2A.X

Le nombre de foyers γ H2A.X par noyau atteint un pic 30 minutes après l'exposition (*Figure IV.1.1, A*), avec $19,9 \pm 1,8$ foyers γ H2A.X à 1 Gy et $54,6 \pm 11,4$ foyers γ H2A.X à 5 Gy (*Figure IV.1.1, B*). En 24 heures, la fréquence des foyers γ H2A.X au sein des noyaux diminue de plus de 90% pour les deux doses. Cependant certains foyers γ H2A.X sont encore observables. Leur quantité devient proportionnelle à la dose d'irradiation, soit 4,6 fois plus de foyers γ H2A.X dans les cellules exposées à 5 Gy par rapport à celles irradiées à 1 Gy : $4,2 \pm 0,5$ et $0,9 \pm 0,2$ foyers γ H2A.X par noyau, respectivement, à 24 heures (*Figure IV.1.1, B*). Sept jours après une exposition à 5 Gy, le nombre moyen de foyers γ H2A.X par noyau est encore de $0,8 \pm 0,3$, toujours significativement plus élevé que celui mesuré dans les cellules non irradiées ($0,4 \pm 0,2$ par noyau; *Figure IV.1.1, B*).

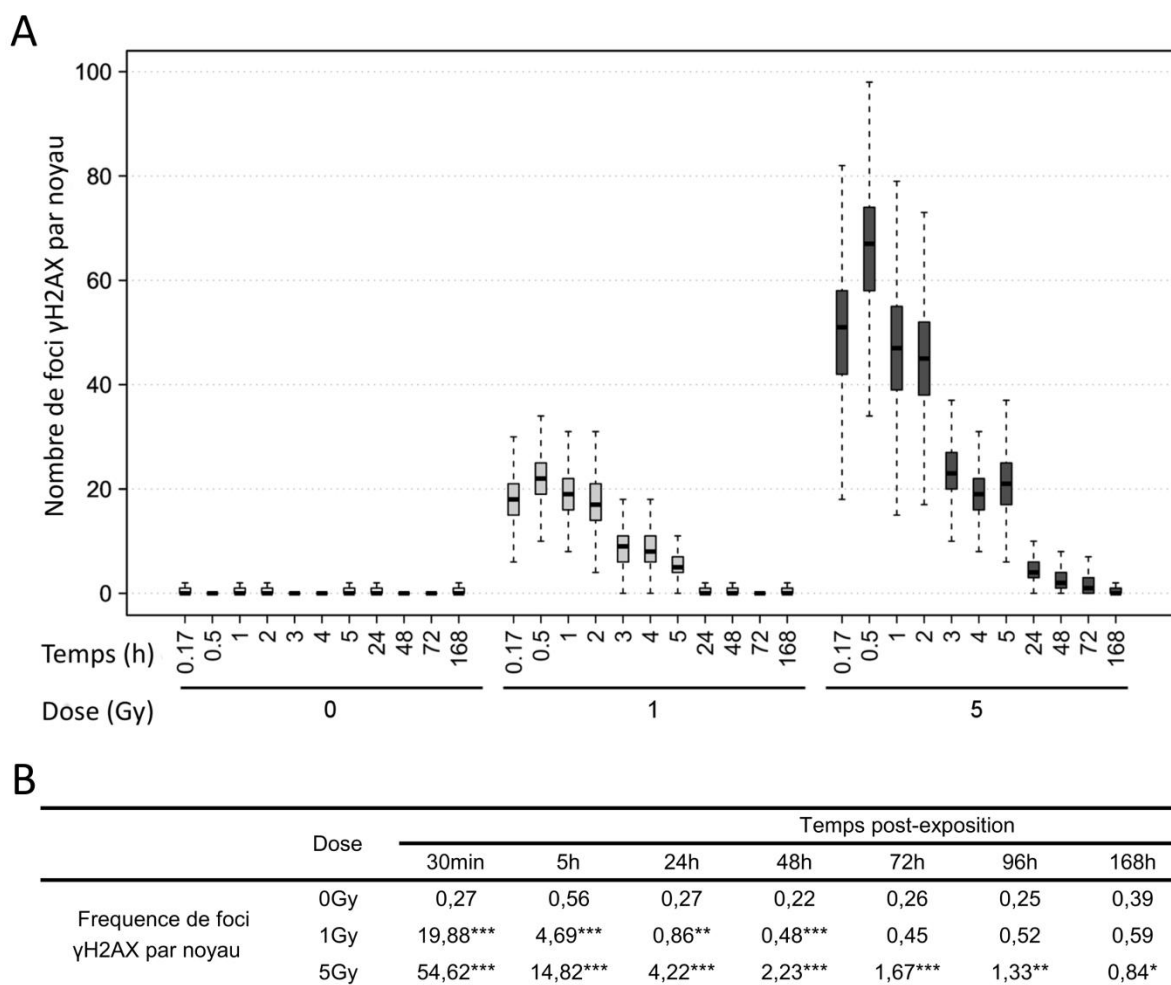


Figure IV.1.1 : Quantification du nombre de foyers γ H2A.X par noyau aux différents temps post-irradiation pour les doses de 1 et 5 Gy. (A) Représentation en boîte à moustaches de la distribution du nombre de foyers γ H2A.X par noyau pour chaque condition. Pour chaque boîte à moustache, la médiane est indiquée par le trait noir au centre de la boîte, les extrémités basse et haute de la boîte correspondent, respectivement, au 1^{ier} et 3^{ième} quartile. Les moustaches représentent les valeurs 1,5 fois inférieures ou supérieures aux quartiles 1 et 3, respectivement (fonction « Boxplot » du logiciel R). Valeurs correspondant à une expérimentation, soit de 400 à 7 700 noyaux par condition. **(B)** Tableau indiquant les fréquences moyennes de foyers γ H2A.X au sein d'une population de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Les valeurs représentent la moyenne calculée sur cinq expériences soit en moyenne 1 400 à 11 000 cellules analysées par condition et par réplica. Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules non-irradiées sont indiquées comme suit : * $\alpha < 0,05$, ** $\alpha < 0,01$ et *** $\alpha < 0,001$.

1.2. Cinétique des aires des foyers γ H2A.X

Pour caractériser ces foyers γ H2A.X encore présents 24 heures après l'exposition, l'évolution de l'aire des foyers γ H2A.X a été analysée au cours du temps (*Figure IV.1.2*). A la dose de 5 Gy, l'aire médiane des foyers γ H2A.X radio-induits augmente à partir de 24 heures et reste élevée jusqu'à 7 jours après irradiation. Ainsi, la majorité des foyers γ H2A.X observables avant 24 heures ont une aire plus petite que les foyers γ H2A.X encore présents après 24 heures (*Figure IV.1.2*). Cette augmentation est moins nette à la dose de 1 Gy, cependant, les distributions des aires observables montrent la présence de foyers γ H2A.X ayant une aire plus élevée après 24 heures et ceci jusqu'à 72 heures après irradiation (*Figure IV.1.2*).

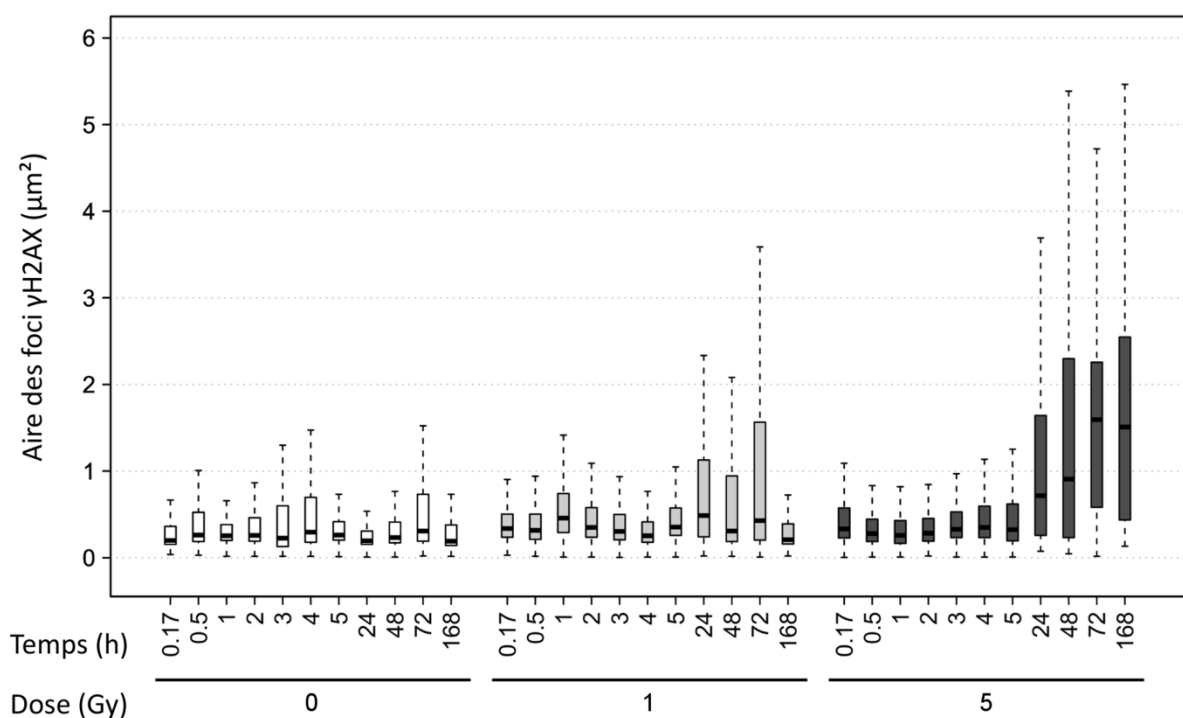


Figure IV.1.2 : Cinétique de l'aire des foyers γ H2A.X en fonction du temps et de la dose délivrée. Représentation en boîte à moustaches de la distribution des aires des foyers γ H2A.X pour chaque condition. Pour chaque boîte à moustache, la médiane est indiquée par le trait noir au centre de la boîte, les extrémités basse et haute de la boîte correspondent, respectivement, au 1^{ier} et 3^{ième} quartile. Les moustaches représentent les valeurs 1,5 fois inférieures ou supérieures aux quartiles 1 et 3, respectivement (fonction « Boxplot » du logiciel R). Les valeurs correspondent à une expérimentation représentative avec 9 500 à 180 000 foyers γ H2A.X analysés aux temps précoces et 350 à 6 500 aux temps tardifs.

La *Figure IV.1.3*, montre une image de microscopie illustrant cette modification de l'aire des foyers γ H2A.X entre 30 minutes et 72 heures après une exposition des HUVEC à 1 Gy.

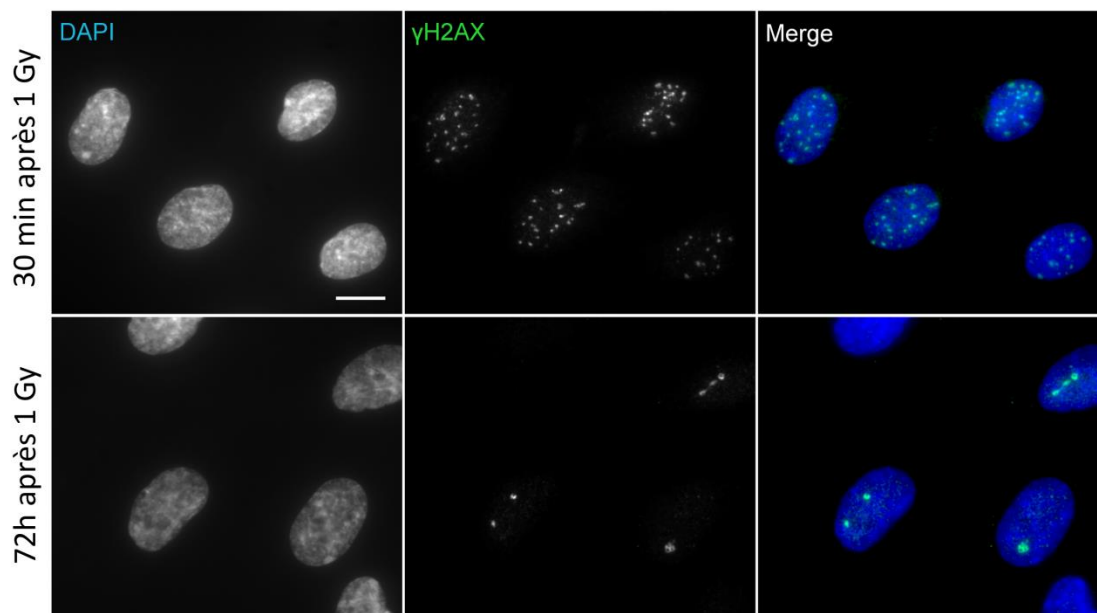


Figure IV.1.3 : Différence de l'aire des foyers γ H2A.X en fonction du temps post-exposition. Images représentatives de foyers γ H2A.X à 30 minutes et 72 heures après exposition à 1 Gy. L'ADN est marqué en DAPI et γ H2A.X avec un marquage immunofluorescent en FITC. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

Les distributions des aires des foyers γ H2A.X à 30 minutes, 5, 24, 48, 72 et 168 heures ont été étudiées plus en détail. La présence de foyers γ H2A.X dans les cellules non irradiées montre un bruit de fond de foyers non radio-induits (*Figures IV.1.1 et IV.1.2*). Pour étudier les aires représentatives des foyers γ H2A.X spécifiquement radio-induits, nous avons effectué une normalisation de ces dernières. Pour cela, les foyers γ H2A.X détectés dans les cellules irradiées et non irradiées à tous les temps post-exposition ont été classés en fonction de leur aire (classes définies avec un pas de 0,1 μ m²). Pour une condition, temps/dose, donnée c , un ratio a ensuite été calculé pour chaque classe i , R_{ci} , en divisant la fréquence de foyers de cette classe dans les cellules irradiées, $F_{ci} IR$, par la fréquence de foyers de cette même classe dans les cellules non irradiées $F_{ci} non IR$:

$$R_{ci} = \frac{F_{ci} IR}{F_{ci} non IR}$$

La *Figure IV.1.4* montre les résultats de ratio obtenus pour chaque condition expérimentale.

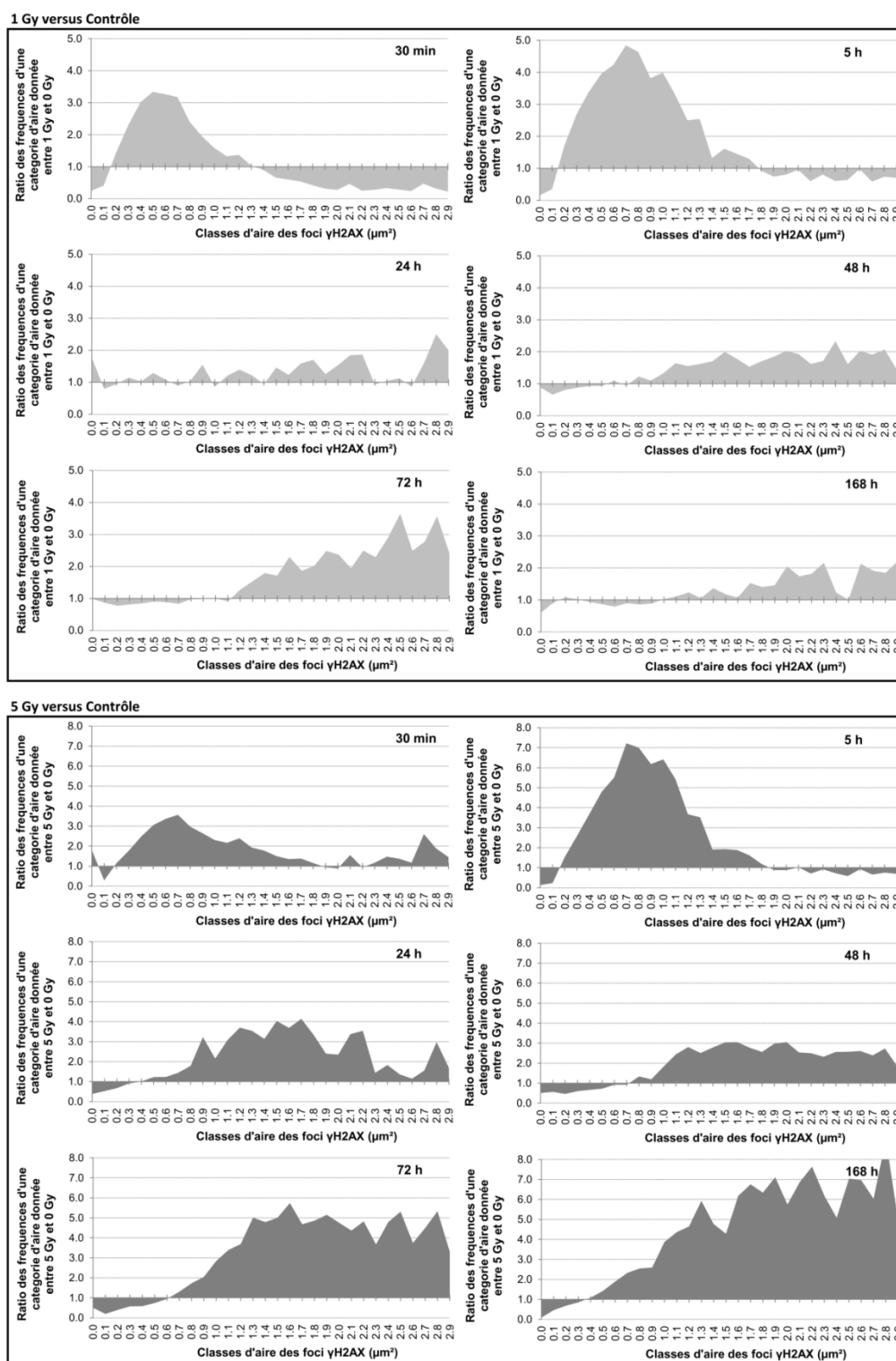


Figure IV.1.4 : Evolution de l'aire des foyers γ H2A.X au cours du temps. Les deux panels représentent les ratios de foyers γ H2A.X radio-induits dans chaque classe d'aire calculée pour 1 Gy (panel du haut) ou pour 5 Gy (panel du bas). Ces valeurs représentent le cumul de cinq expériences et de 100 000 à 1 200 000 foyers γ H2A.X aux temps précoces et de 5 600 à 43 000 foyers γ H2A.X aux temps tardifs.

Les aires des foyers γ H2A.X présents à 30 minutes et 5 heures après l'exposition peuvent être interprétées uniquement à la dose de 1 Gy. En effet, à la dose de 5 Gy la fréquence de foyers γ H2A.X radio-induits par noyau est très élevée à 30 minutes les rendant difficile à distinguer les uns des autres. Par contre après 24 heures, l'analyse des aires des foyers γ H2A.X est plus intéressante après exposition à 5 Gy car leur fréquence reste suffisamment élevée comparée à celle des foyers obtenus après exposition à 1 Gy.

Après une exposition à 1 Gy, les foyers γ H2A.X radio-induits à 30 minutes et 5 heures sont caractérisés par une aire allant de 0,2 à 1,3 μm^2 (*Figure IV.1.4, panel du haut*) et les foyers γ H2A.X après 24 heures par une aire supérieure à 0,6 μm^2 (*Figure IV.1.4, panel du bas*).

Cette analyse a servi également à définir un seuil d'aire de foyers γ H2A.X radio-induits permettant de caractériser l'aire des foyers persistants après 24 heures. Ainsi l'aire seuil a été fixée pour chaque réplique expérimental et correspond en moyenne à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$. Avec cela, un nombre moyen par noyau de foyers γ H2A.X avec une aire supérieure à ce seuil a été obtenu.

Nous observons qu'il y a des foyers γ H2A.X avec une aire supérieure à 0,7 μm^2 au sein des cellules non irradiées, leur fréquence est en moyenne de 0,05 foyers par noyau et reste constante au cours du temps (*Figure IV.1.5, A*). Leur aire varie peu également avec une moyenne de $1,7 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$ (*Figure IV.1.5, B*).

La quantité des foyers radio-induits diminue avec le temps pour les deux doses. Cependant, 7 jours après une exposition à 5 Gy, il y a toujours un nombre significatif de ces foyers par noyau, soit $0,5 \pm 0,1$, ce qui n'est pas le cas à 1 Gy (*Figure IV.1.5, A*). L'aire moyenne de ces foyers radio-induits à 5 heures est de $1,3 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ à 1 Gy et $1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$ à 5 Gy. Il y a une augmentation progressive de l'aire moyenne de ces foyers radio-induits entre 5 heures et 24 heures pour les deux doses (*Figure IV.1.5, B*). Ainsi à partir de 24 heures après l'exposition, les foyers radio-induits ont une aire moyenne similaire à ceux des conditions non irradiées, soit $1,7 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ à 1 Gy, $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ à 5 Gy (*Figure IV.1.5, B*).

A

	Dose	Temps post-exposition					
		5h	24h	48h	72h	96h	168h
Frequence de foci γ H2AX	0Gy	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
avec une taille $> 0,7 \mu\text{m}^2$ par	1Gy	0,83**	0,23*	0,19**	0,16**	0,13**	0,1
noyau	5Gy	2,85***	2,02***	1,34***	1,19***	0,97***	0,53**

B

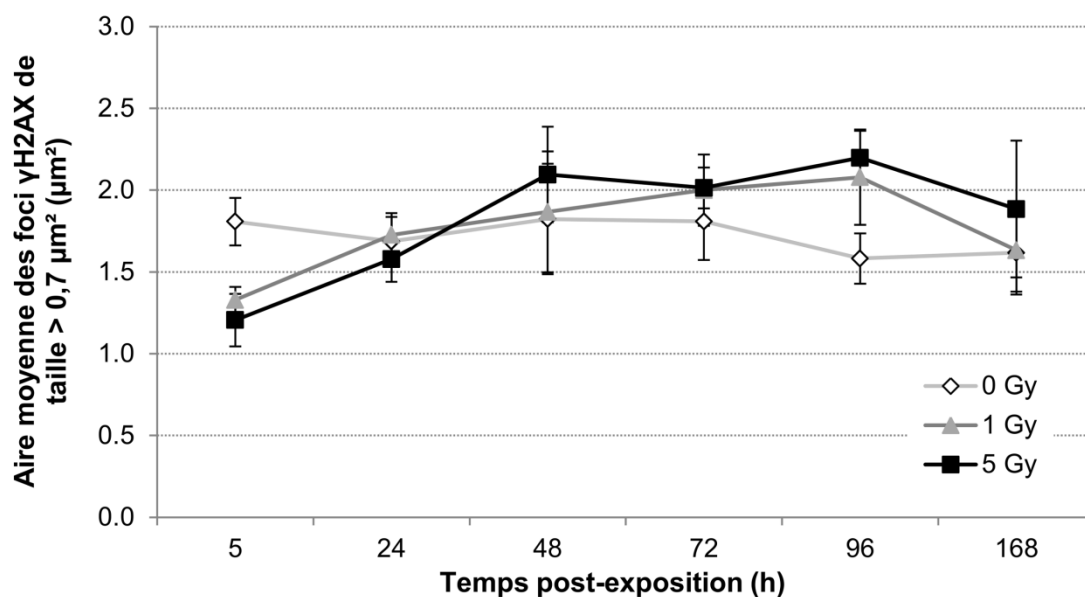


Figure IV.1.5 : Quantification du nombre moyen et de l'aire moyenne des foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$. (A) Tableau indiquant les fréquences moyennes de foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ au sein d'une population de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Les valeurs représentent la moyenne calculée sur cinq expériences soit en moyenne 1 400 à 11 000 cellules analysées par condition et par réplica. Le test de Student a été réalisé et les valeurs significativement différentes de celles obtenues dans les cellules non-irradiées sont indiquées comme suit : * $\alpha < 0,05$, ** $\alpha < 0,01$ et *** $\alpha < 0,001$. **(B)** Courbes représentant les moyennes des aires des foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ pour les doses de 1 et 5 Gy ainsi que pour le contrôle (0 Gy). Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types calculés sur cinq expériences, soit en moyenne 400, 1 200 et 4 200 foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ analysés pour le contrôle, 1 et 5 Gy, respectivement.

1.3. Colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X

Pour étudier l'évolution de la colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2A.X, des immunomarquages avec des anticorps anti- γ H2A.X et anti-53BP1

ont été réalisés. A 24 heures, 53BP1 est colocalisé au niveau des foyers γ H2A.X persistants (Figure IV.1.6).

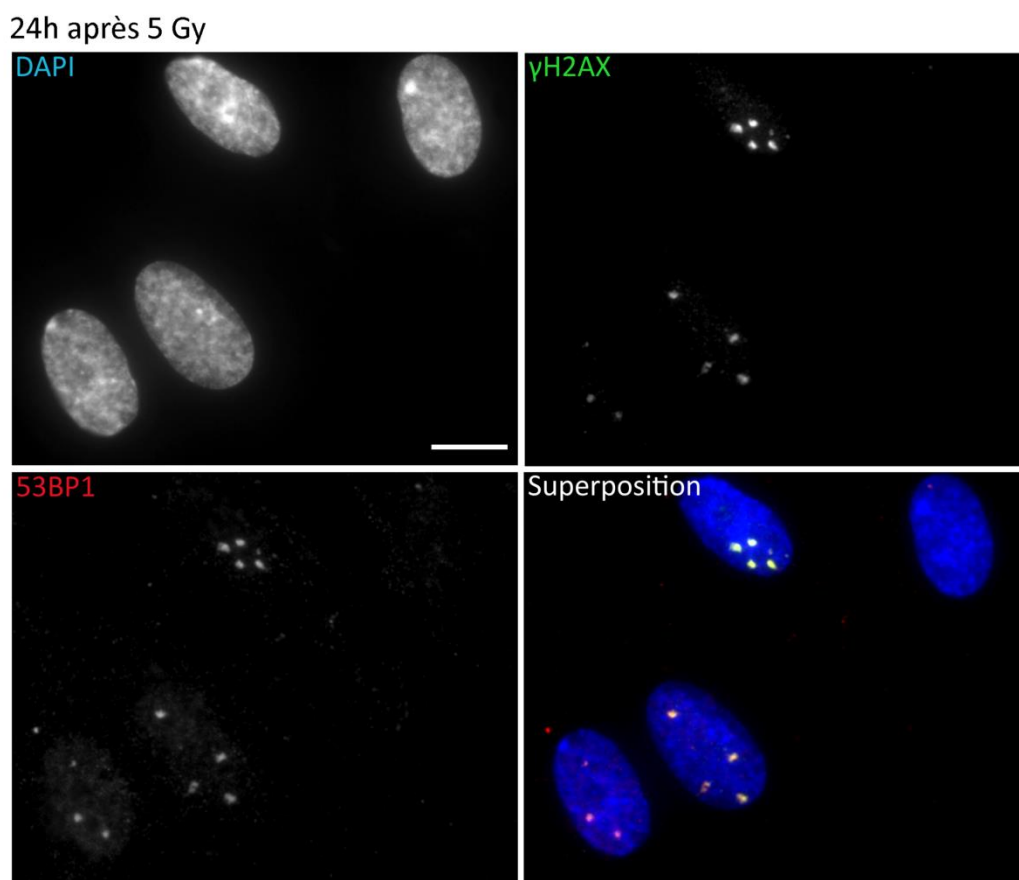


Figure IV.1.6 : Colocalisation de 53BP1 sur les foyers γ H2A.X persistants (aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$). Images en microscopie à fluorescence de noyaux 24 heures après une exposition à 5 Gy de rayons X. La colocalisation de 53BP1 est observée sur l'ensemble des foyers γ H2A.X. L'ADN est marqué en DAPI et γ H2A.X et 53BP1 avec un marquage immunofluorescent en FITC et Alexa Fluor 594, respectivement. La barre d'échelle est de 10 μm .

Une étude quantitative de cette colocalisation a été menée. Les résultats obtenus montrent que la colocalisation de 53BP1 au niveau des foyers γ H2AX est observable dans 90-100% des cas et ceci de 5 heures à 7 jours après l'exposition (Figure IV.1.7).

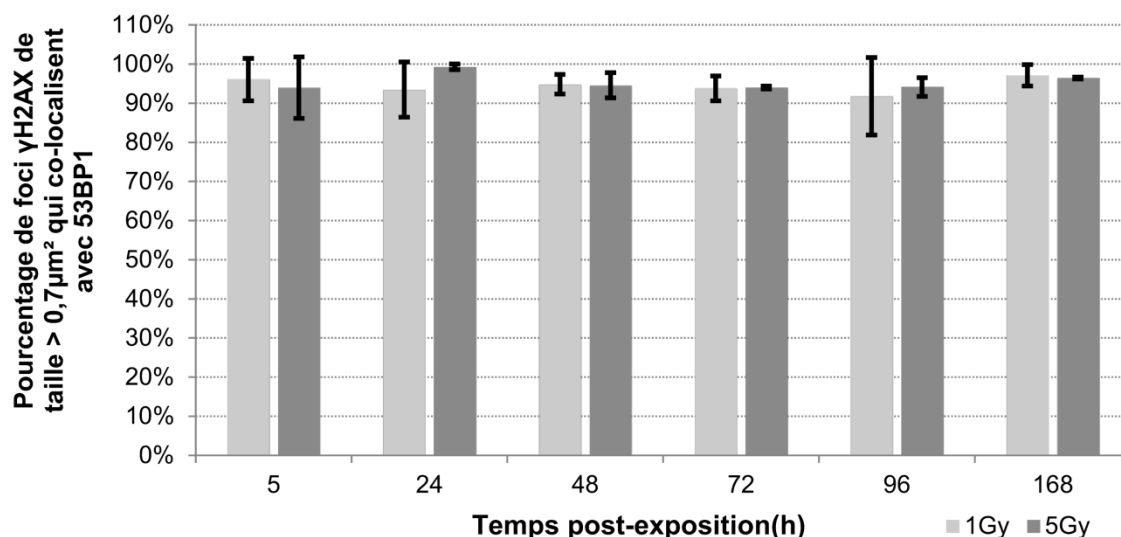


Figure IV.1.7 : Colocalisation de 53BP1 sur les foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$. Histogrammes représentant le pourcentage de foyers γ H2A.X avec une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ colocalisés avec 53BP1 en fonction du temps et de la dose, barres grises claires pour 1 Gy et grises foncées pour 5 Gy. Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types sur trois expériences indépendantes (1 000 à 3 000 foyers γ H2A.X par expériences).

1.4. Quantification de la densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X

Nous nous sommes intéressés à la modulation de la densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X. La modulation de la densité d'ADN a été estimée sur la base de l'intensité moyenne de fluorescence du DAPI. Tout d'abord, nous avons évalué la variation du marquage de DAPI sur l'ensemble des noyaux. La *Figure IV.1.8*, présente les valeurs d'intensité moyenne de fluorescence de DAPI pour tous les noyaux en phase G0/G1 d'une condition donnée (temps/dose). Les variations de l'intensité de fluorescence entre les conditions expérimentales sont le fait d'une variabilité de marquage du DAPI (*Figure IV.1.8*).

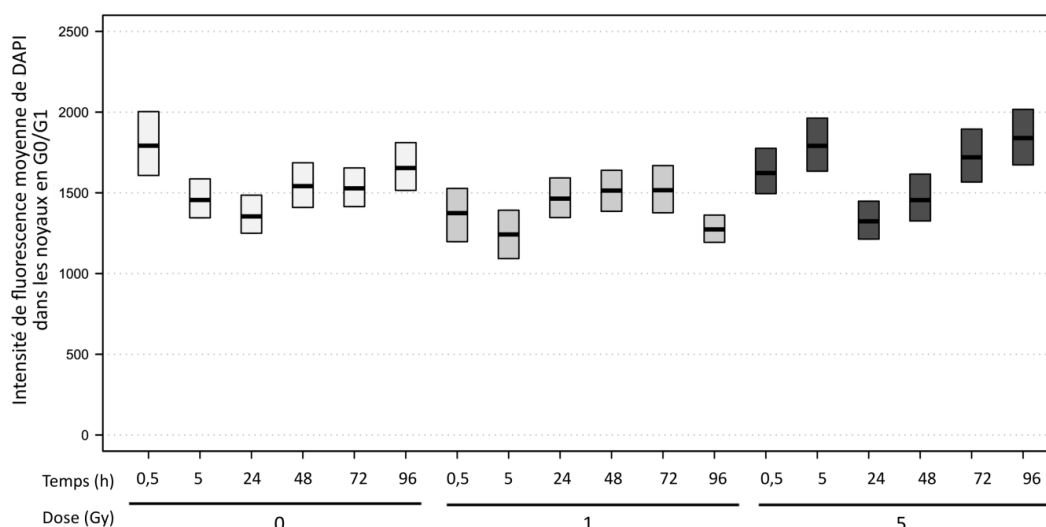


Figure IV.1.8 : Fluctuation de l'intensité moyenne de fluorescence de DAPI. Boîtes représentant les 1^{er} et 3^{ème} quartiles des distributions des valeurs l'intensité de fluorescence moyenne de DAPI pour tous les noyaux en phase G0/G1 : pour les cellules non irradiées (gris clair), pour les cellules irradiées à 1 Gy (gris) et à 5 Gy (gris foncé), à des temps post-exposition allant de 30 minutes à 96 heures. Les valeurs correspondent à une expérience avec une moyenne de 11 000 noyaux par condition.

Ainsi, il a été nécessaire de développer une stratégie de normalisation pour étudier la densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X. Pour cela, nous avons calculé un ratio d'intensité de DAPI en divisant la valeur d'intensité moyenne de fluorescence de DAPI au niveau des foyers par celle du noyau correspondant. De plus, sachant que la répartition et l'organisation de l'ADN n'est pas homogène dans le noyau, nous avons comparé ces valeurs de ratio avec celles obtenues pour les foyers simulés (zones du noyau sans CDB ; voir *Partie III « Matériels et Méthodes »*, *paragraphe 5.2.2 « Création des foyers simulés »*).

La *Figure IV.1.9 A*, présente les médianes des logarithmes de ratio d'intensité de fluorescence de DAPI pour les foyers expérimentaux et les foyers simulés aléatoirement entre 10 minutes et 24 heures après exposition à 1 Gy. Nous observons que les valeurs de ratio de DAPI des foyers γ H2A.X évoluent très peu entre 10 minutes et 24 heures, entre 0,04 et 0,08. Cette tendance reste la même pour les foyers persistants (*Figure IV.1.9, B*), impliquant que même si l'aire des foyers augmente au cours du temps la densité d'ADN au niveau de ces foyers semble constante. Par contre, les médianes des logarithmes de ratio d'intensité de fluorescence de DAPI calculées au niveau des foyers γ H2A.X sont toujours

supérieures à celles obtenues au niveau des foyers simulés aléatoirement (*Figure IV.1.9, A et B*), laissant supposer que la densité d'ADN est en moyenne plus élevée au niveau des foyers γ H2A.X quel que soit le temps post-exposition.

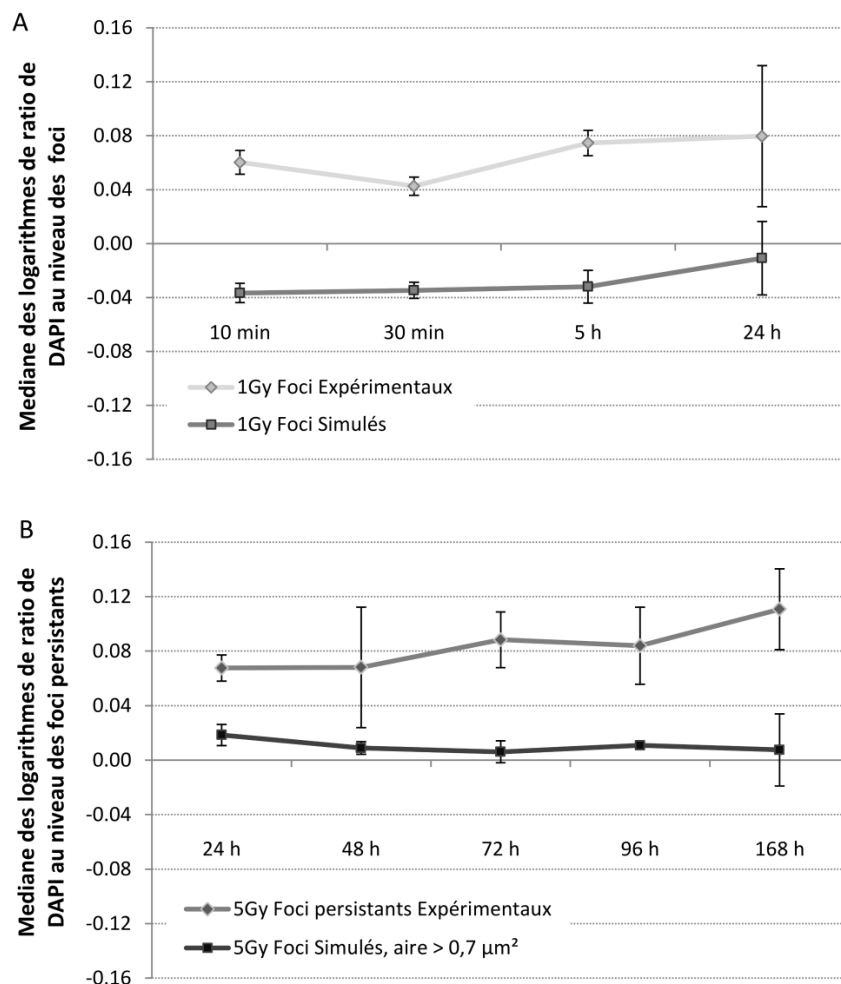


Figure IV.1.9 : Evolution temporelle de la densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X. La densité d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X est mesurée sur la base de l'intensité de fluorescence moyenne de DAPI. Pour chaque foyer, un logarithme de ratio de DAPI est calculé en divisant l'intensité de fluorescence moyenne de DAPI au niveau de celui-ci par celle du noyau. **(A)** Médianes des logarithmes de ratio de DAPI calculés pour tous les foyers γ H2A.X obtenus expérimentalement après une dose de 1 Gy entre 10 minutes et 24 heures (losanges gris clairs) et pour les foyers simulés sur la base d'une irradiation à 1 Gy également (carrés gris moyen clairs). Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types de trois expériences indépendantes (de 8 000 à 200 000 foyers aux temps précoces et environ 2 000 au temps 24 heures, par expérience). **(B)** Médianes des logarithmes de ratio de DAPI calculés pour les foyers persistants obtenus expérimentalement après une dose de 5 Gy entre 24 et 168 heures (losanges gris foncés) et pour les foyers simulés avec une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$ sur la base d'une irradiation à 5 Gy également (carrés noirs). Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types de trois expériences indépendantes avec une moyenne de 4 600 gros foyers par expérience.

1.5. Quantification de l'acétylation sur la lysine 16 de l'histone H4 au niveau des foyers γ H2A.X

Pour analyser l'acétylation de H4K16 spécifiquement au niveau des foyers γ H2A.X, nous avons réalisé, comme pour l'étude des densités d'ADN au niveau des foyers γ H2A.X, une normalisation des valeurs d'intensité moyenne de fluorescence des foyers en les divisant par l'intensité moyenne de fluorescence du noyau auquel il appartient. Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues pour les foyers simulés. Nous constatons, de 10 minutes à 5 heures post-irradiation, une densité d'H4K16ac supérieure au niveau des foyers γ H2A.X par rapport aux foyers simulés (*Figure IV.1.10*).

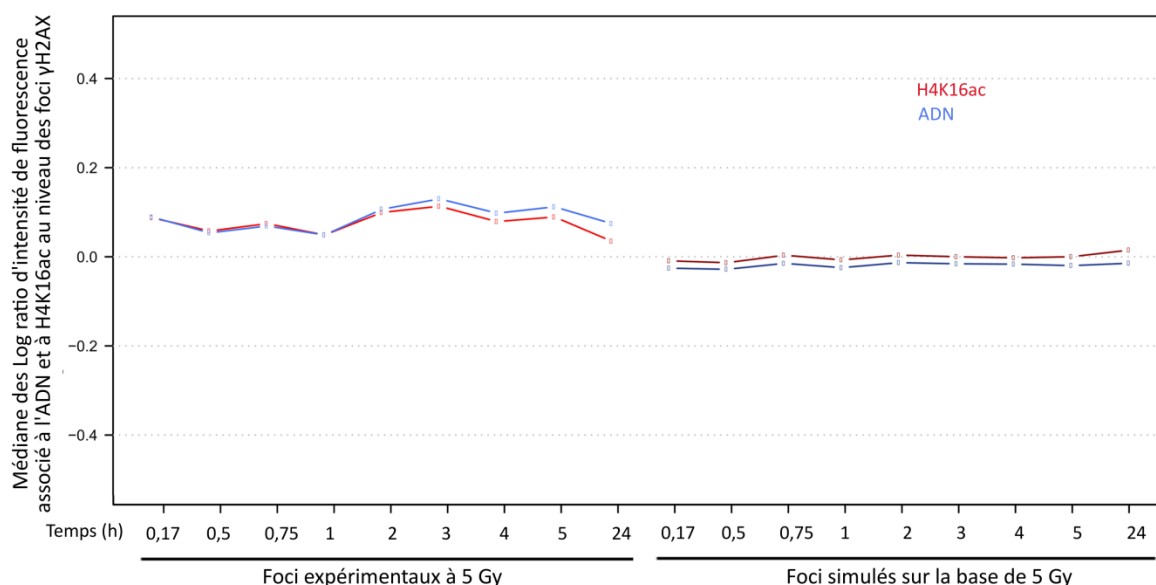


Figure IV.1.10 : Evolution temporelle de l'acétylation de H4K16 au niveau des foyers γ H2A.X induit dans des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Courbes représentant les médianes des logarithmes de ratio d'H4K16ac (rouge) et d'ADN (bleu) calculés pour tous les foyers γ H2A.X (expérimentaux, à gauche) obtenus à des temps post-exposition allant de 0,17 à 24 heures après une irradiation des cellules en phase G0/G1 à 5 Gy. Les courbes de droite correspondent aux valeurs obtenues pour les foyers simulés. Les valeurs correspondent à une expérience avec une moyenne de 500 000 foyers γ H2A.X/simulés observés par condition.

Ceci est cohérent avec l'augmentation de la densité d'ADN observée au niveau des foyers γ H2A.X et donc ne traduit pas une hyper-acétylation. A partir de 24 heures, nous observons que H4K16ac revient au même niveau que celui observé

au niveau des foyers simulés alors que la densité d'ADN reste constante (*Figure IV.1.11*). Cette diminution spécifique de H4K16ac pourrait traduire une désacétylation de cette dernière au niveau des foyers γ H2A.X. Pour confirmer cette tendance il serait nécessaire de faire des répliques expérimentaux.

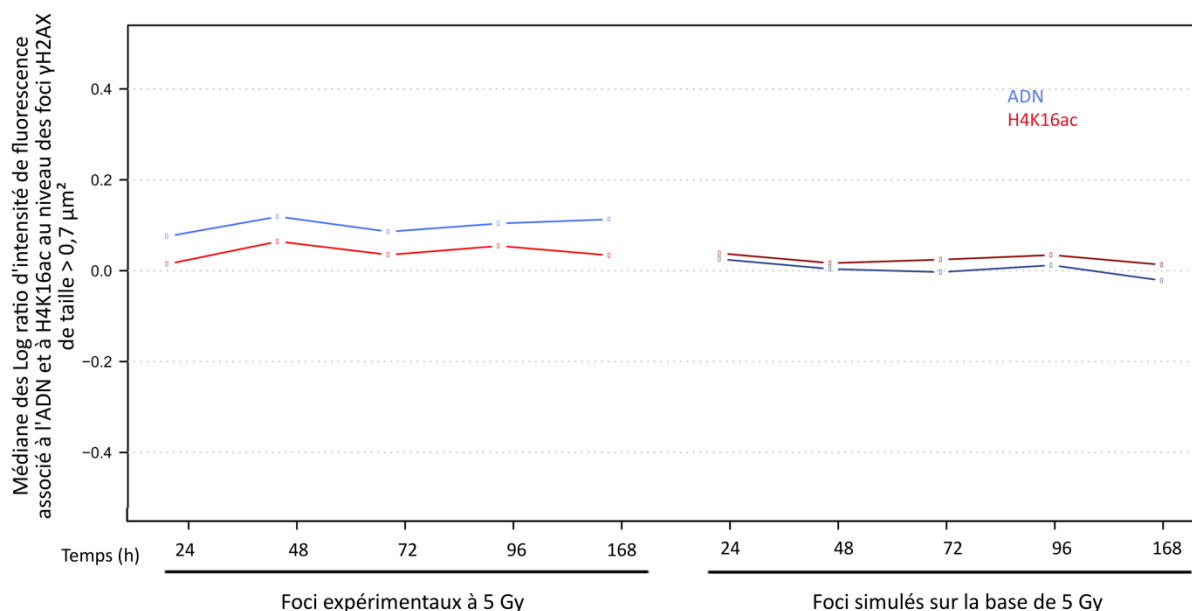


Figure IV.1.11 : Evolution temporelle de l'acétylation de H4K16 au niveau des foyers γ H2A.X persistants induits dans des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Courbes représentant les médianes des logarithmes de ratio d'H4K16ac (rouge) et d'ADN (bleu) calculés pour tous les foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$ (expérimentaux, à gauche) obtenus à des temps post-exposition allant de 24 à 168 heures après une irradiation des cellules en phase G0/G1 à 5 Gy. Les courbes de droite correspondent aux valeurs obtenues pour foyers simulés ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$. Les valeurs correspondent à une expérience avec une moyenne de 9 000 foyers γ H2A.X persistants/simulés observés par condition.

1.6. Evolution du taux de cellules ayant des foyers γ H2A.X persistants au cours du temps

Au sein des populations cellulaires étudiées, 24 heures après l'exposition, nous observons que $12,7\% \pm 3,3\%$ des cellules irradiées à 1 Gy contiennent au moins un foyer persistant, ce qui représente environ un cinquième du pourcentage observés à 5 Gy soit $73,2\% \pm 12,8\%$ (*Figure IV.1.12*). Malgré la diminution de cette proportion au cours du temps à 5 Gy, la proportion de cellules présentant encore des dommages non résolus après 24 heures reste

particulièrement élevée, d'autant plus que seulement $4,3\% \pm 0,01\%$ des cellules non irradiées contiennent des foyers $\gamma\text{H2A.X}$ ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2$ (Figure IV.1.12).

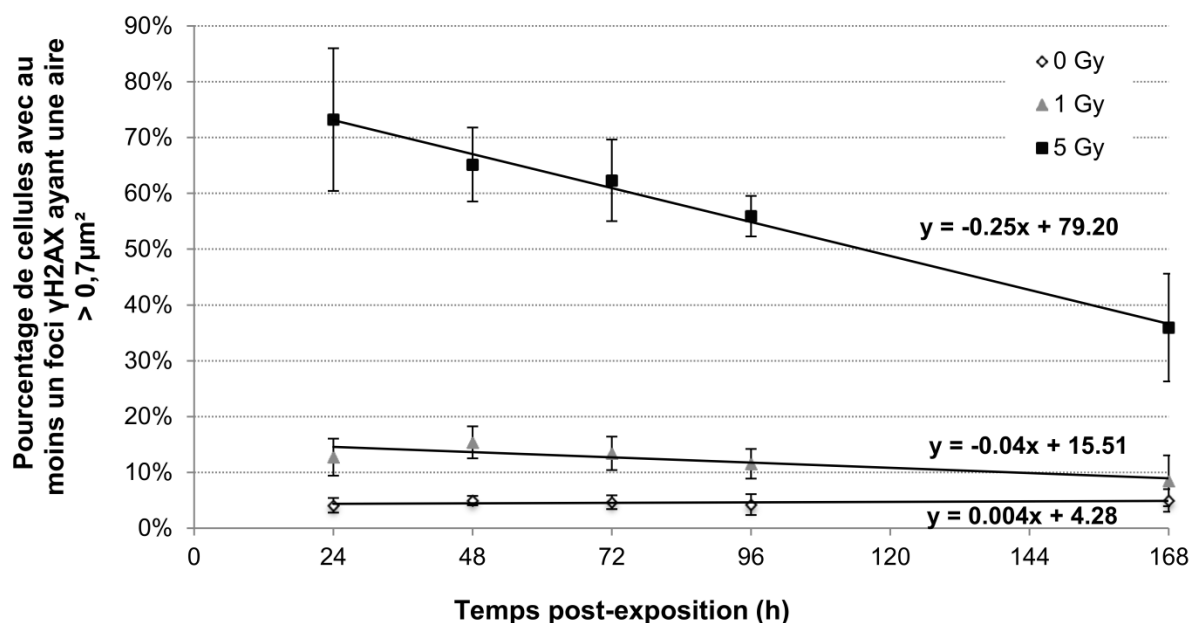


Figure IV.1.12 : Evolution de la proportion de cellules contenant au moins un foyer $\gamma\text{H2A.X}$ persistant au cours du temps. Graphique indiquant les pourcentages des cellules contenant au moins un foyer $\gamma\text{H2A.X}$ persistant pour les doses de 1 et 5 Gy. La condition contrôle (0 Gy) est également tracée et correspond au bruit de fond de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ dans nos conditions expérimentales. Les valeurs sont des moyennes et écarts types calculés sur cinq expériences indépendantes soit en moyenne 1 400 à 11 000 cellules analysées par condition. Des droites de régression linéaires avec les équations correspondantes sont également tracées.

2. Etude de l'impact des foyers persistants sur le cycle cellulaire

2.1. Foyers persistants et cycle cellulaire

2.1.1. Perturbation du cycle cellulaire après irradiation

La perturbation du cycle cellulaire après l'irradiation a été étudiée par ajout de BrdU, juste après l'exposition, dans les cultures cellulaires initialement synchronisées (en phase G0/G1) et des marquages en immunofluorescence avec des anticorps spécifiques ont été réalisés révélant le taux de cellules ayant incorporé du BrdU dans la population cellulaire. Pour identifier les cellules ayant réalisé un cycle, nous avons mesuré l'intensité moyenne de fluorescence associée au BrdU dans le noyau. La *Figure IV.2.13* montre la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de la dose et du temps. Les résultats obtenus sur les cellules non irradiées sont compatibles avec la croissance normale des HUVEC dans nos conditions de culture cellulaire (*Figure IV.2.13*). En 24 heures plus de 80% des cellules sont entrées en cycle et $32,5\% \pm 9,2\%$ ont déjà effectuées un cycle cellulaire complet (BrdU positive en phase G1) (*Figure IV.2.13*, A). Quarante-huit heures plus tard, nous observons $77,2\% \pm 3,4\%$ cellules non irradiées BrdU positives en phase G0/G1 (*Figure IV.2.13*, B).

Pour les conditions irradiées, une accumulation de cellules BrdU négatives en phase G0/G1 est visible et dépendante de la dose, 24 heures après l'exposition, soit $32,2\% \pm 9,5\%$ à 1 Gy et $60,9\% \pm 9,4\%$ à 5 Gy comparé au $14,7\% \pm 3,2\%$ observé dans le contrôle (*Figure IV.2.13*, A). Nous n'observons pas d'augmentation significative de la proportion de cellules en phase S ou en phase G2 ni à 24 heures (*Figure IV.2.13*, A) ni à 48 heures (*Figure IV.2.13*, B) entre les cellules non irradiées et les cellules irradiées à 1 et 5 Gy. Au temps 48 heures, $74,6\% \pm 2,8\%$ des cellules irradiées à 1 Gy sont BrdU positives et en phase G0/G1, elles ont donc fait un cycle complet. Après une dose de 5 Gy, c'est le cas de $49,1\% \pm 10,6\%$ des cellules (*Figure IV.2.13*, B).

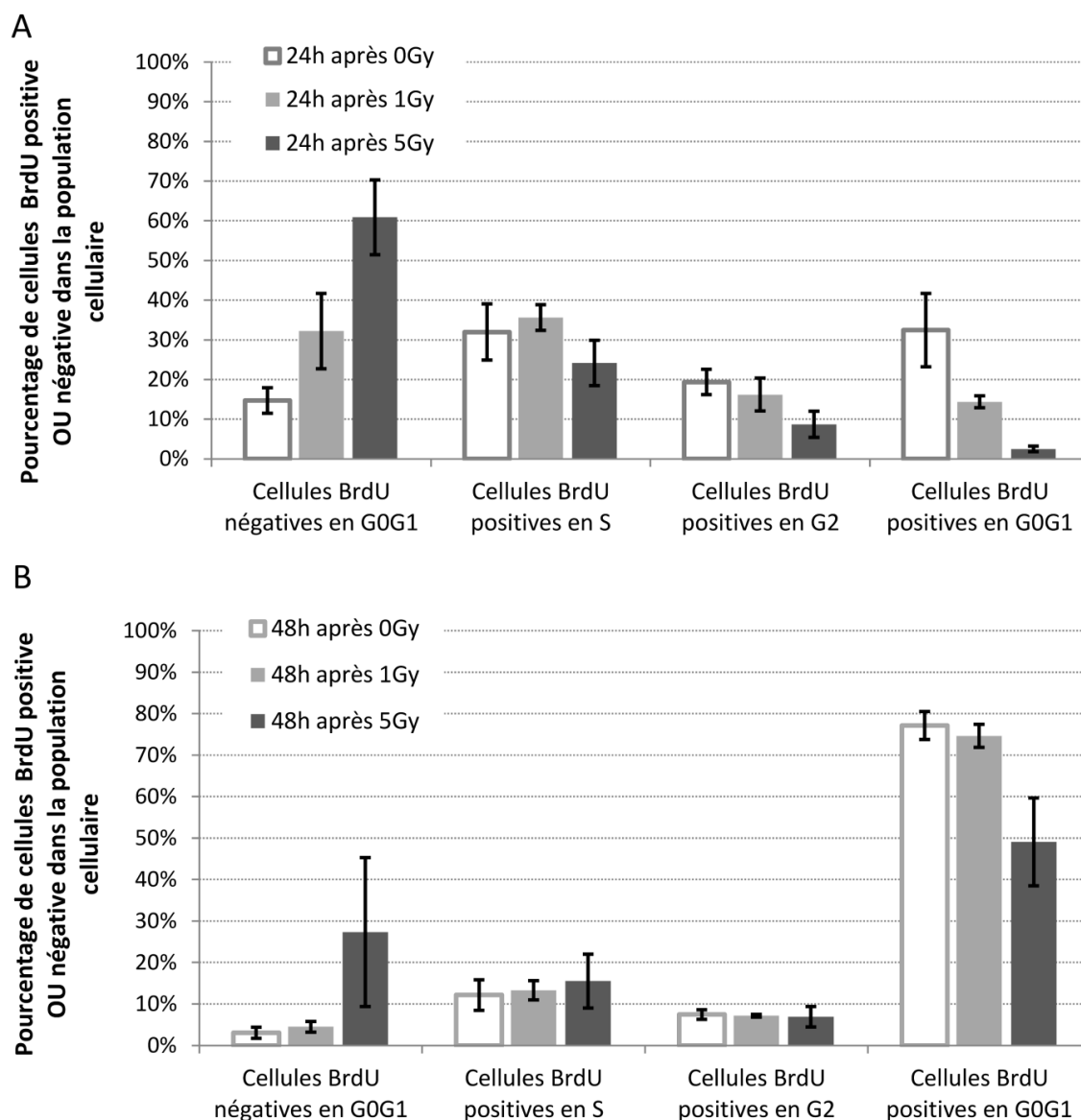


Figure IV.2.13 : Reprise du cycle cellulaire après irradiation. Représentation en histogramme de la proportion de cellules en fonction de la phase du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2), et de leur incorporation (BrdU positives) ou non (BrdU négatives) de BrdU. Ces proportions sont montrées à 24 heures (A) et 48 heures (B) après irradiation des cellules à 1 Gy (gris clair) ou 5 Gy (gris foncé) ou sans irradiation (blanc). Les proportions de cellules sont calculées au sein du tapis cellulaire. Les cellules BrdU positives ont commencé leur cycle après l'irradiation et celles en phase G0/G1 ont donc fait un cycle cellulaire complet après l'irradiation. Les proportions représentent les moyennes de cinq expériences pour 0 et 5 Gy et de trois expériences pour 1 Gy avec en moyenne 2 000 cellules analysées par condition. Les barres d'erreur montrent les écarts types standard calculés à partir des moyennes de ces expériences.

2.1.2. Présence de foyers persistants au sein de cellules ayant cyclée

La présence de foyers persistants au sein des cellules BrdU positives est observée (*Figure IV.2.14*). Sachant que les cellules ont été synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire avant l'irradiation, les cellules qui ont incorporé le BrdU ajouté à la culture juste après l'irradiation et qui sont en phase G0/G1 au moment de l'observation, ont fait un cycle cellulaire complet depuis l'irradiation.

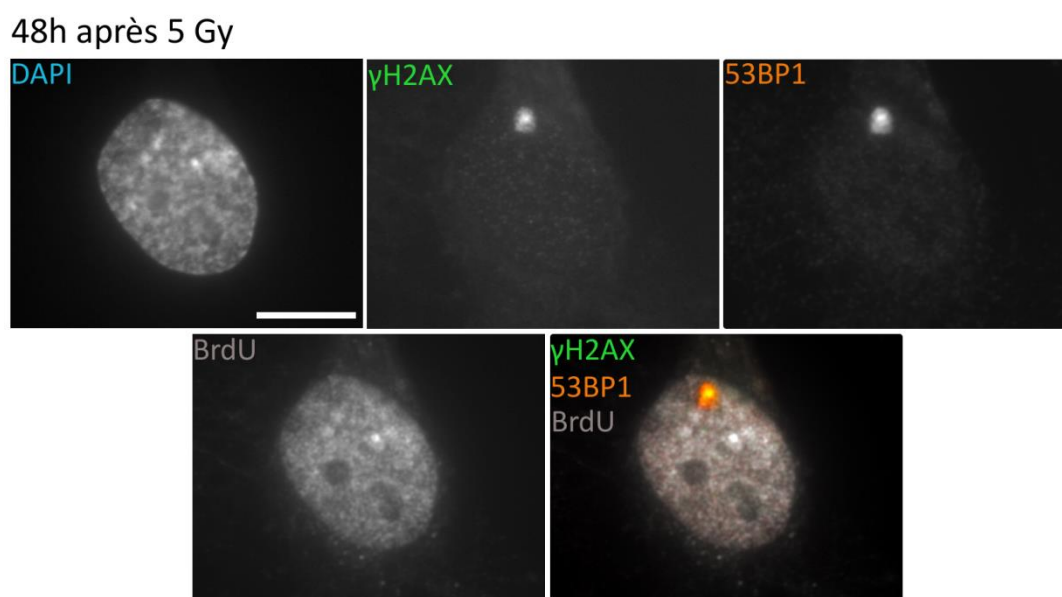


Figure IV.2.14 : Foyers persistants observables dans des cellules ayant fait un cycle cellulaire complet. Images de microscopie à fluorescence montrant un noyau BrdU positif en phase G0/G1 avec un foyer γ H2A.X et 53BP1 persistant 48 heures après 5 Gy de rayons X. Ayant été irradiée en phase G0/G1, cette cellule a fait un cycle cellulaire complet depuis l'irradiation. L'ADN est marqué en DAPI et γ H2A.X, 53BP1 et BrdU avec un marquage immunofluorescent en FITC, Alexa Fluor 647 et 594, respectivement. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

Au sein des cellules non irradiées, nous avons estimé qu'à 5 heures, il y a $95,1\% \pm 0,02\%$ cellules BrdU négatives sans foyers γ H2A.X (blanc) et $4,5\% \pm 0,4\%$ cellules BrdU négatives avec des foyers γ H2A.X (avec une aire $> 0,7 \mu\text{m}^2$) (blanc ponctué de noir ; *Figure IV.2.15*). Ces proportions sont représentatives de l'état des cellules non irradiées. A 24 heures et 48 heures, toujours dans le contrôle non irradié, le taux de cellules BrdU positives augmente pour atteindre 97% au total (gris et gris ponctué de noir ; *Figure IV.2.15*). Il est important de noter qu'au sein

des cellules BrdU positives il y a $12,6\% \pm 1,5\%$ des cellules qui ont des foyers $\gamma\text{H2A.X}$ (avec une aire $> 0,7 \mu\text{m}^2$) (gris ponctué de noir ; *Figure IV.2.15*).

Ensuite, nous avons quantifié la fréquence de ces événements au sein de la population de cellules irradiées. Comme observé précédemment, 24 heures après l'exposition, la plupart des cellules sont bloquées en phase G0/G1, ceci est observable avec le taux de cellules BrdU négatives sans foyer persistant soit $49,3\% \pm 10,1\%$ à 1 Gy et $17,9\% \pm 2,5\%$ à 5 Gy (blanc ; *Figure IV.2.15*) et celui de cellules BrdU négatives avec des foyers persistants, soit $18,9\% \pm 2,2\%$ à 1 Gy et $78,8\% \pm 2,7\%$ à 5 Gy (blanc ponctué de noir ; *Figure IV.2.15*). A 48 heures, une levée du blocage en G0/G1 est observée avec 94% de cellules BrdU positives à 1 Gy et 76% à 5 Gy (gris et gris ponctué de noir ; *Figure IV.2.15*). De plus, les cellules avec au moins un foyer persistant sont majoritairement BrdU positives ($16,7\% \pm 1,3\%$ et $42,3\% \pm 3,6\%$ pour 1 et 5 Gy, respectivement ; gris ponctué de noir, *Figure IV.2.15*). Ces résultats indiquent que la présence de foyers persistants n'empêche pas, de manière permanente, les cellules de progresser dans le cycle cellulaire.

Il est important de noter que le BrdU, lui-même, induit l'augmentation, de manière significative, du taux de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ mesurés dans les cellules non-irradiées, jusqu'à atteindre, à 48 heures, un taux de cellules avec un foyer $\gamma\text{H2A.X}$ (avec une aire $> 0,7 \mu\text{m}^2$) proche de celle mesurée pour 1 Gy ($12,6\% \pm 1,5\%$ pour le contrôle et $16,7\% \pm 1,3\%$ pour 1 Gy ; en gris ponctué de noir, colonne 48 heures ; *Figure IV.2.15*). Cependant, les proportions de cellules BrdU positives avec des foyers persistants restent dépendantes de la dose (supérieures à 5 Gy qu'à 1 Gy) ce qui montre que se sont bien des foyers radio-induits qui sont majoritairement observés à 5 Gy. Afin d'éviter les interférences potentielles de l'effet du BrdU sur les analyses suivantes, seuls les résultats obtenus avec la dose de 5 Gy seront présentés.

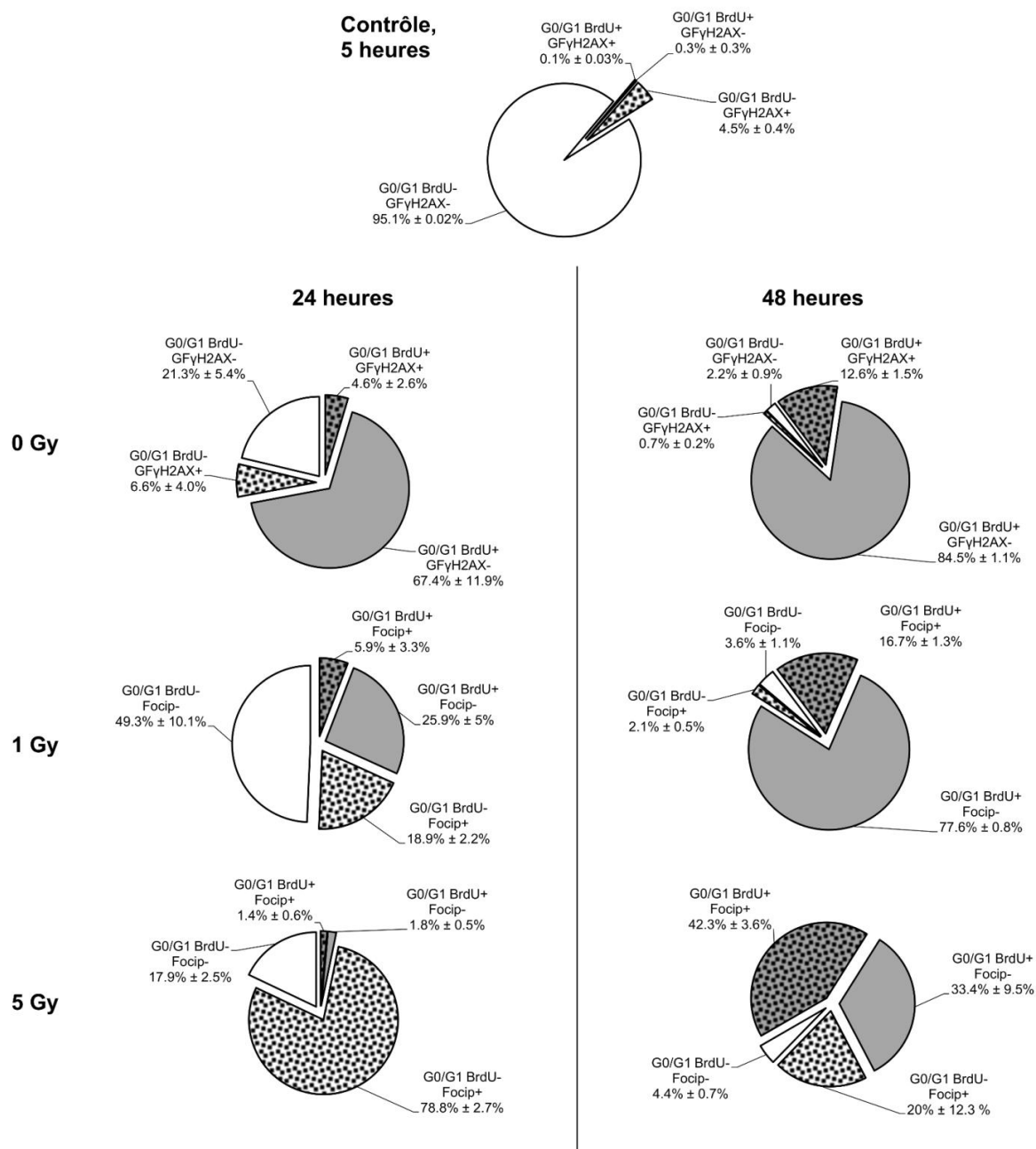


Figure IV.2.15 : La présence de foyers persistant ne bloque pas définitivement la division cellulaire. Représentation en camembert des proportions de cellules au sein de la sous-population de cellules en phase G0/G1 du cycle, en fonction de leur incorporation de BrdU : BrdU positives (gris foncé) et BrdU négatives (blanc) ; et en fonction de la présence de foyers γ H2AX (pointillé) ou non (sans pointillé). Puisqu'elles sont en phase G0/G1, les cellules BrdU positives ont donc fait un cycle cellulaire complet après l'irradiation. Les proportions représentent les moyennes et les écarts types standard obtenus sur trois expériences indépendantes soit en moyenne 3 000 cellules par conditions. GFyH2AX : foyers γ H2AX avec une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$; Focip : foyers persistants au-delà de 24 heures après l'exposition.

2.2. Transmission des foyers persistants aux cellules filles

2.2.1. Evolution des distributions des foyers persistants avant et après division cellulaire

Pour étudier la transmission ces foyers des cellules mères irradiées aux cellules filles, la fréquence de foyers persistants a été analysée en fonction de l'incorporation de BrdU dans les noyaux. Tout d'abord, sur l'ensemble de la population de cellules en phase G0/G1, la fréquence des foyers persistants diminue de manière significative entre 24 et 48 heures après l'irradiation, soit $2,2 \pm 0,4$ foyers persistants par cellule à 24 heures et $1,2 \pm 0,4$ foyers persistants par cellule à 48 heures (*Figure IV.2.16, A*).

Lorsque les cellules sont distinguées en fonction de leur incorporation de BrdU, nous observons que la fréquence de foyers persistants est significativement plus faible dans les cellules BrdU positives par rapport aux cellules BrdU négatives, soit, respectivement, $0,9 \pm 0,2$ foyers persistants et $2,2 \pm 0,4$ foyers persistants (*Figure IV.2.16, A*). Par contre, la fréquence de foyers persistants dans les cellules BrdU négatives et celle dans les cellules BrdU positives reste stable au cours du temps (*Figure IV.2.16, A*). Cette diminution est apparemment concomitante à la reprise du cycle cellulaire. Leur aire, quant à elle augmente significativement en fonction du temps, dans les cellules en phase G0/G1 qui ont cyclé, soit $1,7 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$ à 24 heures et $2,7 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$ à 48 heures ; et également dans celles qui n'ont pas cyclé, soit $1,5 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$ à 24 heures et $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$ à 48 heures (*Figure IV.2.16, B*).

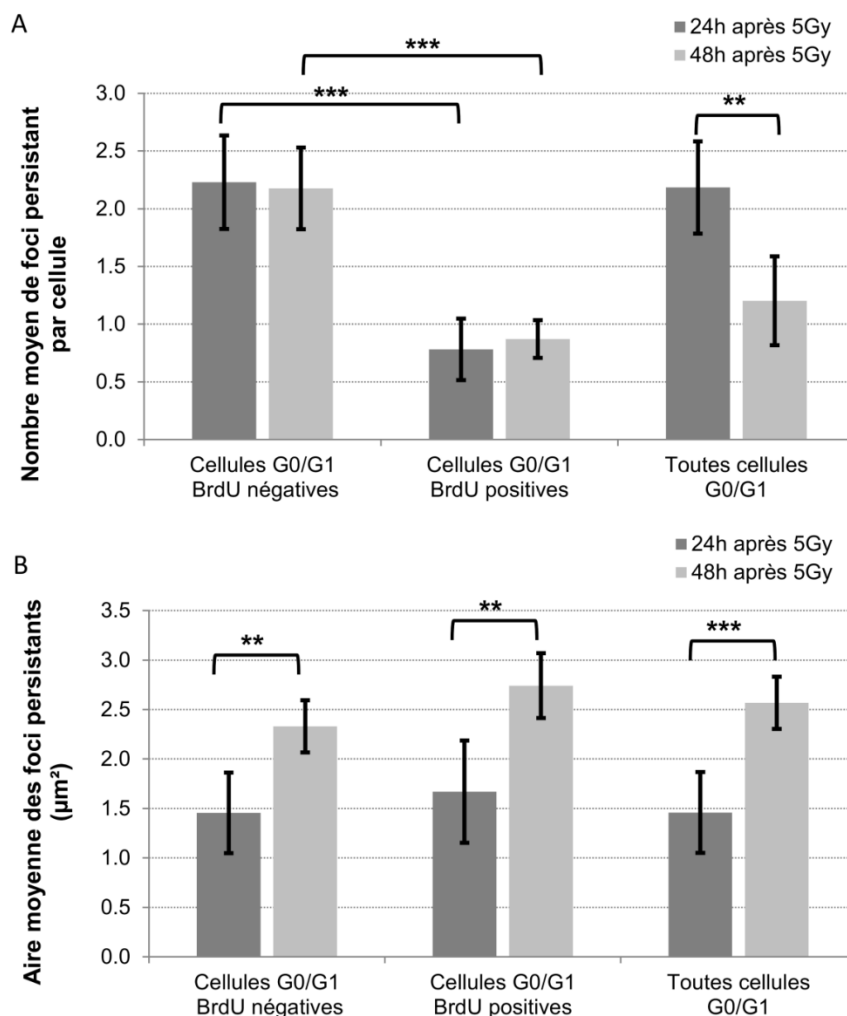


Figure IV.2.16 : Diminution de la fréquence de foyers persistants par noyau est concomitante à la reprise du cycle cellulaire. (A) La fréquence de foyers persistants par noyau 24 heures (gris foncé) et 48 heures (gris clair) après une irradiation à 5 Gy est calculée pour l'ensemble des cellules en phase G0/G1 et distinctement pour les cellules en phase G0/G1 ayant incorporé ou non du BrdU. **(B)** L'aire moyenne des foyers persistants est mesurée 24 heures (gris foncé) et 48 heures (gris clair) après une irradiation à 5 Gy, pour l'ensemble des cellules en phase G0/G1 et distinctement pour les cellules en phase G0/G1 ayant incorporé ou non du BrdU. Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types calculés sur trois expériences soit en moyenne 3 000 cellules et 4 000 foyers persistants par conditions. En utilisant le test de Student, les valeurs significativement différentes sont indiquées comme suit : * $\alpha < 0,05$, ** $\alpha < 0,01$ et *** $\alpha < 0,001$.

Pour examiner plus en détail la décroissance du taux de foyers persistants dans les cellules avant et après la division cellulaire, nous avons étudié la distribution des cellules en fonction du nombre de foyers persistants qu'elles contiennent (*Figures IV.2.17*). La forme des distributions obtenues pour les cellules BrdU négatives reste la même entre 24 et 48 heures après l'irradiation (barres

grises, *Figures IV.2.17, A et B*), impliquant qu'il y a une diminution proportionnelle de toutes les classes. Cette observation est cohérente avec la stabilité du nombre moyen de foyers persistants mesurée dans la population de cellules BrdU négatives (*Figure IV.2.17*). Par contre, la distribution observée à 48 heures pour les cellules BrdU positives est clairement décalée par rapport à celles des BrdU négatives. En effet, il y a une nette augmentation des classes de cellules présentant un faible nombre de foyers persistants (barres grises et noires, *Figures IV.2.17, A et B*). Cette observation est cohérente avec la différence de fréquences observées entre les cellules BrdU négatives et positives (*Figure IV.2.16, A*). Les cellules filles ont clairement moins de foyers persistants que les cellules mères.

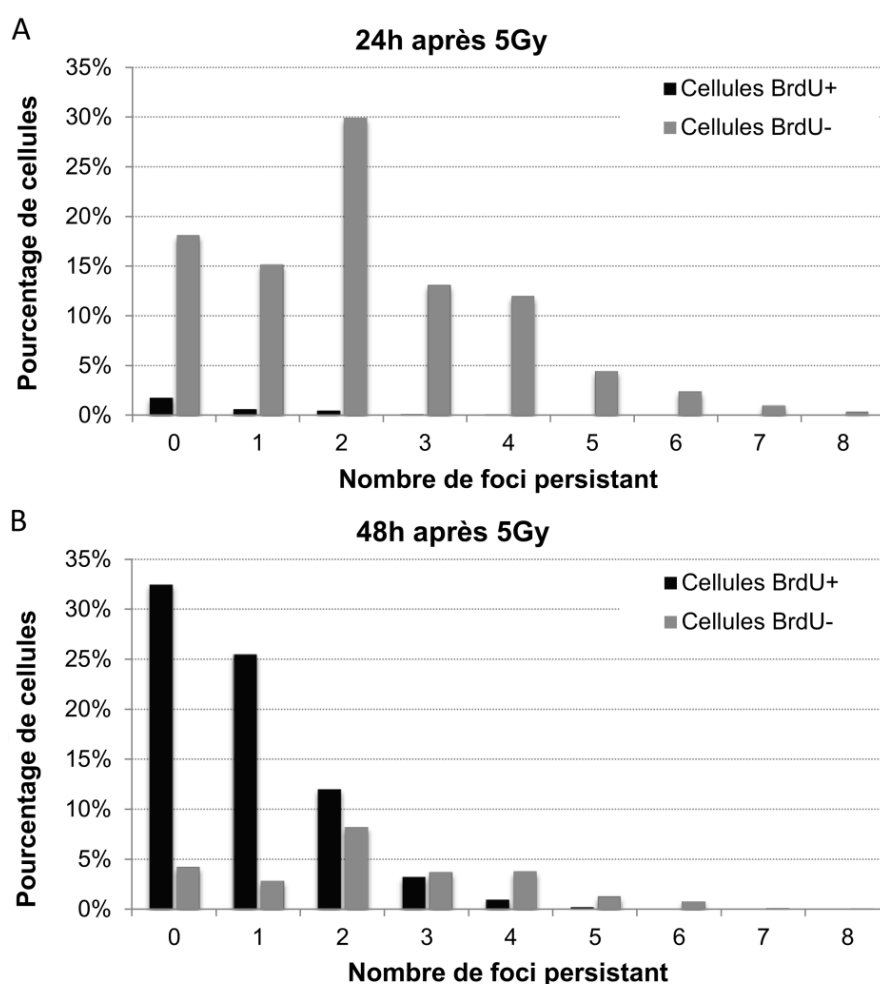


Figure IV.2.17 : Décalages des distributions de foyers persistants par cellules avant et après la division cellulaire. Histogrammes représentant les pourcentages de cellules classées en fonction de leur nombre de foyers persistants, 24 (A) et 48 heures (B) après 5 Gy. Ces valeurs représentent le cumule de trois expériences indépendantes, soit 3 000 à 14 000 cellules analysées par condition.

2.2.2. Foyers persistants dans les cellules filles

Pour étudier la répartition des foyers persistants entre les noyaux fils, nous avons effectué un blocage de la cytodivision par ajout de cytochalasine B 48 heures après l'exposition à 5 Gy. Cette technique permet de bloquer les deux noyaux fils dans le même cytoplasme. C'est le différentiel du taux de foyers persistants entre les deux noyaux qui nous intéresse ici. La *Figure IV.2.18* présente trois exemples de phénotypes observés.

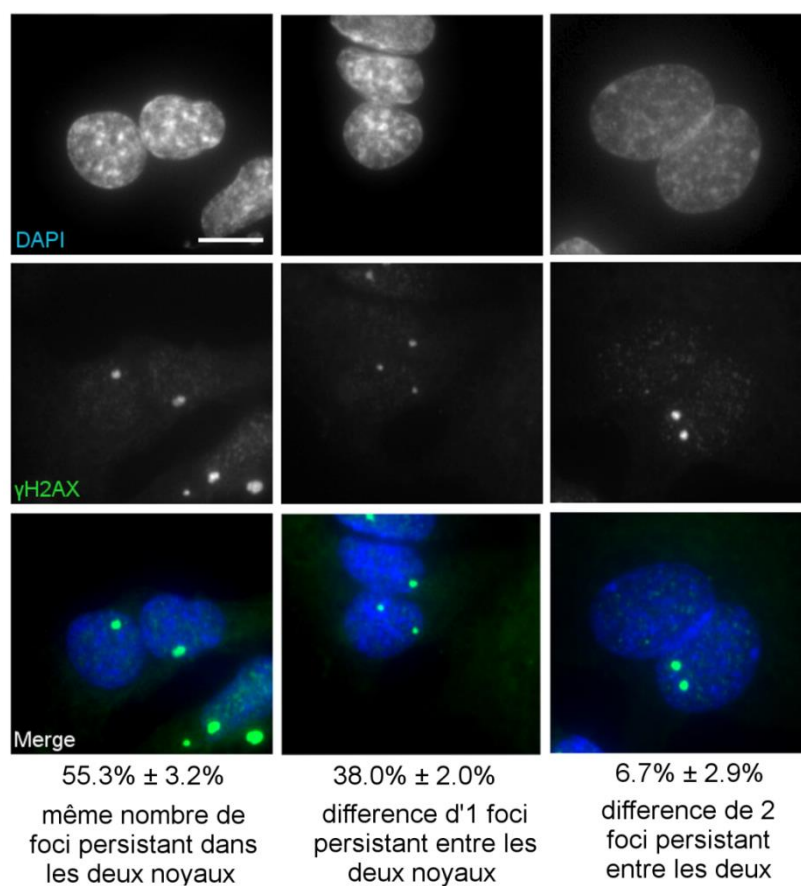


Figure IV.2.18 : Transmission asymétrique possible entre deux cellules filles. Images de microscopie à fluorescence prise 48 heures après 5 Gy, présentant : dans le panel de gauche une cellule binucléée avec le même nombre de foyer persistant dans les deux noyaux, dans le panel du milieu une cellule binucléée avec un foyer persistant de différence entre les deux noyaux, et dans le panel de droite une cellule binucléée avec deux foyers persistants de différence entre les deux noyaux. Les proportions de chacun des trois exemples dans la population de cellule en phase G0/G1 correspondent aux moyennes et écarts types mesurés sur trois expériences et environ 100 cellules binucléées comptées manuellement pour chaque expérience. L'ADN est marqué en DAPI et γ H2A.X avec un marquage immunofluorescent en FITC. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

Nous avons observé des cellules binucléées ayant le même nombre de foyers persistants mais également des cellules binucléées ayant un nombre de foyers persistants différent entre les deux noyaux. Après quantification, il s'avère que 45% des cellules binucléées présentent un nombre de foyers persistants asymétrique entre les deux noyaux fils (*Figure IV.2.18*).

2.2.3. Foyers persistants et anomalies de ségrégation mitotique

Nous avons analysé ensuite la proportion d'anomalies de ségrégation mitotique dans les cellules BrdU positives en phase G0/G1. Le comptage a été réalisé manuellement en considérant comme cellules aberrantes : i) celles qui contenaient des micronoyaux (mauvaise ségrégation des chromosomes) et/ou, ii) celles qui étaient binucléées contenant ou non des ponts nucléoplasmiques (blocage de la cytodierèse). Dans les deux cas, la présence d'un signal γ H2A.X a été prise en compte qu'il soit situé dans le noyau (foyer persistant), dans un micronoyau et/ou dans un pont nucléoplasmique. Cette analyse a été faite dans les cellules 48 heures après l'exposition à 1 et 5 Gy ainsi que dans les cellules non irradiées de manière générale.

Une nette augmentation de la proportion de cellules aberrantes en fonction de la dose est observée que les cellules présentent un signal γ H2A.X, soit $50\% \pm 6\%$ après 1 Gy et $91\% \pm 3\%$ après 5 Gy ou qu'elles en soient dépourvues, soit $16\% \pm 1\%$ après 1 Gy et $44\% \pm 7\%$ après 5 Gy (*Figure IV.2.19, A*). Il apparaît, cependant, clairement que la fréquence des cellules aberrantes est plus importante lorsqu'il y a un signal γ H2A.X persistant à 48 heures au sein des cellules. Plusieurs phénotypes observés sont mis en évidence et illustrés dans la *Figure IV.2.19, B*.

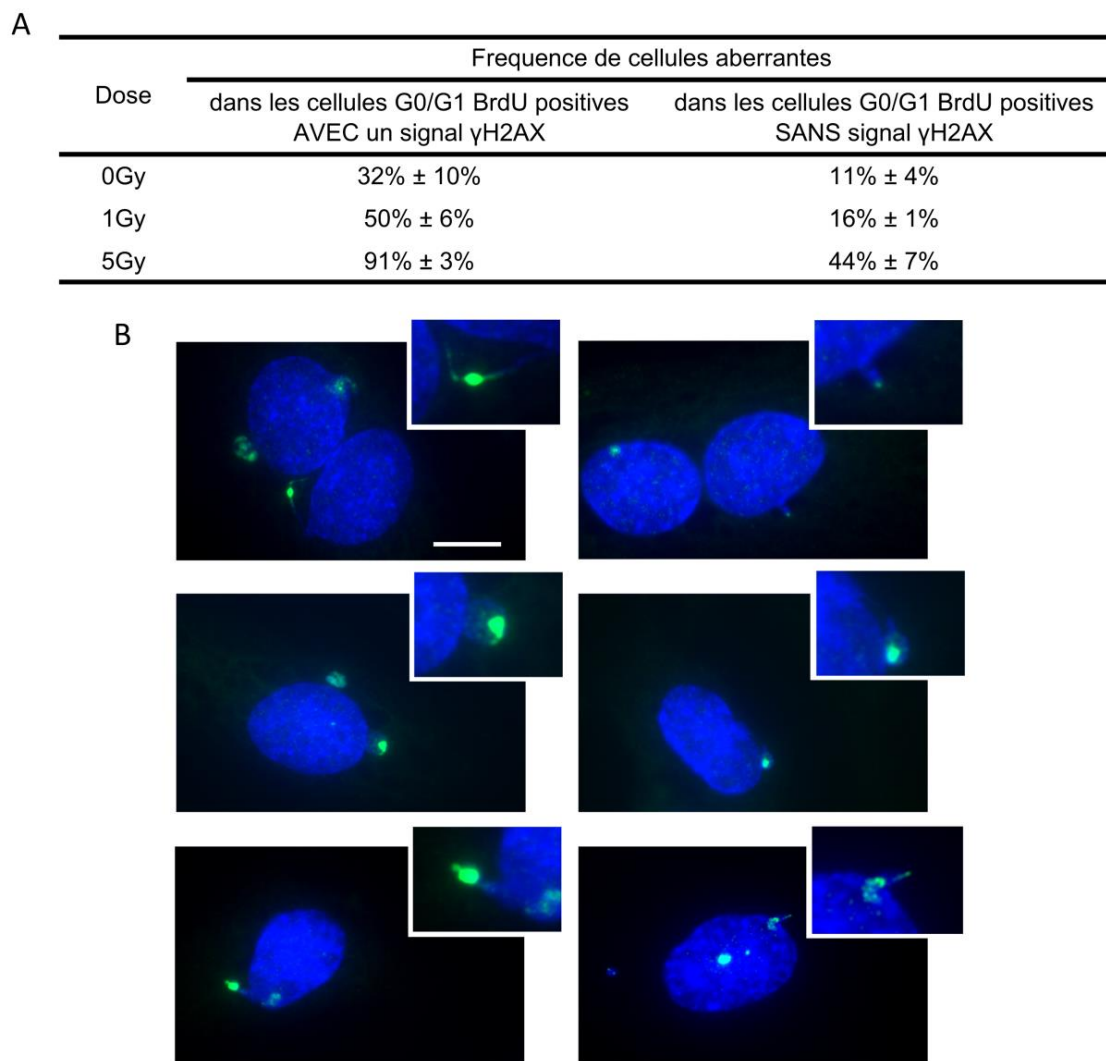


Figure IV.2.19 : La présence d'un signal γ H2A.X augmente la probabilité d'évènement de mauvaise ségrégation. (A) Fréquences de cellules aberrantes comptées dans les cellules BrdU positives en G0/G1 avec ou sans signal γ H2A.X. Le terme « cellules aberrantes » regroupe les cellules mononucléées avec un micronoyau et toutes les cellules binucléées. Les valeurs correspondent à des moyennes et écarts types calculés sur trois expériences indépendantes et environ 250 cellules par expérience. **(B)** Images de microscopie à fluorescence représentatives des phénotypes de cellules aberrantes contenant un signal γ H2A.X, 48 heures après 5 Gy. Le panel du haut montre, de gauche à droite, des cellules binucléées avec un micronoyau et un pont nucléoplasmique entier ou cassé. Le panel du milieu présente des cellules mononucléées avec des micronoyaux et celui du bas des cellules mononucléées avec un débris de pont nucléoplasmique. L'ADN est marqué en DAPI et γ H2A.X avec un marquage immunofluorescent en FITC. La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

3. Etude de l'association des corps nucléaires PML et des foyers γ H2A.X

Pour caractériser l'association des corps nucléaire PML (CN-PML) et des foyers γ H2A.X dans les HUVEC, nous avons analysé, à partir de marquages en immunofluorescence, la dynamique de réponse des CN-PML suite à une irradiation à des doses de 1 et 5 Gy, puis leur association avec les foyers γ H2A.X dans 5 000 cellules en moyenne pour chaque condition étudiée.

3.1. Dynamique des corps nucléaires PML en réponse à l'irradiation

A des temps post-exposition allant de 10 minutes à 7 jours après une irradiation à 1 et 5 Gy, des marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps spécifiques anti-PML. Dans chacune des conditions expérimentales leur fréquence a été estimée dans les cellules en phase G0/G1 du cycle. Dans la condition contrôle, il y a 15 CN-PML en moyenne par cellule. Après 1 Gy d'irradiation, cette fréquence ne varie pas par rapport au contrôle. C'est à la dose de 5 Gy qu'est observée une augmentation à 20 CN-PML par cellule à partir de 24 heures. La différence entre les cellules irradiées et non irradiées disparaît 7 jours après l'exposition (*Figure IV.3.20, A*). Il est à noter que les valeurs obtenues à 7 jours montrent une plus grande variabilité entre les expériences.

L'analyse de l'aire moyenne de ces CN-PML ne met en évidence aucune variation significative de l'aire des CN-PML après irradiation. Sept jours après une irradiation à la dose de 5 Gy, il semble y avoir une légère augmentation de l'aire des CN-PML, cependant, elle n'est pas significative (*Figure IV. 3.20, B*).

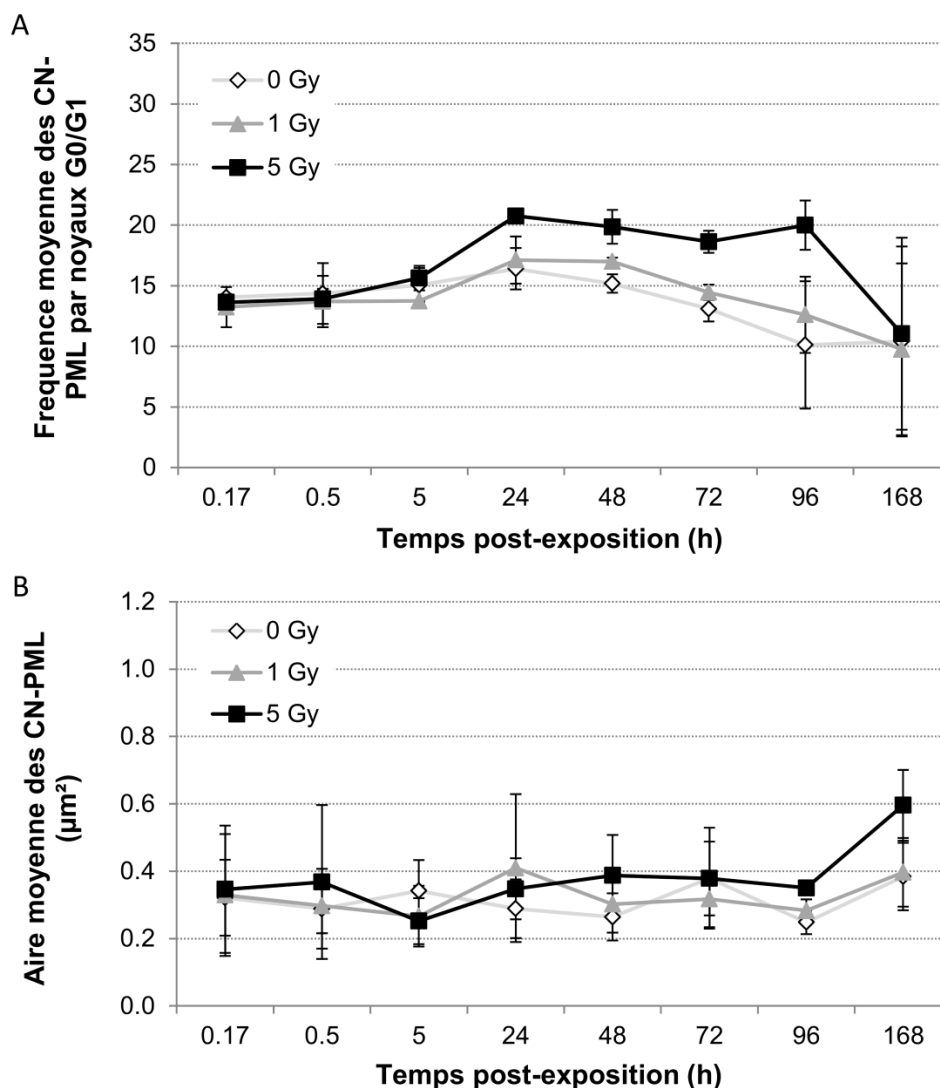


Figure IV.3.20 : Dynamique des CN-PML en réponse à l'irradiation. (A) Courbes représentant les fréquences moyennes de CN-PML par noyau en phase G0/G1. Les temps analysés vont de 10 minutes à 7 jours après une dose de 1 Gy (triangles gris) et 5 Gy (carrés noirs). Un contrôle (losanges blancs) est également montré. **(B)** Courbes représentant les aires moyennes des CN-PML pour les mêmes conditions. Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types obtenus sur deux expériences indépendantes et 2 000 à 15 000 noyaux par condition.

3.2. Dynamique d'association des corps nucléaires PML et des foyers persistants

La mesure d'association a été faite sur tous les foyers persistants indépendamment les uns des autres. Pour cela, les distances entre un foyer persistant et tous les CN-PML du noyau ont été calculées. La distance minimale a été conservée. Ensuite, nous avons qualifié d'associés les foyers persistant étant à

une distance inférieure à $1\ \mu\text{m}$ d'un CN-PML. Sur cette base, l'association avec un CN-PML est observée pour environ 80-90% des foyers persistants de 24 heures à 7 jours après l'exposition, quelle que soit la dose de rayonnements (*Figure IV.3.21*). Le taux d'association entre les foyers $\gamma\text{H2A.X}$ non radio-induits observables dans la condition non irradiée et les CN-PML est d'environ 80%.

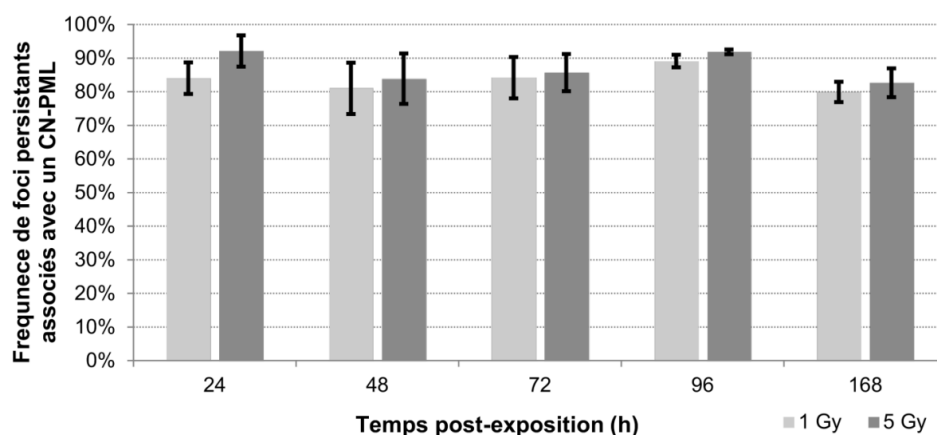


Figure IV.3.21 : Association des foyers persistants avec un CN-PML. Histogrammes représentant la proportion de foyers persistants à moins de $1\ \mu\text{m}$ d'un CN-PML, pour les doses de 1 Gy (gris clair) et de 5 Gy (gris foncé). Les valeurs représentent les moyennes et les écarts types obtenus sur trois expériences indépendantes, 1 000 foyers persistants analysés en moyenne pour 1 Gy et 3 200 pour 5 Gy, aux temps 24 à 96 heures ; et 600 foyers persistants en moyenne, pour les deux doses à 168 heures.

Pour déterminer si cette association entre les foyers persistants et les CN-PML est un processus dynamique dans le temps ou une colocalisation due au hasard de la formation des CDB (proche d'un CN-PML), nous avons comparé les taux d'association observés entre les CN-PML et les foyers $\gamma\text{H2A.X}$ expérimentaux avec les taux d'association calculés entre les CN-PML et des foyers simulés aléatoirement dans les noyaux. Il est à noter que cette comparaison a été faite aux temps post-exposition allant de 10 minutes à 24 heures, uniquement pour les foyers $\gamma\text{H2A.X}$ induits à la dose de 1 Gy. En effet, 10 et 30 minutes après une exposition à 5 Gy, la densité de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ induits étant très élevée et il n'est pas possible de les individualiser précisément.

Quel que soit le temps post-exposition à 1 Gy, nous observons une probabilité constante d'association des CN-PML avec les foyers simulés d'environ 30% de 10 minutes à 5 heures (*Figure IV.3.22*). Ce qui signifie que seulement 30% des foyers simulés sont à moins de $1\ \mu\text{m}$ d'un CN-PML. Par contre, l'association avec

les foyers γ H2A.X est de 35% à 10 minutes, de 41% à 30 minutes, et atteint 71% après 5 heures (*Figure IV.3.22 A*). Lorsque nous analysons cette association uniquement pour les foyers γ H2A.X ayant une aire supérieure à $0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$, les taux d'association sont légèrement plus élevés, soit 41% à 10 minutes, 51% à 30 minutes, et 85% après 5 heures (*Figure IV.3.22 B*).

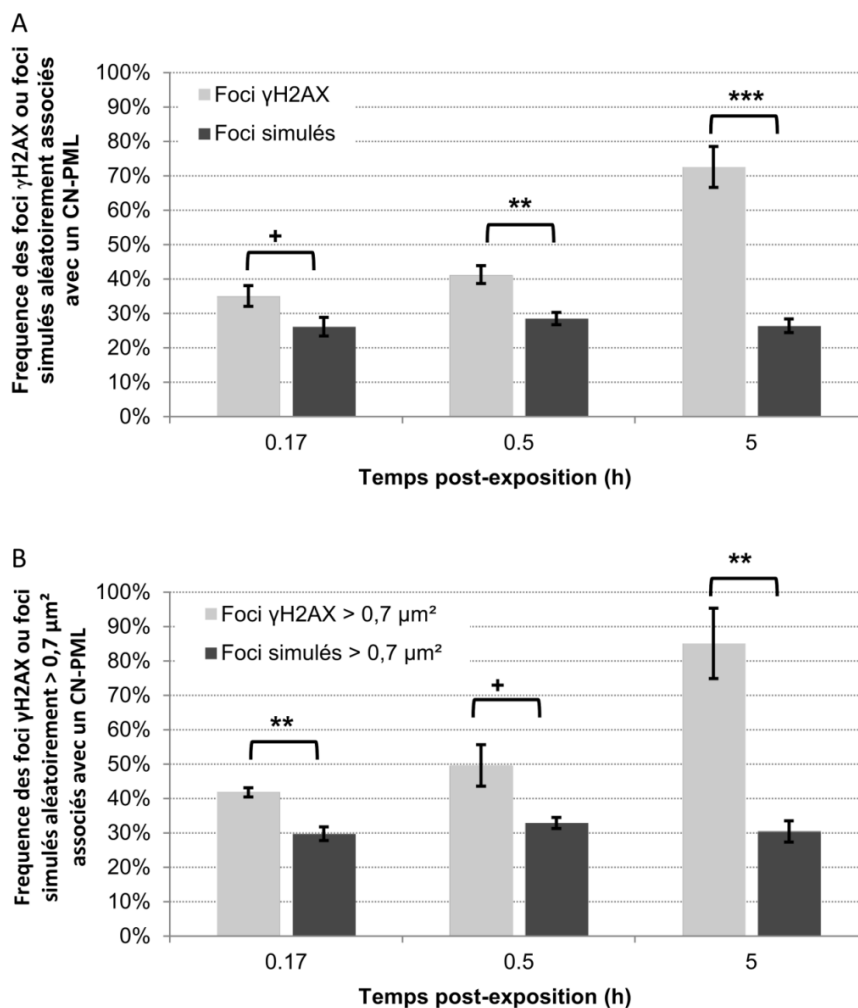


Figure IV.3.22 : Dynamique d'association des CN-PML sur les foyers γ H2A.X. Histogrammes représentant la proportion des foyers γ H2A.X étant à moins de $1 \mu\text{m}$ d'un CN-PML. **(A)** L'analyse est faite, après une dose de 1 Gy, sur tous les foyers γ H2A.X détectés et **(B)** sur les foyers ayant une aire $> 0,7 \mu\text{m}^2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$. Les mesures présentées correspondent aux foyers γ H2A.X expérimentaux (gris clair) et aux foyers simulés aléatoirement (gris foncé). Elles représentent la moyenne calculée sur deux expériences soit 16 000 et 11 000 foyers à 10 et 30 min, et 3 600 et 300 foyers à 5 et 24 heures. En utilisant le test de Student, les valeurs significativement différentes sont indiquées comme suit : $^+ \alpha < 0,1$, $^{**} \alpha < 0,01$ et $^{***} \alpha < 0,001$.

Dans tous les cas, ce taux d'association CN-PML/foyers γ H2A.X est toujours plus élevé par rapport à celui obtenu avec les foyers simulés ce qui suggère que l'association entre les deux structures est dynamique et qu'elle commencerait rapidement après le début de la signalisation des dommages à l'ADN.

3.3. Evolution de cette association après la division cellulaire

Nous avons analysé ensuite l'association des foyers persistants et des CN-PML différenciellement dans les cellules, en phase G0/G1, ayant ou non incorporées du BrdU. Cette association des foyers persistants et des CN-PML est observable aussi bien au sein des cellules BrdU négatives que des cellules BrdU positives quel que soit le temps et la dose d'irradiation (*Figure IV.3.23*).

Il semble que la fréquence d'association est toujours plus élevée au sein des cellules n'ayant pas fait de cycle. Environ 90% d'association est observée dans les cellules BrdU négatives et environ 70% d'association dans les cellules BrdU positives (*Figure IV.3.23*). Cette expérience a été réalisée une fois, il serait somme toute nécessaire de la reproduire pour confirmer ou infirmer cette tendance.

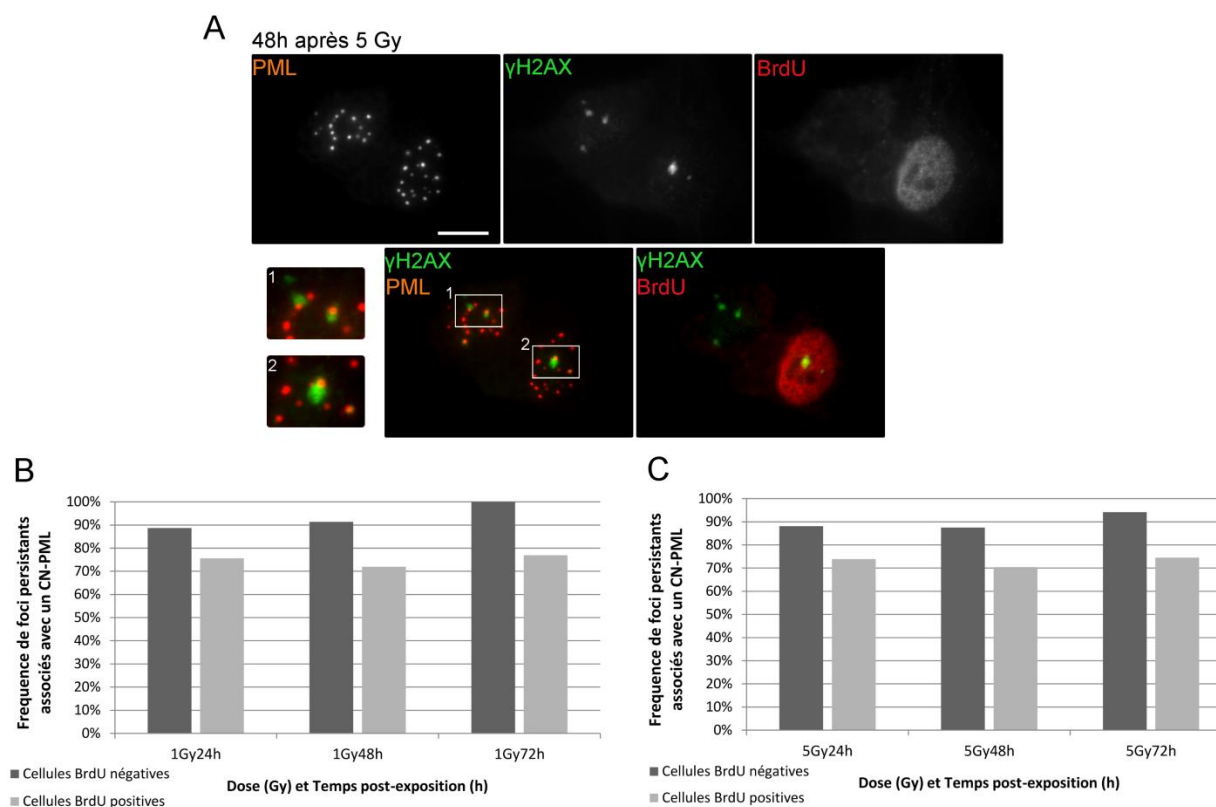


Figure IV.3.23 : Maintien de l'association des CN-PML sur les foyers persistants après la division cellulaire. (A) Images de microscopie à fluorescence obtenues 48 heures après une exposition à 5 Gy. Les cellules sont marquées avec des anticorps anti-PML (Alexa Fluor 647), anti- γ H2A.X (FITC) et anti-BrdU (Alexa Fluor 594). Les panels 1 et 2 représentent le grossissement des structures CN-PML/foyer persistant, l'une dans une cellule n'ayant pas incorporé de BrdU (1) et l'autre dans une cellule ayant incorporé du BrdU (2). La barre d'échelle correspond à 10 μ m. **(B-C)** Histogrammes représentant la proportion de foyers persistants à moins de 1 μ m d'un CN-PML, dans des cellules n'ayant pas incorporé du BrdU (gris foncé) et dans des cellules ayant incorporé du BrdU (gris clair) après une exposition à 1 Gy **(B)** et à 5 Gy **(C)**. Les valeurs représentent la fréquence mesurée sur une expérience soit en moyenne 700 foyers persistants à 1 Gy et 1 700 à 5 Gy.

Partie V.

Discussion et Perspectives

1. Caractéristiques des foyers γ H2A.X persistants

Dans les cellules de mammifères, juste après l'endommagement de l'ADN, la phosphorylation de l'histone H2A.X sur la sérine 139 (γ H2A.X) permet la signalisation des dommages. L'amplification de cette phosphorylation sur les nucléosomes présents sur des mégabases autour de la CDB permet l'observation au microscope de foyers nucléaires (Kinner et al., 2008; Löbrich et al., 2010; Rogakou et al., 1999). En plus d'être un vecteur de la signalisation du dommage, γ H2A.X participe à la relaxation de l'architecture de la chromatine, relaxation qui permet de rendre accessible la CDB aux protéines impliquées dans le processus de réparation (Misteli and Soutoglou, 2009; Price and D'Andrea, 2013). La disparition des foyers γ H2A.X est généralement associée à la réparation des dommages (Rothkamm and Löbrich, 2003) et à la restauration de la structure de la chromatine (Soria et al., 2012).

A la suite de l'exposition à une dose de 1 et 5 Gy de rayons X (4MV), de cellules HUVEC synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, nous avons observé un nombre maximum de foyers γ H2A.X par noyau 30 minutes après l'exposition, avec $19,9 \pm 1,8$ foyers γ H2A.X à 1 Gy et $54,6 \pm 11,4$ foyers γ H2A.X à 5 Gy (*Figure IV.1.1*). Nos résultats sont en accord avec des études précédentes qui reportent des valeurs allant de 15,9 à 21 foyers γ H2A.X par noyau et par Gy en utilisant un dénombrement manuel ou automatique (Costes et al., 2007; Kegel et al., 2007; Leatherbarrow et al., 2006). Il est important de noter qu'à la dose de 5 Gy, il y a une saturation dans la détection des foyers, 30 minutes après l'exposition. En effet, lorsque la quantité de foyers γ H2A.X par noyau devient importante alors que l'aire du noyau ne change pas, il devient impossible de séparer les foyers les uns des autres. L'algorithme du logiciel d'analyse d'image peut donc avoir des difficultés à les distinguer malgré le soin tout particulier aux réglages des paramètres de détourage des objets pour limiter ce biais. Ainsi, au lieu de détourer des foyers individualisés, l'algorithme identifie des agglomérats de foyers γ H2A.X. Cet effet de saturation après une irradiation à 5 Gy n'est pas spécifique de l'analyse d'image automatisée et est également vrai lors de l'observation manuelle. En effet, Kegel et al., ont reporté un effet de saturation dans la quantification manuelle des foyers γ H2A.X à partir de 50 foyers par noyau

(Kegel et al., 2007). Cette perte d'exhaustivité dans le dénombrement des foyers γ H2A.X initiaux impacte peu la suite de notre travail car nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux foyers γ H2A.X persistants.

Dans un second temps, nous observons une décroissance de la quantité de foyers par noyau au cours du temps. Nos résultats montrent que la quantité de foyers γ H2A.X, 24 heures après exposition, devient proportionnelle à la dose, soit 4,6 fois plus de foyers γ H2A.X dans les cellules après 5 Gy par rapport à celles irradiées à 1 Gy : $4,2 \pm 0,5$ et $0,9 \pm 0,2$ foyers γ H2A.X par noyau, respectivement (Figure IV.1.1). A ce même temps post-irradiation, la proportion de foyers γ H2A.X au sein des cellules irradiées correspond à 4,5% et 7,7% des foyers observés 30 minutes après une irradiation à 1 Gy et 5 Gy. La différence entre la proportion relative de foyers γ H2A.X à 1 et à 5 Gy ne semble pas significative, étant donné que la proportion de foyers γ H2A.X, 30 minutes après une irradiation de 5 Gy, est sous-estimée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Yamauchi et al. (Yamauchi et al., 2008) et de Löbrich et al. (Löbrich et al., 2010), qui ont réalisé des irradiations à 1 et 3 Gy et montré une proportion similaire de foyers résiduels à 24 heures, soit, respectivement, 4,9% et 6% des foyers observés à 30 minutes (Löbrich et al., 2010; Yamauchi et al., 2008).

Nous avons également caractérisé ces foyers γ H2A.X par l'évolution de leur aire au cours du temps, entre 10 minutes et 7 jours après l'irradiation des cellules. De la même manière que la détermination du nombre de foyers par noyau, la mesure de l'aire de ces foyers peut être biaisée lorsque leur densité au sein des noyaux est élevée. Ainsi, aux temps 30 minutes après l'irradiation, seules les données des aires obtenues après une dose de 1 Gy ont pu être considérées et interprétées. Globalement, l'aire moyenne des foyers γ H2A.X augmente de façon concomitante avec la diminution générale de leur quantité au sein des noyaux. En effet, la majorité des foyers γ H2A.X observables 30 minutes suivant l'exposition (1 Gy) ont une aire inférieure à $0,7 \mu\text{m}^2$, alors que les foyers γ H2A.X observables après 24 heures ont en moyenne une aire supérieure à $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ (1 et 5 Gy) (Figure IV.1.4). L'aire des foyers est un paramètre moins étudié dans la littérature que leur fréquence. Dans leurs travaux Yamauchi et al., ont observé des foyers ATM avec des aires inférieures à $0,2 \mu\text{m}^2$ 30 minutes après une irradiation à 1 Gy et supérieures à $0,8 \mu\text{m}^2$ 24 heures après l'exposition (Yamauchi et al., 2008). De

plus, les foyers ATM avaient en moyenne la même aire, quelle que soit la dose d'irradiation (1 à 8 Gy). Nos deux études rapportent ainsi les mêmes caractéristiques morphologiques des foyers et ceci avec deux marqueurs différents, ATM ou γ H2A.X.

Suite à cette analyse, nous avons défini que les foyers γ H2A.X présents au-delà de 24 heures suivant l'exposition avec une aire supérieure à $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ sont des foyers persistants. A ce même temps post-irradiation, il reste $0,2 \pm 0,1$ foyers persistants γ H2A.X par noyau après 1 Gy et $2,0 \pm 0,6$ foyers persistants γ H2A.X par noyau après 5 Gy (*Figure IV.1.5*). Yamauchi et *al.*, ont quant à eux, choisi comme seuil une aire de $2 \mu\text{m}^2$ et défini, ainsi, un nombre de foyers persistants (ATM) de 0,2 par noyau, 48 heures après la dose de 1 Gy. Il est difficile de comparer les résultats ces travaux avec les nôtres du fait qu'ils se soient placés à 48 heures pour faire leurs mesures quantitatives. En effet, dans notre modèle expérimental une partie des cellules ont fait un cycle cellulaire 48 heures après l'exposition et nous observons que la division a un impact sur le taux moyen de foyers persistants par noyau. En considérant ce résultat, il devient erroné de comparer des taux de foyers à l'échelle de la population sans faire de distinction entre les cellules qui ont fait un cycle cellulaire et celles qui n'en ont pas fait.

La persistance des foyers γ H2A.X s'accompagne d'une augmentation de leur aire, dont le rôle et la cause n'est pas élucidée. Trois hypothèses peuvent être posées pour expliquer ce phénomène : i) l'amplification du signal γ H2A.X, ii) la relaxation de la chromatine au niveau des foyers γ H2A.X, iii) la fusion de plusieurs foyers non résolus.

La première hypothèse est celle qui est actuellement privilégiée car alimentée par la présence de la protéine ATM rapportée pour des foyers 53BP1 radio-induits jusqu'à 48 heures suivant l'exposition à 1 Gy dans des cellules humaines normales (Yamauchi et *al.*, 2008). La protéine ATM phosphoryle l'histone H2A.X en réponse aux dommages de l'ADN. Sa présence pourrait expliquer le maintien de cette phosphorylation et son extension conduisant ainsi à l'augmentation de l'aire des foyers persistants. La crédibilité de cette hypothèse est renforcée par le fait que l'inhibition d'ATM affecte l'augmentation de l'aire des

foyers γ H2A.X/53BP1 induits par des rayonnements ou par clivage enzymatique (Caron et al., 2015; Yamauchi et al., 2008).

Ceci n'exclut pas l'hypothèse d'une possible relaxation locale de la chromatine qui pourrait également conduire à une augmentation du volume nucléaire occupé par le foyer (Kruhlak et al., 2006). Cependant ce phénomène a uniquement été décrit à des temps après exposition extrêmement précoces (quelques dizaines de minutes). En effet, l'étude du changement de la structure de la chromatine suite à une micro-irradiation (laser UV) de noyaux de cellules embryonnaires de souris (MEF), avait mis en évidence une décondensation locale de la chromatine, décondensation conduisant à une augmentation de 30% de la surface de la zone endommagée dans les minutes qui suivent l'exposition (Kruhlak et al., 2006). Falk et al. ont également observé l'augmentation de la proportion de dommages signalisés dans les zones décondensées (zones marquées H4K5ac), entre 10 et 20 minutes après irradiation de cellules fibroblastiques exposées à 1,5 Gy de rayons γ . Cette augmentation était associée à la présence de TIP60 (acétylase) au niveau de ces foyers, laissant supposer qu'une relaxation locale et précoce de la chromatine avait eu lieu (Falk et al., 2007). Nous supposons que cette augmentation devrait alors s'accompagner de la diminution de la densité de γ H2A.X au sein des foyers et donc d'une diminution de l'intensité moyenne associée, ce que nous n'observons pas dans nos travaux. Nous montrons au contraire une augmentation de la densité d'ADN ainsi qu'une potentielle désacétylation locale de H4K16 entre 30 minutes à 24 heures (*Figures IV.1.9 à IV.1.11*). Ces éléments vont à l'inverse d'une éventuelle décondensation locale de la chromatine. Il est donc peu probable, dans notre cas, que l'augmentation de l'aire des foyers persistants soit (ou pas uniquement) causée par cette relaxation de la chromatine.

La troisième hypothèse pouvant expliquer l'augmentation de l'aire des foyers γ H2A.X, est la fusion de ces derniers. Cette idée de fusion des foyers γ H2A.X sous-tend un mouvement de la chromatine au niveau de la lésion. La vidéo-microscopie avait mis en évidence un phénomène de diffusion des foyers qui, si des foyers sont proches, pourrait conduire à leur fusion. Ainsi, suite à l'exposition de cellules épithéliales d'ostéosarcome humain (U2OS) à une dose de 5 Gy de rayonnements γ , il est possible d'observer une augmentation de la mobilité des

zones endommagées (foyers 53BP1) par rapport à des zones non endommagées, (centromères ou domaines chromosomiques) (Krawczyk et al., 2012). Plusieurs estimations de l'amplitude de ces mouvements des CDB ont été réalisées sur la base de la vitesse de déplacement des foyers 53BP1 ou NBS1 marquées avec la protéine GFP et filmées en temps réels, dans des fibroblastes humain et des U2OS (Falk et al., 2007; Jakob et al., 2009b). Ces estimations vont de 0,01 à 0,03 $\mu\text{m}^2/\text{min}$ dans les 6 heures suivant une exposition de 2 ou 3 Gy de rayons X. Ces vitesses s'apparentent à des mouvements de diffusion (Falk et al., 2007; Georgescu et al., 2015; Jakob et al., 2009b), ce qui confirme que les dommages signalisés doivent être relativement proches pour que les foyers fusionnent. Dans les 30 minutes suivant une irradiation à 5 Gy de cellules U2OS, le taux de fusion des foyers 53BP1 est ainsi de seulement 1,5 fusion par cellule (Krawczyk et al., 2012). Ce phénomène a également été reporté (sans être quantifié) dans les 10 heures suivant une exposition de cellules épithéliales mammaires humaines à la dose de 2 Gy (Georgescu et al., 2015). Ce phénomène ne semble pas suffisamment fréquent pour expliquer le taux de foyers qui grossissent au cours du temps, que nous observons quelle que soit la dose. En effet, dans le contexte d'une exposition à 1 Gy de rayons X, les dommages de l'ADN signalisés par $\gamma\text{H2A.X}$ sont relativement éparses dans le noyau, et la fusion ne permet pas d'expliquer l'augmentation généralisée en taille. Donc s'il existe, ce phénomène semble marginal et ne peut pas être à lui seul responsable de l'augmentation de l'aire des foyers persistants.

2. La persistance de certains foyers $\gamma\text{H2A.X}$ a-t-elle des causes identifiables ?

L'hypothèse la plus communément admise est, tant qu'il y a des dommages de l'ADN, il y a phosphorylation de l'histone H2A.X, et *vice versa*. Ainsi un foyer persistant pourrait correspondre à un dommage de l'ADN non réparé. Nous pouvons présupposer qu'un dommage difficilement réparable pourrait être dû à une structure complexe, par exemple plusieurs CDB ou différents types de dommages proches.

Nous voyons augmenter, à priori linéairement, le taux de foyers $\gamma\text{H2A.X}$ persistants avec la dose (entre 1 et 5 Gy). Ce qui augmente également

linéairement avec la dose est la densité des ionisations créées par la traversée du rayonnement dans la matière, générant ainsi des dommages plus proches et donc potentiellement plus complexes. Indépendamment de la dose, cette promiscuité des dommages liée à la densité des ionisations est bien démontrée lors d'exposition avec des particules α , où les dommages générés sont observables sous forme de traces de signalisation γ H2A.X particulièrement persistantes (Aten et al., 2004). A la suite d'une irradiation avec des ions uranium (3 MeV par nucléon ; TEL de 14 MeV/ μ m), les foyers γ H2A.X observés dans des fibroblastes de peau avaient une aire moyenne de 1 μ m² dès 10 minutes après l'irradiation. Ces derniers persistaient au minimum 18 heures après l'exposition (Jakob et al., 2009a). Concernant les irradiations photons, Neumaier et al. ont observé 30 minutes après des irradiations aux rayons X, un nombre de foyers 53BP1 par Gy plus faible pour une dose de 2 Gy que pour une dose de 0,1 Gy (Neumaier et al., 2012). Ceci suggère donc que la promiscuité des dommages à 2 Gy est suffisante pour que plusieurs CDB soient signalisées dans un même foyer de réparation (Jakob et al., 2009b; Neumaier et al., 2012). Nous pouvons donc supposer que la formation de dommages de l'ADN proches pourrait induire des structures de dommages difficilement réparables et potentiellement persistants, et dont la fréquence augmente avec la dose. De plus, dans nos travaux, nous observons que les foyers qui persistent ont une aire supérieure à 0,7 μ m² (Figure IV.1.4). La présence de foyers γ H2A.X remplissant ce critère de taille est également mise en évidence dès 30 minutes, ce qui nous permet de penser que ce pourrait être ces foyers qui persisteront.

La densité de dépôt d'énergie n'est pas le seul moteur du risque de promiscuité des dommages. En effet, la conformation de la chromatine au moment de l'irradiation peut également jouer un rôle important dans l'augmentation de la probabilité de cette promiscuité (Cann and Delleire, 2011; Goodarzi et al., 2010) mais aussi dans l'augmentation de la difficulté à traiter les dommages. Nos résultats montrent qu'au niveau des foyers γ H2A.X, l'ADN est en moyenne plus dense comparé à la densité moyenne observée sur l'ensemble du noyau, et ceci dès 10 minutes après l'exposition. Ainsi, dans nos expérimentations, cette caractéristique ne semble pas être spécifique des foyers persistants (Figure IV.1.9). En revanche, la légère hypoacétylation observée à partir de 24 heures pourrait correspondre, si elle est significative, à une organisation particulière de la

chromatine associée aux foyers persistants (*Figure IV.1.11*). Il est néanmoins important de noter que les HUVEC ne présentent pas, à l'échelle micrométrique, de zones d'euchromatine et d'hétérochromatine très contrastées, rendant difficile cette distinction si elle existe. Lorat et *al.* ont réalisé à l'échelle nanométrique des analyses structurales sur la densité de la chromatine au niveau des dommages signalisés à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Lorat et al., 2012). Ces expériences ont été faites sur des neurones corticaux après irradiation *in vivo* de souris ainsi qu'*in vitro* sur des fibroblastes. Lorat et *al.* ont montré ainsi que l'arrivée de la protéine pKu70 est plus lente au niveau des dommages localisés dans l'hétérochromatine (20 minutes) par rapport aux dommages localisés dans l'euchromatine (immédiat) (Lorat et al., 2012). Ils ont également vu disparaître les protéines pKu localisées dans l'euchromatine plus rapidement (retour au niveau du bruit de fond au bout de 30 à 60 min). En revanche, la signalisation associée à 53BP1 et γ H2A.X semble être majoritairement associée avec les zones d'hétérochromatine, de sorte que la majorité des dommages persistants à 24 et 72 heures, signalisés par 53BP1, ont été observés dans les zones denses en ADN associées à l'hétérochromatine (Lorat et al., 2012; Lorat et al., 2015). Tous ces éléments vont dans le sens que les foyers γ H2A.X persistants sont initialement formés dans des zones d'ADN plus denses impliquant une potentielle complexité dans la structure initiale du dommage qui, de ce fait, est plus difficile à réparer. Cependant, l'analyse des modulations de l'acétylation de H4K16 au niveau des foyers ne donnant pas de nette indication quant à la compaction de l'ADN dans ces zones, il serait intéressant d'utiliser d'autres MPT associées à l'hétérochromatine (facultative ou constitutive) telles que H3K9 di et triméthylée, H3K4 et H3K27 triméthylées ainsi que H4K20 diméthylée, par exemple.

3. L'association entre les foyers γ H2A.X et les corps nucléaires PML comme marqueur précoce de dommages persistants ?

Pour aller plus loin, nous avons étudié l'évolution de l'association des foyers γ H2A.X avec des corps nucléaires PML (CN-PML). Ces corps sont impliqués, entre autres, dans la réponse aux dommages de l'ADN (Bernardi and Pandolfi,

2007; Dellaire et al., 2006). Les CN-PML sont des structures sphériques ayant une position relativement stable dans le noyau cellulaire (Eskiw et al., 2003; Lang et al., 2010). Ils peuvent devenir mobiles mais de manière dépendante du métabolisme énergétique de la cellule (Muratani et al., 2002). Leur nombre dans les cellules humaines normales varie en fonction du type cellulaire, de l'état du cycle cellulaire et des conditions environnementales des cellules (Ascoli and Maul, 1991; Koken et al., 1995; Maul et al., 1995). Il a notamment été montré que l'induction de dommages de l'ADN influence les CN-PML (Bernardi and Pandolfi, 2007).

Nous observons en effet une augmentation du nombre de CN-PML par noyau après exposition des HUVEC à 5 Gy de rayons X. Ce phénomène se produit à partir de 24 heures et persiste jusqu'à 96 heures (*Figure IV.3.20*). Dans leurs travaux Varadaraj et al. ont également observé cette augmentation de la quantité de CN-PML par noyaux, mais de manière plus précoce (dès 4 heures, premier temps analysé) et pour des doses allant de 1 à 15 Gy. Dans leur modèle, cette augmentation du nombre de CN-PML reste observable au minimum jusqu'à 24 heures après l'exposition pour des doses supérieures à 10 Gy (dernier temps de leur cinétique) (Varadaraj et al., 2007). Dellaire et al., ont également vu persister cette augmentation du taux de CN-PML dans les noyaux au minimum jusqu'à 24 heures après l'exposition (dernier temps de leur cinétique) pour des doses supérieures à 5 Gy. Dans ces études, c'est une fission des CN-PML qui a été identifiée comme responsable de l'augmentation du nombre de CN-PML quelques minutes après induction des CDB, formant ainsi des micro-corps à partir des CN-PML « parentaux » (Dellaire et al., 2006). L'équipe de Bazett-Jones a proposé un modèle qui découle des observations de fission des CN-PML et d'une analyse structurale faite à l'aide d'un microscope électronique à transmission et dans lequel ils ont proposé que le maintien de la structure des CN-PML serait intimement liée à l'architecture de la chromatine et que l'endommagement de la chromatine proche d'un CN-PML impliquerait une déstabilisation de ces derniers (Dellaire et al., 2006; Eskiw et al., 2003; Eskiw et al., 2004). Dans nos conditions expérimentales, nous ne mettons pas en évidence la formation de ces micro-corps, ce qui pourrait expliquer l'absence d'augmentation du nombre de CN-PML aussi rapidement après l'exposition. Le fait que nous ne voyons pas de diminution de la

gamme de taille des CN-PML va également dans le sens de cette observation (*Figure IV.3.20*). Ainsi, dans notre cas, le mécanisme de cette augmentation tardive et persistante reste inconnu.

Dans un second temps, nous montrons que l'association entre les foyers γ H2A.X et les CN-PML commence moins de 10 minutes après l'irradiation (temps post-exposition analysé le plus précoce), avec 35% des foyers γ H2A.X concernés par cette association à 10 minutes, 41% à 30 minutes, et 71% à 5 heures après une exposition à 1 Gy (*Figure IV.3.22*). Nous sommes les premiers à mettre en évidence la précocité de cette association entre les foyers γ H2A.X et les CN-PML suite à une irradiation. A partir de 24 heures et ce jusqu'à 7 jours après l'exposition, 80-90% des foyers γ H2A.X persistants sont associés avec un CN-PML et, ceci, aussi bien à la dose de 1 Gy qu'à celle de 5 Gy (*Figure IV.3.21*). Cette augmentation progressive du taux d'association des CN-PML avec les foyers γ H2A.X est cohérente avec les travaux de Carbone et *al.* qui l'ont observé à partir de 2 heures suivant une irradiation de fibroblastes avec 15 Gy de rayons X (Carbone et *al.*, 2002) malgré un taux d'association mesuré plus faible (20% des foyers à 2 heures et 60% à 24 heures). Les travaux de Rodier et *al.*, ont également démontré une association des CN-PML avec les foyers 53BP1 de 30 minutes à 13 jours après une exposition à 10 Gy, avec également un taux plus faible d'association, soit environ 15% à 30 minutes, 30% à 6 heures, 70% à 24 heures et 95% à 48 heures (Rodier et *al.*, 2011). Les variations des taux d'association entre les foyers γ H2A.X/53BP1 et les CN-PML peuvent être dues aux critères de détermination de cette dernière qui sont dépendants de la méthode d'analyse utilisée : manuelle (observation d'une superposition totale ou partielle) ou automatique (détermination d'une distance maximale). Il est néanmoins intéressant de constater que cette association est une signature de la persistance des foyers γ H2A.X et de poser la question de ce qui pourrait induire cette association précoce.

Plusieurs études suggèrent que cette association entre les foyers γ H2A.X et les CN-PML serait nécessaire à la mise en place de certaines voies de réparation. Ainsi, l'inhibition de l'expression de PML ne semble pas interférer avec la réparation par NHEJ par contre elle est délétère à la réparation par HR (Yeung et *al.*, 2012). De plus, RPA et RAD 51 sont nécessaires à l'association des CN-PML au

niveau des foyers γ H2A.X (Münch et al., 2014) sous-tendant l'hypothèse que les CN-PML s'associent aux dommages lorsqu'il y a présence d'ADN simple brin (Münch et al., 2014; Xu et al., 2003; Yeung et al., 2012). Contrairement à nos travaux, ces expériences ont toutes été réalisées sur des cellules asynchrones lors de l'induction des dommages de l'ADN, permettant ainsi la réparation par HR au sein des cellules endommagées en phase S et G2. Dans notre cas, il est intéressant de constater que malgré une induction des dommages de l'ADN dans des cellules synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, nous observons quand même cette association des CN-PML avec certains des foyers γ H2A.X. Dans nos conditions expérimentales, la réparation par HR semble donc peu probable, d'autant plus que 53BP1 est aussi colocalisé au niveau des foyers persistants et qu'aucune chromatide sœur n'est disponible comme matrice pour la recombinaison homologe. Ceci suggère que l'association serait induite plus par une structure de dommage de l'ADN particulière ou par le traitement initial de la lésion de l'ADN (y compris la formation d'ADN simple brin par résection) que par l'exécution d'une voie de réparation spécifique.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'identifier quels types de structures de dommage/traitement initial de la lésion entraînent l'association des CN-PML et la persistance du dommage signalisé. Pour y répondre, il est important de pouvoir jouer sur la complexité des dommages induits et d'observer si elle a un impact direct sur la persistance de la signalisation et sur le taux d'association précoce avec les CN-PML. L'utilisation d'autres types de rayonnements engendrant systématiquement des dommages localement plus denses et donc plus complexes tels des particules α seraient des outils très pertinents. Nous pourrions également utiliser d'autres types cellulaires ayant une composante d'hétérochromatine plus marquée, augmentant ainsi la probabilité d'avoir une densité de dommage plus importante localement au niveau des zones d'hétérochromatine. L'utilisation d'autres marqueurs pour caractériser la structure de ces dommages de l'ADN sera également intéressante. Nous pouvons citer comme exemple la protéine RPA permettant la mise en évidence de la présence d'ADN simple-brin.

4. Les foyers persistants ne bloquent pas définitivement le cycle cellulaire

Pour étudier l'impact de l'irradiation sur le cycle cellulaire, nous avons réalisé des expériences d'incorporation du BrdU après irradiation des HUVEC synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

Les résultats obtenus sur les cellules non irradiées correspondent à la croissance normale des HUVEC dans nos conditions de culture c'est-à-dire un temps de doublement moyen de 18 heures. En 24 heures, la majorité des cellules sont entrées en cycle et 30% ont déjà effectuées un cycle cellulaire complet (BrdU positives en phase G1). Quarante-huit heures plus tard, elles ont toutes effectuées un cycle complet. Lorsque les cellules sont exposées aux rayons X, une accumulation en phase G1 est mise en évidence de façon dépendante de la dose. Ainsi, 24 heures après l'exposition, 32% et 61% des cellules de la population sont toujours en phase G1 à 1 Gy et 5 Gy respectivement, alors qu'elles ne sont plus que 15% dans la condition non-irradiée (*Figure IV.2.13*). Cette observation semble indiquer que le délai de reprise du cycle dépend du taux initial de dommages. Le principal point de contrôle activé, lors de l'induction des dommages de l'ADN en phase G0/G1, semble donc être celui de la transition entre les phases G1 et S. De plus, nos résultats ne mettent pas en évidence d'augmentation significative de la proportion de cellules en phase S ou G2 et ceci quelle que soit la dose d'exposition. Ces observations sont cohérentes avec la synchronisation des cellules dans la phase G0/G1 du cycle et également avec la mise en place du point de contrôle de la phase G1 qui a été mise en évidence précédemment, notamment lors d'irradiation de cellules synchronisées par inhibition de contact (tapis cellulaire) (Di Leonardo et al., 1994; Linke et al., 1997). Huang et al., ont été plus loin en établissant que la présence d'une seule CDB était capable d'activer le point de contrôle de la phase G1. Des expériences sur la base de transfection de plasmides ayant dans leur séquence des sites d'enzymes de restriction permettant l'induction d'une ou plusieurs CDB, leurs ont permis de formuler ces conclusions (Huang et al., 1996). Les travaux de Yamauchi et al. ont également montré un arrêt en phase G1 des cellules fibroblastiques irradiées, avec 1 Gy de rayons X, de façon concomitante à la présence de foyers persistants (Yamauchi et al., 2008).

Quarante-huit heures après l'exposition, le blocage du cycle en phase G1, dépendant de la dose, est toujours observé pour une minorité de cellules (4,5% des cellules qui sont BrdU négatives à 1 Gy et 27,3% à 5 Gy ; *Figure IV.2.13*). Ainsi, la majorité des cellules irradiées sont réparties dans le cycle. De manière surprenante, nous observons que les cellules ayant des foyers persistants sont aussi capables de faire au moins un cycle cellulaire. Non seulement, les cellules contenant des foyers persistants passent le point de contrôle G1/S mais également celui de G2/M puisque nous observons qu'une partie des cellules en phase G0/G1 sont BrdU positives (cycle complet depuis l'irradiation) et qu'elles présentent un taux de foyers significativement supérieur au bruit de fond et dépendant de la dose. Dans la population des cellules en phase G0/G1 48 heures après une exposition à 1 Gy, il y a 17% de cellules BrdU positives qui contiennent des foyers persistants. Après une exposition à 5 Gy, elles représentent 42% de la population cellulaire en phase G0/G1 (*Figure IV.2.15*).

Nous mettons également en évidence que la capacité des cellules à progresser dans le cycle cellulaire ne semble pas dépendre du nombre de foyers persistants qu'elles contiennent (ici, 8 foyers persistants au maximum). En effet, le taux de cellules BrdU négatives diminue entre 24 et 48 heures, et ceci quel que soit le nombre de foyers persistants qu'elles contiennent (*Figure IV.2.17*). Cette observation suggère que la reprise du cycle constatée dans nos expérimentations n'est pas liée à une potentielle tolérance de foyers résiduels lorsque leur nombre passe sous un seuil. Il semble se produire une levée plus ou moins globale du point de contrôle G1/S entre 24 et 48 heures.

Les foyers persistants analysés dans notre étude semblent donc compatibles avec la progression du cycle cellulaire. Ainsi, si les foyers persistants correspondent à des CDB non réparées, nos observations semblent indiquer que ces mécanismes de contrôle du cycle ne sont pas infaillibles. En effet, les cellules primaires normales, telles que les HUVEC, ont normalement des points de contrôle du cycle cellulaire actifs capables de bloquer la progression du cycle jusqu'à ce que les CDB soient réparées (Dasika et al., 1999; van Gent et al., 2001; Zhou and Elledge, 2000). D'autres travaux, sur des fibroblastes humains et des fibroblastes embryonnaires murins, ont suggéré que le point de contrôle de la phase G1/S peut être contourné, en dépit de CDB non réparées, en particulier si les cellules sont à

la fin de la phase G1 lors de l'irradiation et qu'elles ont passé le point de restriction de cette phase (Cann and Hicks, 2006; Deckbar et al., 2010). C'est notamment le cas, des expériences réalisées par Deckbar et al., sur des fibroblastes humains irradiés après synchronisation en phase G1. Ils ont montré une augmentation du taux de cellules en phase S juste après des doses de 1 et 2 Gy (Deckbar et al., 2010). Il semble néanmoins que le phénomène qui a été mis en évidence dans ces travaux n'est pas le même que dans le nôtre car ils ont observé un passage en phase S très rapidement après l'irradiation (Cann and Hicks, 2006; Deckbar et al., 2010) comparé au blocage de 24 heures que nous observons.

L'observation de CDB induites en phase G0/G1 pouvant franchir les points de contrôle G1/S et persister après la réplication de l'ADN n'est pourtant pas nouvelle. En effet, Rodriguez et al. ont décrit la présence d'éléments chromosomiques incomplets (fragments de chromosomes avec ou sans centromère mais sans signal télomérique à chaque extrémité) dans des chromosomes condensés prématurément (PCC couplée à de l'hybridation *in situ* de sondes télomériques), ce qui indique la présence de cassures chromosomiques en phase G2 provoquées par des CDB non réparées et induites en phase G0/G1 (lymphocytes) (Rodríguez et al., 2009). Deckbar et al. ont également signalé la présence de cassures chromosomiques (sans discrimination entre éléments chromosomiques complets ou incomplets) et de foyers γ H2A.X dans les fibroblastes en phase G2 24 heures après avoir été irradiés en phase G0/G1 (Deckbar et al., 2010). Toutefois, ces précédents travaux mettaient en évidence une forte diminution du taux d'éléments chromosomiques incomplets observables dans les cellules en phase M suggérant que le point de contrôle G2/M jouerait un rôle de filtre important dans la transmission de ces CDB résiduelles (Rodríguez et al., 2009). Malgré cela, un taux d'éléments chromosomiques incomplets par cellule restait observable en phase M et ceci de façon dépendante de la dose (0,1 par cellule à 1 Gy et 0,4 par cellule à 3 Gy) (Rodríguez et al., 2009) confirmant aussi la capacité d'une partie de ces CDB résiduelles à arriver au moins jusqu'en mitose. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré qu'il y a un seuil de 15-20 CDB en dessous duquel le point de contrôle G2/M n'est pas activé (Deckbar et al., 2007). Nous n'observons pas, dans notre modèle expérimental, d'accumulation significative des cellules en phase G2 qui pourrait correspondre à l'arrêt en phase G2 nécessaire à la sélection

des cellules (*Figure IV.2.14*). Cependant, notre protocole expérimental n'est pas optimisé pour permettre l'observation de toutes les cellules en phase G2. En effet, les HUVEC ne sont que partiellement adhérentes lors de la phase fin de G2/M, ce qui les rend difficilement observables après les traitements d'immunomarquages (perte ou noyaux partiellement décollés).

Toutes ces observations participent à la relativisation de l'infailibilité des points de contrôle du cycle cellulaire des cellules humaines normales face à la présence d'ADN endommagé.

5. Impact de la division cellulaire sur la structure signalisée par les foyers persistants

L'observation de foyers persistants au sein des cellules filles des cellules irradiées suggère donc leur capacité à se transmettre, dans une certaine mesure, au travers des différentes étapes du cycle cellulaire (S, G2, et M). Pour étudier les caractéristiques de leur transmission, l'évolution de leur fréquence a été analysée dans un premier temps en fonction de l'incorporation de BrdU. Ainsi, nous observons que le taux de foyers persistants est plus faible dans les cellules filles (cellules en G0/G1, BrdU positives) que dans les cellules mères irradiées (cellules en G0/G1, BrdU négatives). En effet, nous mesurons $2,2 \pm 0,4$ foyers persistants par cellule BrdU négative 24 heures après une dose de 5 Gy et $0,9 \pm 0,2$ foyers persistants par cellule BrdU positive 48 heures après la même dose. Par contre, ce taux de foyers persistants au sein des cellules qui sont BrdU négatives est resté stable au cours du temps (entre 24 et 48 heures). Cette stabilité au cours du temps est également constatée dans les cellules BrdU positives (*Figure IV.2.16*). Ces observations suggèrent que c'est la division cellulaire, plutôt que le temps post-exposition, qui est principalement responsable de la réduction de la fréquence de foyers persistants au sein des cellules. Ainsi le taux de foyers persistants est divisé par deux suite à la division cellulaire laissant supposer que leur transmission ne s'accompagne pas d'une duplication au cours de la phase S.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la répartition des foyers persistants dans les deux noyaux fils. Pour cela, la cytodièrese a été bloquée par ajout de cytochalasine B 24 heures après l'exposition à une dose de 5 Gy de

rayon X. Le blocage de cette étape de la phase M permet l'observation des deux noyaux fils dans le même cytoplasme. Environ 45% des cellules binucléées présentent un nombre asymétrique de foyers persistants entre leurs deux noyaux (*Figure IV.2.18*). Ce résultat suggère que les foyers persistants peuvent être répartis de façon asymétrique dans les cellules filles et donc que ce phénomène pourrait être un des moteurs de la diminution du taux de ces foyers au cours de la division.

Nous observons également de nombreux signes d'anomalies de ségrégation dans des cellules adhérentes ayant fait un cycle cellulaire complet (sans traitement à la cytochalasine B). En effet, 48 heures après l'exposition, nous mesurons une augmentation en fonction de la dose du taux de cellules ayant des micronoyaux et/ou étant binucléées avec 32% à la dose de 1 Gy et 79% à la dose de 5 Gy au sein des cellules ayant incorporé du BrdU (*Figure IV.2.19*). L'observation d'anomalies de ségrégation et de catastrophes mitotiques est attendue en réponse à l'irradiation. En effet, des erreurs de réparation de CDB peuvent conduire à la formation de chromosomes dicentriques et de fragments chromosomiques. Ces derniers sont connus pour être des moteurs de catastrophe mitotique due à une mauvaise ségrégation (Carrano and Heddle, 1973). Cependant, l'analyse du taux d'anomalies de ségrégation en fonction de la présence ou non d'un signal γ H2A.X fait apparaître que le taux de cellules aberrantes est nettement plus élevé lorsque les cellules présentent un signal γ H2A.X avec 50% et 91%, respectivement aux doses de 1 et 5 Gy contre 16% et 44% au sein des cellules sans signal γ H2A.X, aux mêmes doses (*Figure IV.2.19*). Ces résultats nous permettent de suggérer que la présence en phase M d'une structure signalisée par un foyer persistant pourrait également être un moteur d'anomalies de ségrégation.

Ainsi, si un foyer γ H2A.X persistant correspond à minima à une CDB non réparée, la présence de ce dommage au cours de la progression du cycle cellulaire (S, G2, M) pourrait aboutir à une structure interférant avec la ségrégation des chromosomes lors de l'anaphase. Ce phénomène a été observé chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'introduction dans le génome de cet organisme d'un site de clivage enzymatique spécifiquement couplé à l'utilisation de la protéine Ddc1 (DNA damage checkpoint protein 1) marquée à la GFP pour la suivre par vidéo-microscopie (Kaye et al., 2004). Cette protéine a été utilisée pour marquer les

extrémités d'ADN de la CDB induite par coupure enzymatique en phase G1. Cette expérience a permis de mettre en évidence, au moment de l'anaphase, une sorte de "tir à la corde" entre les deux pôles du fuseau mitotique pour séparer les deux chromatides sœurs lésés et ceci dans 15 à 40% des cas. Kaye et *al.*, ont ainsi montré que ce "tir à la corde" entraîne une mauvaise ségrégation des chromosomes entre les cellules filles (Kaye et *al.*, 2004). En s'appuyant sur ce travail, nous postulons que les foyers persistants que nous observons pourraient correspondre à une ou des CDB résiduelles et que la difficulté de ségrégation des chromatides sœurs lésés durant l'anaphase pourrait induire plusieurs types de structures chromosomiques atypiques (*Figure V.5.1*). Ces éléments chromosomiques pourraient être inclus dans le noyau des cellules filles ou former un micronoyau (*Figure V.5.1*), comme nous le laissent suggérer nos observations phénotypiques d'anomalies de ségrégation (*Figure IV.2.19*). Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que la nature des foyers γ H2A.X avant et après division n'est pas la même.

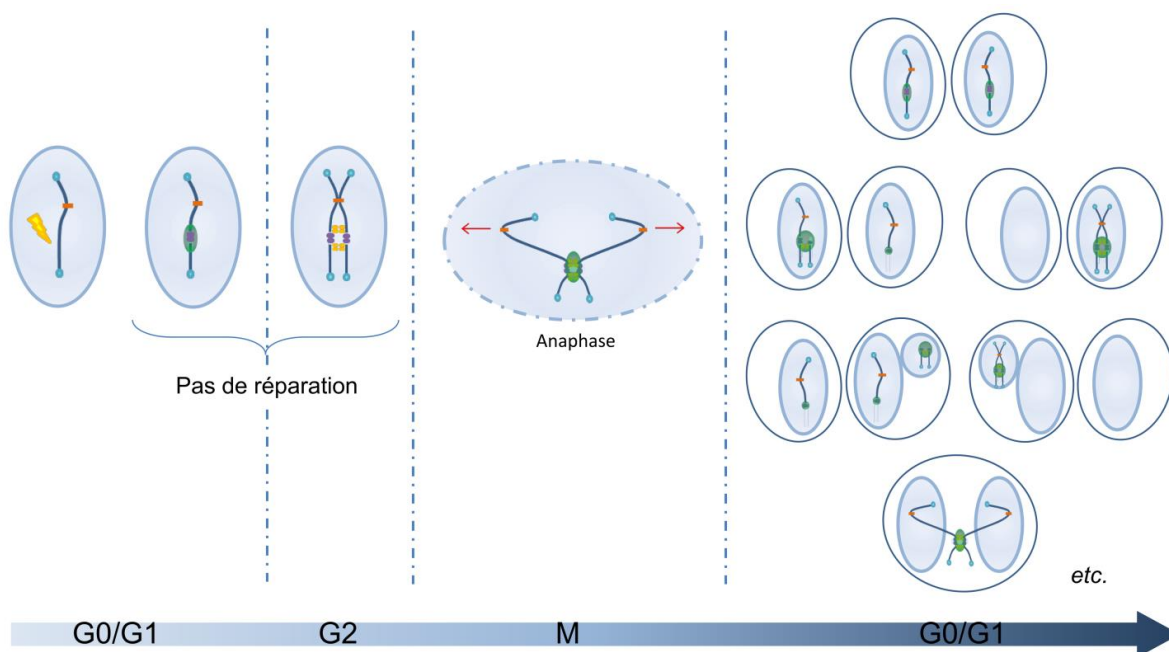


Figure V.5.1 : Modèle de transmission d'une CDB induite en phase G0/G1 du cycle cellulaire et présentation des différents phénotypes possibles après passage de la mitose.

Pour aller plus loin dans la mise en évidence du lien entre les foyers persistants et la structure qu'ils signalisent avant et après la mitose, il serait très

intéressant de pouvoir relier ces foyers γ H2A.X avec la structure chromosomique qui les porte. Des analyses de foyers γ H2A.X dans des cellules en métaphase ont déjà été menées cependant, elles ont montré des résultats contradictoires. Les travaux de Martin et *al.* ont suggéré que ces foyers ne colocalisent pas spécifiquement avec les extrémités libres des chromosomes (sans télomères) ni même avec des cassures mal réparées (Martín et al., 2014). A l'inverse, Suzuki et *al.* ont associé les foyers γ H2A.X avec des dommages mal réparés (Suzuki et al., 2006a). Les résultats de ces différents travaux sont cependant à prendre avec précaution. En effet, de la métaphase à la télophase, l'histone H2A.X est phosphorylée sur la sérine 139 tout le long des bras chromosomiques, indépendamment de possible dommage de l'ADN. Ainsi, il apparaît difficile, voire impossible, de distinguer clairement entre la phosphorylation de l'histone H2A.X qui se produit normalement au cours de la phase M et celle induite par la réponse aux dommages de l'ADN.

Une solution alternative pourrait tout de même permettre d'étudier les structures chromosomiques associées avec les foyers γ H2A.X. Ainsi l'étude de chromosomes condensés prématurément en G2 (PCC chimique) ou de chromosomes au tout début de leur formation (prométaphase ; traitement au nocodazole), juste avant l'expansion du signal γ H2A.X (Eliezer et al., 2014), pourrait être une solution. De plus, l'étude dans les cellules filles de l'occurrence des différents phénotypes représentés dans la *Figure V.5.1* pourra être réalisée en interphase sur la base de marquages en immunofluorescence couplés à de l'hybridation *in situ* permettant de visualiser les foyers γ H2A.X persistants, les télomères et les centromères.

Partie VI.

Conclusion générale

Par nos travaux, nous montrons que suite à l'irradiation des cellules synchronisées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, il y a bien un blocage en phase G1 mais qu'après un certain temps une grande partie des cellules repartent en cycle malgré la présence de foyers persistants associés à des CN-PML. Force est de constater également que les cellules de la génération suivante contiennent encore ces foyers persistants. Ces faits expérimentaux laissent supposer que la présence de dommages persistants n'est pas obligatoirement le moteur d'une entrée immédiate en sénescence ou en mort radio-induite des cellules irradiées comme le suggère les travaux de Rodier *et al.* et de Banath *et al.*, respectivement (Banáth *et al.*, 2010; Rodier *et al.*, 2011). Nous montrons également que la présence de foyers persistants au sein de cellules qui cyclent n'est pas sans impact. En effet, la présence de foyers persistants s'accompagne d'une augmentation du taux d'anomalies de ségrégation lors du passage de la phase M. Ces anomalies se traduisent notamment par la formation de micronoyaux impliquant une perte de matériel chromosomique (aneuploïdies), et certainement par la formation d'autres types d'anomalies comme des polyploïdies. Elles n'empêchent pas nécessairement les cellules de se multiplier mais elles sont un moteur d'instabilité génomique et de déséquilibre dans le dosage génique (Santaguida and Amon, 2015; Suzuki *et al.*, 2003b). Les cellules filles pourraient également à plus ou moins long terme entrer en sénescence (Suzuki *et al.*, 2003; Vitale *et al.*, 2011). Pour aller plus loin, il serait intéressant de suivre les générations cellulaires suivantes.

Nous ne pouvons pas exclure que nos observations soient liées spécifiquement au type cellulaire étudié, les HUVEC. En effet, ces cellules endothéliales ont un temps de doublement relativement rapide de 18 heures. Nous pouvons supposer que cette rythmique rapide de cycle implique que les points de contrôles soient potentiellement levés plus rapidement. Pour cela, il serait intéressant de réaliser ces expériences sur des cellules endothéliales issues d'autres types de vaisseaux sanguins (avec un temps de cycle plus lent) puis sur d'autres types cellulaires humains afin de restreindre ou généraliser ces observations.

Cela fait plusieurs décennies que nous savons que les rayonnements ionisants provoquent des dommages dans l'ensemble des compartiments

subcellulaires et notamment au niveau de l'ADN et que ces dommages peuvent être létaux si ils ne sont pas ou pas correctement réparés par la cellule. L'ensemble des résultats présentés dans ce travail n'est pas totalement en contradiction avec ce fait établi. En effet, de récentes expériences effectuées par vidéo-microscopie montrent qu'une partie (dont la quantité dépend de la dose) des cellules irradiées perd sa capacité d'adhésion dans les heures qui suivent l'irradiation, ce qui indique probablement une mort par apoptose ou par oncos. Le fait que ces dernières perdent leur adhérence signifie qu'elles sont exclues de nos analyses et peut laisser penser, à première vue, que ces situations ne se produisent pas.

Parmi les cellules adhérentes que nous analysons, une partie (dont la quantité dépend toujours de la dose) n'incorpore pas de BrdU et sont toujours présentes au moins jusqu'à 7 jours après l'irradiation (elles ne reprennent donc pas le cycle après l'irradiation), et présentent encore des foyers persistants associés à des CN-PML. Elles ont donc certaines des caractéristiques associées aux cellules sénescents. En effet, la sénescence se traduit par un arrêt de croissance des cellules mais avec une conservation des caractéristiques d'adhérence accompagnée d'une activité métabolique et sécrétoire (Rodier and Campisi, 2011). De plus, la présence de dommages non réparés en leur sein fait également partie des éléments caractéristiques de la sénescence radio-induite (Kim et al., 2014; Rodier et al., 2011; Suzuki et al., 2006b). Une cellule sénescence ne peut pas être considérée comme une cellule morte et peut potentiellement avoir un impact sur son environnement en fonction de sa représentativité au sein d'un tapis cellulaire.

Nos travaux font donc clairement ressortir la multiplicité de devenir des cellules irradiées. Ainsi, même si au moment de l'irradiation les cellules sont, autant que faire se peut, phénotypiquement semblables (phénotype endothélial, caryotype normal, synchronisées en G0/G1), il apparaît clairement que l'irradiation engendre l'apparition d'une mosaïque de phénotypes. La combinatoire liée à la réparation erronée (translocations, dicentriques...) est relativement bien décrite et documentée notamment à travers sa relation avec la dose et la qualité du rayonnement. Nos travaux illustrent que l'absence de réparation est également un moteur d'instabilité génomique post-irradiation et alimente donc cette mosaïque

de devenir cellulaires radio-induits. La connaissance et la prise en compte de cette diversité est essentielle à la compréhension des risques associés à l'irradiation des tissus sains. Elle conditionne le devenir à l'échelle d'un tissu endommagé et peut avoir un impact sur le fonctionnement physiologique du tissu et conduire à la pathologie.

Partie VII.

Références bibliographiques

- Adam, S., Polo, S. and Almouzni, G. (2013). Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3. 3 histone chaperone HIRA. *Cell* **155**, 94-106.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Peter, W. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth. (ed. Science, G.).
- Albig, W., Kioschis, P., Poustka, a, Meergans, K. and Doenecke, D. (1997). Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics* **40**, 314-322.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R. and E, M. A. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786-94.
- Altaf, M., Auger, A., Covic, M. and Côté, J. (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 35-50.
- Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y. and Rotman, G. (2001). Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 38224-38230.
- Ascoli, C. A. and Maul, G. G. (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell Biol.* **112**, 785-95.
- Aten, J. a, Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. a, Essers, J. and Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* **303**, 92-95.
- Badie, C., Iliakis, G., Foray, N., Alsbeih, G., Cedervall, B., Chavaudra, N., Pantelias, G., Arlett, C. and Malaise, E. P. (1995). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat. Res.* **144**, 26-35.
- Banáth, J. P., Klovov, D., MacPhail, S. H., Banuelos, C. A. and Olive, P. L. (2010). Residual γ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer* **10**, 4.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381-95.
- Bassing, C. H., Chua, K. F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S. R., Fleming, J. C., Monroe, B. C., Ciccone, D. N., Yan, C., Vlasakova, K., et al. (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8173-8.
- Beato, M., Wright, R. H. and Vicent, G. P. (2015). DNA damage and gene transcription:

- accident or necessity? *Cell Res.* 1-2.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P. P.** (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 1006-16.
- Bernhardt, P., Friedland, W., Jacob, P. and Paretzke, H. .** (2003). Modeling of ultrasoft X-ray induced DNA damage using structured higher order DNA targets. *Int. J. Mass Spectrom.* **223-224**, 579-597.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A. a, Krempler, A., Jeggo, P. a and Löbrich, M.** (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* **28**, 3413-27.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E.** (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- Braastad, C. D., Hovhannisyan, H., van Wijnen, A. J., Stein, J. L. and Stein, G. S.** (2004). Functional characterization of a human histone gene cluster duplication. *Gene* **342**, 35-40.
- Burgess, R. C., Burman, B., Kruhlak, M. J. and Misteli, T.** (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep.* **9**, 1703-17.
- Burma, S. and Chen, D. J.** (2004). Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst).* **3**, 909-918.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D. J.** (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462-42467.
- Campos, E. I. and Reinberg, D.** (2009). Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 559-99.
- Cann, K. L. and Dellaire, G.** (2011). Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 45-60.
- Cann, K. L. and Hicks, G. G.** (2006). Absence of an immediate G1/S checkpoint in primary MEFs following gamma-irradiation identifies a novel checkpoint switch. *Cell Cycle* **5**, 1823-30.
- Canny, J.** (1986). A computational approach to edge detection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **8**, 679-98.

- Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S. and Pelicci, P. G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* **21**, 1633-1640.
- Caron, P., Choudjaye, J., Clouaire, T., Bugler, B., Daburon, V., Aguirrebengoa, M., Mangeat, T., Iacovoni, J. S., Álvarez-Quilón, A., Cortés-Ledesma, F., et al. (2015). Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep.* **13**, 1598-1609.
- Carrano, A. V and Heddle, J. A. (1973). The fate of chromosome aberrations. *J. Theor. Biol.* **38**, 289-304.
- Castedo, M., Perfettini, J., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-37.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. a, Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., et al. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**, 922-927.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M. and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* **5**, 675-679.
- Chapman, J. R., Sossick, a. J., Boulton, S. J. and Jackson, S. P. (2012). BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair. *J. Cell Sci.* **125**, 3529-3534.
- Chaurasia, M., Bhatt, A. N., Das, A., Dwarakanath, B. S. and Sharma, K. (2016). Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. *Free Radic. Res.* **50**, 273-90.
- Cheung, W. L., Ajiro, K., Samejima, K., Kloc, M., Cheung, P., Mizzen, C. A., Beeser, A., Etkin, L. D., Chernoff, J., Earnshaw, W. C., et al. (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* **113**, 507-17.
- Chiolo, I., Minoda, A., Colmenares, S. U., Polyzos, A., Costes, S. V and Karpen, G. H. (2011). Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* **144**, 732-44.
- Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S. and Lieberman, A. P. (2012). Histone H2AX phosphorylation is required for the initial recognition of DNA double-strand breaks. *Cell* **150**, 101-112.

- J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* **20**, 801-809.
- Contrepois, K., Thuret, J.-Y., Courbeyrette, R., Fenaille, F. and Mann, C. (2012). Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics Chromatin* **5**, 15.
- Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**, 591-6.
- Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. and Beausejour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-29574.
- Corre, I., Niaudet, C. and Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **704**, 61-67.
- Corre, I., Guillonnet, M. and Paris, F. (2013). Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22678-22696.
- Costes, S. V., Ponomarev, A., Chen, J. L., Nguyen, D., Cucinotta, F. A. and Barcellos-Hoff, M. H. (2007). Image-based modeling reveals dynamic redistribution of DNA damage into nuclear sub-domains. *PLoS Comput. Biol.* **3**, 1477-1488.
- Costes, S. V., Chiolo, I., Pluth, J. M., Barcellos-Hoff, M. H. and Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat. Res.* **704**, 78-87.
- Cowell, I. G., Sunter, N. J., Singh, P. B., Austin, C. A., Durkacz, B. W. and Tilby, M. J. (2007). γ H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS One* **2**, 1-8.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-8.
- Dabin, J., Fortuny, A. and Polo, S. E. (2016). Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* **62**, 712-727.
- Daley, J. M. and Sung, P. (2014). 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1380-8.
- Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair (Amst.)* **11**,

12-21.

- Dasika, G. K., Lin, S. C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. and Lee, E. Y. (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* **18**, 7883-99.
- Deckbar, D., Stiff, T., Koch, B., Reis, C., Löbrich, M. and Jeggo, P. A. (2010). The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res.* **70**, 4412-4421.
- Deckbar, D., Jeggo, P. a and Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 271-83.
- Dellaire, G., Ching, R. W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K. C. K., Bristow, R. G. and Bazett-Jones, D. P. (2006). Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J. Cell Biol.* **175**, 55-66.
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540-51.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I. and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363-7.
- Dominski, Z. and Marzluff, W. F. (1999). Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* **239**, 1-14.
- Dominski, Z. and Marzluff, W. F. (2007). Formation of the 3' end of histone mRNA: getting closer to the end. *Gene* **396**, 373-90.
- Downs, J. a, Lowndes, N. F. and Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**, 1001-1004.
- Downs, J. A., Nussenzweig, M. C. and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**, 951-958.
- Du Toit, A. (2013). DNA damage: limiting 53BP1. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 132.
- Eliezer, Y., Argaman, L., Kornowski, M., Roniger, M. and Goldberg, M. (2014). Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. *J. Biol. Chem.* **289**, 8182-8193.
- Eskiw, C. H., Dellaire, G., Mymryk, J. S. and Bazett-Jones, D. P. (2003). Size, position

- and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J. Cell Sci.* **116**, 4455-66.
- Eskiw, C. H., Dellaire, G. and Bazett-Jones, D. P. (2004). Chromatin Contributes to Structural Integrity of Promyelocytic Leukemia Bodies through a SUMO-1-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 9577-9585.
- Falck, J., Coates, J. and Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-611.
- Falk, M., Lukasova, E., Gabrielova, B., Ondrej, V. and Kozubek, S. (2007). Chromatin dynamics during DSB repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1534-45.
- Favaudon, V. (2000). [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother.* **4**, 355-68.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, a T., Surrallès, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. a, Tucker, J. D. and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**, 125-32.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 959-67.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1757**, 1371-1387.
- Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907-16.
- Fischle, W. (2009). Tip60-ing the balance in DSB repair. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1279-1281.
- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2011). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: The means to the end. *FEBS J.* **278**, 3579-3595.
- Foley, E. a and Kapoor, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 25-37.
- Füllgrabe, J., Lynch-Day, M. A., Heldring, N., Li, W., Struijk, R. B., Ma, Q., Hermanson, O., Rosenfeld, M. G., Klionsky, D. J. and Joseph, B. (2013). The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature* **500**, 468-71.
- Füllgrabe, J., Heldring, N., Hermanson, O. and Joseph, B. (2014a). Cracking the survival code: Autophagy-related histone modifications. *Autophagy* **10**, 556-561.

- Füllgrabe, J., Klionsky, D. J. and Joseph, B. (2014b). The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 65-74.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C. M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 355-65.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107-20.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. a, Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., et al. (2014a). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 1-16.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B. and Kroemer, G. (2014b). Metabolic control of autophagy. *Cell* **159**, 1263-1276.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 36-47.
- Georgescu, W., Osseiran, A., Rojec, M., Liu, Y., Bombrun, M., Tang, J. and Costes, S. V (2015). Characterizing the DNA Damage Response by Cell Tracking Algorithms and Cell Features Classification Using High-Content Time-Lapse Analysis. *PLoS One* **10**, e0129438.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**, 1529-42.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 37-43.
- Goodarzi, A. a, Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Löbrich, M. and Jeggo, P. a (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* **31**, 167-77.
- Goodarzi, A. a, Jeggo, P. and Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 1273-82.

- Gorjiara, T., Hill, R., Kuncic, Z., Adamovics, J., Bosi, S., Kim, J.-H. and Baldock, C. (2011). Investigation of radiological properties and water equivalency of PRESAGE® dosimeters. *Med. Phys.* **38**, 2265.
- Gospodinov, A. and Herceg, Z. (2013). Chromatin structure in double strand break repair. *DNA Repair* **12**, 800-810.
- Gräff, J. and Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* **192**, 70-87.
- Gruel, G., Villagrasa, C., Voisin, P., Clairand, I., Benderitter, M., Bottollier-Depois, J.-F. and Barquinero, J. F. (2016). Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition. *PLoS One* **11**, e0145786.
- Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M. K. and Price, B. D. (2015). Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7507-12.
- Hall, E. J. and Giaccia, A. J. (2012). *Radiobiology for the Radiologist*. seventh. (ed. Lippincott Williams & Wilkins) New York.
- Happel, N. and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1-12.
- Hargreaves, D. C. and Crabtree, G. R. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **21**, 396-420.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- Helleday, T., Eshtad, S. and Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 585-598.
- Heo, K., Kim, H., Choi, S. H., Choi, J., Kim, K., Gu, J., Lieber, M. R., Yang, A. S. and An, W. (2008). FACT-Mediated Exchange of Histone Variant H2AX Regulated by Phosphorylation of H2AX and ADP-Ribosylation of Spt16. *Mol. Cell* **30**, 86-97.
- Herceg, Z. and Wang, Z. Q. (2001). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **477**, 97-110.
- Hoefig, K. P., Rath, N., Heinz, G. A., Wolf, C., Dameris, J., Schepers, A., Kremmer, E., Ansel, K. M. and Heissmeyer, V. (2013). Eri1 degrades the stem-loop of oligouridylated histone mRNAs to induce replication-dependent decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 73-81.

- Hsiao, K.-Y. and Mizzen, C. a (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 157-65.
- Huang, L. C., Clarkin, K. C. and Wahl, G. M. (1996). Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4827-4832.
- Huang, L., Snyder, A. R. and Morgan, W. F. (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* **22**, 5848-54.
- Huen, M. S. Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B. and Chen, J. (2007). RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly. *Cell* **131**, 901-914.
- Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S. and Teraoka, H. (2005). Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 807-12.
- ICRP (2007). *ICRP publication 103: Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique.*
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., et al. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7028-40.
- IRSN (2016). *Exposition de la population française aux rayonnements ionisants.* (ed. Nucléaire, I. de R. et de S.).
- Jakob, B., Splinter, J. and Taucher-Scholz, G. (2009a). Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. *Radiat. Res.* **171**, 405-418.
- Jakob, B., Splinter, J., Durante, M. and Taucher-Scholz, G. (2009b). Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3172-7.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jette, N. and Lees-Miller, S. P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **117**, 194-205.
- Jiang, X., Xu, Y. and Price, B. D. (2010). Acetylation of H2AX on lysine 36 plays a key role

- in the DNA double-strand break repair pathway. *FEBS Lett.* **584**, 2926-2930.
- Jin, Z. and El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 139-163.
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. and Lahav, G. (2012). Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* **47**, 320-329.
- Kastan, M. B. and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316-323.
- Kaye, J. A., Melo, J. A., Cheung, S. K., Vaze, M. B., Haber, J. E. and Toczyski, D. P. (2004). DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation. *Curr. Biol.* **14**, 2096-106.
- Kegel, P., Riballo, E., Kühne, M., Jeggo, P. A. and Löbrich, M. (2007). X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)*. **6**, 1692-1697.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-57.
- Kim, J. A., Kruhlak, M., Dotiwala, F., Nussenzweig, A. and Haber, J. E. (2007). Heterochromatin is refractory to γ -H2AX modification in yeast and mammals. *J. Cell Biol.* **178**, 209-218.
- Kim, K. S., Kim, J. E., Choi, K. J., Bae, S. and Kim, D. H. (2014). Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **90**, 71-80.
- Kimura, H., Takizawa, N., Allemand, E., Hori, T., Iborra, F. J., Nozaki, N., Muraki, M., Hagiwara, M., Krainer, A. R., Fukagawa, T., et al. (2006). A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2C γ , mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *J. Cell Biol.* **175**, 389-400.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C. and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5678-5694.
- Kirkland, J. B. (1991). Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *BBA - Mol. Cell Res.* **1092**, 319-325.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular

- degradation. *Science* **290**, 1717-21.
- Koken, M. H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M. K., Sobczak-Thépot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F. and de Thé, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* **10**, 1315-1324.
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-71.
- Kornberg, R. D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 931-54.
- Kornberg, R. D. and Thomas, J. O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**, 865-8.
- Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., Kanaar, R., Franken, N. a P. and Aten, J. a (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Sci.* **125**, 2127-33.
- Krishnan, N., Jeong, D. G., Jung, S., Ryu, S. E., Xiao, A., Allis, C. D., Kim, S. J. and Tonks, N. K. (2009). Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *J. Biol. Chem.* **284**, 16066-70.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V, El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* **16**, 3-11.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P. and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **172**, 823-34.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V and Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 7491-7495.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019-1031.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., Abmayr, S. M., Washburn, M. P. and Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is

- required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**, 2084-7.
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S. W., et al. (2010). Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J. Cell Sci.* **123**, 392-400.
- Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* **3**, 235-253.
- Leatherbarrow, E. L., Harper, J. V, Cucinotta, F. a and O'Neill, P. (2006). Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**, 111-8.
- Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004). Development by Self-Digestion Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463-477.
- Lew, D. J. and Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795-804.
- Li, A., Yu, Y., Lee, S. C., Ishibashi, T., Lees-Miller, S. P. and Ausi??, J. (2010). Phosphorylation of histone H2A.X by DNA-dependent protein kinase is not affected by core histone acetylation, but it alters nucleosome stability and histone H1 binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 17778-17788.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA End joining. *J. Biol. Chem.* **283**, 1-5.
- Linke, S. P., Clarkin, K. C. and Wahl, G. M. (1997). p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res.* **57**, 1171-9.
- Little, J. B. (2000). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**, 397-404.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., Barton, O. and Jeggo, P. A. (2010). γH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669.
- Lorat, Y., Schanz, S., Schuler, N., Wennemuth, G., Rübe, C. and Rübe, C. E. (2012). Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* **7**, e38165.
- Lorat, Y., Brunner, C. U., Schanz, S., Jakob, B., Taucher-Scholz, G. and Rübe, C. E. (2015). Nanoscale analysis of clustered DNA damage after high-LET irradiation by quantitative electron microscopy--the heavy burden to repair. *DNA Repair (Amst)*. **28**, 93-106.

- Luger, K., Mäder, W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Lusser, A. and Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *BioEssays* **25**, 1192-1200.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-94.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C. L., Schwarz, K. and Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol. Cell* **16**, 701-713.
- Malik, H. S. and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882-891.
- Mancias, J. D. and Kimmelman, A. C. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *J. Mol. Biol.* **428**, 1659-80.
- Mannironi, C., Bonner, W. M. and Hatch, C. L. (1989). H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9113-26.
- Martín, M., Terradas, M., Hernández, L. and Genescà, A. (2014). γH2AX foci on apparently intact mitotic chromosomes: Not signatures of misrejoining events but signals of unresolved DNA damage. *Cell cycle* **13**, 3026-36.
- Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J. and Maltais, L. J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* **80**, 487-98.
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J. and Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 843-54.
- Maul, G. G., Yu, E., Ishov, A. M. and Epstein, A. L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J. Cell. Biochem.* **59**, 498-513.
- Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A. and Allis, C. D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 259-271.
- McGhee, J. D. and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1115-56.

- McManus, K. J. and Hendzel, M. J. (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5013-25.
- Millar, C. B. (2013). Organizing the genome with H2A histone variants. *Biochem. J.* **449**, 567-79.
- Miller, K. M. and Jackson, S. P. (2012). Histone marks: repairing DNA breaks within the context of chromatin. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 370-376.
- Misteli, T. and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 243-254.
- Münch, S., Weidtkamp-Peters, S., Klement, K., Grigaravicius, P., Monajembashi, S., Salomoni, P., Pandolfi, P. P., Weißhart, K. and Hemmerich, P. (2014). The tumor suppressor PML specifically accumulates at RPA/Rad51-containing DNA damage repair foci but is nonessential for DNA damage-induced fibroblast senescence. *Mol. Cell Biol.* **34**, 1733-46.
- Muratani, M., Gerlich, D., Janicki, S. M., Gebhard, M., Eils, R. and Spector, D. L. (2002). Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat. Cell Biol.* **4**, 106-110.
- Murr, R., Loizou, J. I., Yang, Y.-G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.-Q. and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **8**, 91-9.
- Muyldermans, S. and Travers, A. A. (1994). DNA sequence organization in chromatosomes. *J. Mol. Biol.* **235**, 855-70.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-16.
- Nazarov, I. B., Smirnova, A. N., Krutilina, R. I., Svetlova, M. P., Solovjeva, L. V., Nikiforov, A. A., Oei, S., Zalenskaya, I. A., Yau, P. M., Bradbury, E. M., et al. (2003). Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiat. Res.* **160**, 309-17.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G. and Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220-228.
- Neumaier, T., Swenson, J., Pham, C., Polyzos, A., Lo, A. T., Yang, P., Dyball, J., Asaithamby, A., Chen, D. J., Bissell, M. J., et al. (2012). Evidence for formation of

- DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 443-8.
- Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T. and Terrissol, M. (1997). Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 467-483.
- Olins, A. L. and Olins, D. E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**, 330-2.
- Olins, D. E. and Olins, A. L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 809-14.
- Orlowski, C., Mah, L.-J., Vasireddy, R. S., El-Osta, A. and Karagiannis, T. C. (2011). Double-strand breaks and the concept of short- and long-term epigenetic memory. *Chromosoma* **120**, 129-49.
- Osley, M. A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 827-61.
- Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300.
- Pan, M. R., Peng, G., Hungs, W. C. and Lin, S. Y. (2011). Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 28599-28607.
- Pandey, N. B. and Marzluff, W. F. (1987). The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4557-4559.
- Panier, S. and Boulton, S. J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 7-18.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-10.
- Polo, S. E., Roche, D. and Almouzni, G. (2006). New Histone Incorporation Marks Sites of UV Repair in Human Cells. *Cell* **127**, 481-493.
- Price, B. D. and D'Andrea, A. D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* **152**, 1344-1354.
- Probst, A. V., Dunleavy, E. and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 192-206.

- R Core Team** (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rai, T. S. and Adams, P. D.** (2012). Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 322-31.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E. P., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W.** (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 162-9.
- Reisz, J. a, Bansal, N., Qian, J., Zhao, W. and Furdai, C. M.** (2014). Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 260-292.
- Richards, E. J. and Elgin, S. C. R.** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Robinson, P. J. J., An, W., Routh, A., Martino, F., Chapman, L., Roeder, R. G. and Rhodes, D.** (2008). 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J. Mol. Biol.* **381**, 816-25.
- Rodier, F. and Campisi, J.** (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547-56.
- Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R. and Campisi, J.** (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* **11**, 973-9.
- Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C. M., Kim, S.-H., et al.** (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* **124**, 68-81.
- Rodríguez, P., Barquinero, J. F., Duran, A., Caballín, M. R., Ribas, M. and Barrios, L.** (2009). Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **670**, 53-58.
- Rodríguez-Vargas, J. M., Ruiz-Magaña, M. J., Ruiz-Ruiz, C., Majuelos-Melguizo, J., Peralta-Leal, A., Rodríguez, M. I., Muñoz-Gámez, J. A., de Almodóvar, M. R., Siles, E., Rivas, A. L., et al.** (2012). ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res.* **22**, 1181-1198.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M.** (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol.*

- Chem.* **273**, 5858-68.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905-16.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. and Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* **275**, 9390-9395.
- Rothkamm, K. and Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5057-62.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L. H., Kru, I. and Lo, M. (2003). Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5706-5715.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. (1999). ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* **18**, 6135-6144.
- Saha, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 437-447.
- Sansoni, V., Casas-Delucchi, C. S., Rajan, M., Schmidt, A., B?nisch, C., Thomae, A. W., Staeger, M. S., Hake, S. B., Cardoso, M. C. and Imhof, A. (2014). The histone variant H2A.Bbd is enriched at sites of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6405-6420.
- Santaguida, S. and Amon, A. (2015). Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 473-85.
- Schones, D. E., Cui, K. and Cuddapah, S. (2011). Genome-wide approaches to studying yeast chromatin modifications. *Methods Mol. Biol.* **759**, 61-71.
- Schulz, L. and Tyler, J. (2005). Heterochromatin focuses on senescence. *Mol. Cell* **17**, 168-70.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602.
- Shaltiel, I. A., Krenning, L., Bruinsma, W. and Medema, R. H. (2015). The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J. Cell Sci.* **128**, 607-20.
- Shang, Z., Yu, L., Lin, Y.-F., Matsunaga, S., Shen, C.-Y. and Chen, B. P. C. (2014). DNA-

- PKcs activates the Chk2-Brca1 pathway during mitosis to ensure chromosomal stability. *Oncogenesis* **3**, e85.
- Shao, Z., Davis, A. J., Fattah, K. R., So, S., Sun, J., Lee, K. J., Harrison, L., Yang, J. and Chen, D. J. (2012). Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. **11**, 310-316.
- Shibata, A. and Jeggo, P. A. (2014). DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin. Oncol.* **26**, 243-249.
- Shibata, A., Barton, O., Noon, A. T., Dahm, K., Deckbar, D., Goodarzi, A. a, Löbrich, M. and Jeggo, P. a (2010). Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3371-3383.
- Shrivastav, M., Miller, C. A., De Haro, L. P., Durant, S. T., Chen, B. P. C., Chen, D. J. and Nickoloff, J. A. (2009). DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **8**, 920-929.
- Singh, I., Ozturk, N., Cordero, J., Mehta, A., Hasan, D., Cosentino, C., Sebastian, C., Krüger, M., Looso, M., Carraro, G., et al. (2015). High mobility group protein-mediated transcription requires DNA damage marker γ -H2AX. *Cell Res.* **25**, 837-50.
- Smerdon, M. J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 422-428.
- Soria, G., Polo, S. E. and Almouzni, G. (2012). Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **46**, 722-734.
- Stein, G. S., Stein, J. L., Van Wijnen, a J. and Lian, J. B. (1996). Transcriptional control of cell cycle progression: the histone gene is a paradigm for the G1/S phase and proliferation/differentiation transitions. *Cell Biol. Int.* **20**, 41-9.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M. and Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res.* **64**, 2390-2396.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strätling, W. H., Müller, U. and Zentgraf, H. (1978). The higher order repeat structure of chromatin is built up of globular particles containing eight nucleosomes. *Exp. Cell Res.* **117**, 301-11.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstine, J. R. and Price,

- B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1376-82.
- Sun, J., Lee, K. J., Davis, A. J. and Chen, D. J. (2012). Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 4936-4945.
- Suzuki, K., Ojima, M., Kodama, S. and Watanabe, M. (2003a). Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene* **22**, 6988-6993.
- Suzuki, K., Yokoyama, S., Waseda, S., Kodama, S. and Watanabe, M. (2003b). Delayed reactivation of p53 in the progeny of cells surviving ionizing radiation. *Cancer Res.* **63**, 936-941.
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M. (2006a). Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.* **165**, 269-276.
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S. and Watanabe, M. (2006b). Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 145-150.
- Svetlova, M., Solovjeva, L., Nishi, K., Nazarov, I., Siino, J. and Tomilin, N. (2007). Elimination of radiation-induced γ -H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 650-654.
- Svetlova, M. P., Solovjeva, L. V and Tomilin, N. V (2010). Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks. *Mutat. Res.* **685**, 54-60.
- Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J. and de Thé, H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* **23**, 2819-2824.
- Talbert, P. B. and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 264-75.
- Talbert, P. B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P. L., Bonner, W. M., Cande, W. Z., Chadwick, B. P., Chan, S. W., et al. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin* **5**, 7.
- Tang, J., Cho, N. W., Cui, G., Manion, E. M., Shanbhag, N. M., Botuyan, M. V., Mer, G. and Greenberg, R. A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 317-25.
- Thatcher, T. H. and Gorovsky, M. A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones

- H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res.* **22**, 174-9.
- Thies, R. L. and Autor, A. P. (1991). Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: Mediation by poly(ADP-ribose) polymerase activation causing NAD depletion and altered energy balance. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 353-363.
- Thompson, L. H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat. Res.* **751**, 158-246.
- Tu, W.-Z., Li, B., Huang, B., Wang, Y., Liu, X.-D., Guan, H., Zhang, S.-M., Tang, Y., Rang, W.-Q. and Zhou, P.-K. (2013). γ H2AX foci formation in the absence of DNA damage: mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway. *FEBS Lett.*
- Tubiana, M. (2008). *Radiobiologie*. (ed. Hermann, E.).
- UNSCEAR 2008 (2010). *SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION*.
- Urbanek, S. (2013). tiff: Read and write TIFF images.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 196-206.
- Varadaraj, A., Dovey, C. L., Laredj, L., Ferguson, B., Alexander, C. E., Lubben, N., Wylie, A. H. and Rich, T. (2007). Evidence for the receipt of DNA damage stimuli by PML nuclear domains. *J. Pathol.* **211**, 471-480.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149.
- Vessoni, a T., Filippi-Chiela, E. C., Menck, C. F. and Lenz, G. (2013). Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ.* **20**, 1444-54.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 385-92.
- Walisser, J. A. and Thies, R. L. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in oxidant-stressed endothelial cells prevents oncosis and permits caspase activation and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **251**, 401-13.
- Walker, J. R., Corpina, R. A. and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-14.
- Ward, J. F. (1988). DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells :

- Identities , Mechanisms of Formation , and Reparability. In *Progress in nucelic acid research and molecular biology*, pp. 95-125.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. (1953).** Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8.
- Wechsler, T., Newman, S. and West, S. C. (2011).** Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature* **471**, 642-646.
- Whitfield, M. L., Zheng, L. X., Baldwin, a, Ohta, T., Hurt, M. M. and Marzluff, W. F. (2000).** Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4188-4198.
- Widom, J. (1998).** Chromatin structure: linking structure to function with histone H1. *Curr. Biol.* **8**, R788-91.
- Wu, R. S. and Bonner, W. M. (1981).** Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **27**, 321-330.
- Wu, R. S., Tsai, S. and Bonner, W. M. (1982).** Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell* **31**, 367-374.
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S. H., Fabrizio, L. a, Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., et al. (2009).** WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* **457**, 57-62.
- Xie, A., Odate, S., Chandramouly, G. and Scully, R. (2010).** H2AX post-translational modifications in the ionizing radiation response and homologous recombination. *Cell Cycle* **9**, 3602-10.
- Xu, Z.-X., Timanova-Atanasova, A., Zhao, R.-X. and Chang, K.-S. (2003).** PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4247-4256.
- Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y. and Price, B. D. (2012).** Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* **48**, 723-33.
- Yamauchi, M., Oka, Y., Yamamoto, M., Niimura, K., Uchida, M., Kodama, S., Watanabe, M., Sekine, I., Yamashita, S. and Suzuki, K. (2008).** Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 405-417.

- Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **12**, 814-22.
- Yao, K. C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S. and Germano, I. M. (2003). Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J. Neurosurg.* **98**, 378-384.
- Yeung, P. L., Denissova, N. G., Nasello, C., Hakhverdyan, Z., Chen, J. D. and Brenneman, M. A. (2012). Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J. Cell. Biochem.* **113**, 1787-1799.
- Yunis, J. J. and Yasmineh, W. G. (1971). Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. *Science* **174**, 1200-1209.
- Zhang, R., Poustovoitov, M. V, Ye, X., Santos, H. a, Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. a, Dunbrack, R. L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* **8**, 19-30.
- Zhou, B. B. and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-9.
- Zhou, J., Lim, C. U., Li, J. J., Cai, L. and Zhang, Y. (2006). The role of NBS1 in the modulation of PIKK family proteins ATM and ATR in the cellular response to DNA damage. *Cancer Lett.* **243**, 9-15.
- Zhu, Q. and Wani, A. A. (2010). Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. *J. Cell. Physiol.* **223**, 283-8.

Annexe :

Publication associée

Article reprenant une partie des résultats et des conclusions de ce travail de thèse et qui a été accepté pour publication dans le journal « Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis » le 11 décembre 2016.

Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells

Aurelie Vaurijoux¹, Pascale Voisin¹, Amelie Freneau¹, Joan Francesc Barquinero² and Gaetan Gruel¹

¹ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Laboratoire de Dosimétrie Biologique, BP 17, 92262 Fontenay aux roses cedex, France.

² Universitat Autònoma de Barcelona, Faculty of Biosciences, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain.

Abstract

Unrepaired DNA double-strand breaks (DSBs) induced by ionizing radiation are associated with lethal effects and genomic instability. After the initial breaks and chromatin destabilization, a set of post-translational modifications of histones occurs, including phosphorylation of serine 139 of histone H2AX (γ H2AX), which leads to the formation of ionizing radiation-induced foci (IRIF). DSB repair results in the disappearance of most IRIF within hours after exposure, although some remain 24 hours after irradiation. Their relation to unrepaired DSBs is generally accepted but still controversial. This study evaluates the frequency and kinetics of persistent IRIF and analyzes their impact on cell proliferation. We observed persistent IRIF up to 7 days postirradiation, and more than 70% of cells exposed to 5 Gy had at least one of these persistent IRIF 24 hours after exposure. Moreover we demonstrated that persistent IRIF did not block cell proliferation definitively. The frequency of IRIF was lower in daughter cells, due to asymmetric distribution of IRIF between some of them. We report a positive association between the presence of IRIF and the likelihood of DNA missegregation. Hence, the structure formed after the passage of a persistent IRI focus across the S and G2 phases may impede the correct segregation of the affected chromosome's sister chromatids. The ensuing abnormal resolution of anaphase might therefore cause the nature of IRIF in daughter-cell nuclei to differ before and after the first cell division. The resulting

atypical chromosomal assembly may be lethal or result in a gene dosage imbalance and possibly enhanced genomic instability, in particular in the daughter cells.

Keywords:

Ionizing radiation, γ H2AX foci, cell division, chromosome break, DNA double strand break.

1. Introduction

DNA damage is a key event in cell response to ionizing radiation, one involving genetic and epigenetic modifications that may affect the homeostasis of healthy tissues in exposed individuals. In particular, DNA double-strand breaks (DSBs) that are incorrectly or not repaired are associated with lethal effects and genomic instability [1]. DSBs trigger activation of phosphatidylinositol-3'-OH kinase-related kinases (PIKK), such as ataxia telangiectasia mutated (ATM) and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK); these, in turn, phosphorylate the histones H2AX located around the break, at serine 139 [2-5]. This phosphorylation of H2AX (γ H2AX) quickly spreads over several megabases on the adjacent chromatin [5,6] and results in the formation of microscopically visible nuclear foci, known as ionizing radiation-induced foci (IRIF). One explanation for this extensive phosphorylation postulates that DSBs cause massive relaxation of chromatin coiling [6]. γ H2AX initiates the formation of a platform to attract and retain proteins, such as Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1), mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), breast cancer susceptibility 1 (BRCA1), and p53-binding protein 1 (53BP1); these lead in turn to the recruitment of DNA damage repair proteins [7-10].

The number of γ H2AX IRIF peaks at 30 minutes after exposure, and most of these IRIF disappear within hours of exposure [5,6]. This disappearance is thought to be related to DSB repair and restoration of chromatin integrity and structure [11,12]. However, some IRIF remain 24 hours after exposure [13], and their association with residual DSBs is generally accepted since DDR proteins are still present within these persistent IRIF [13,14]. Although the nature, role, and consequences of these IRIF are still unclear, some studies suggest that they are involved in the inhibition of G1/S progression [13] but also in radiation-induced cellular senescence and death [15,16].

In this work, we evaluated the kinetics of the appearance and disappearance of γ H2AX and 53BP1 IRIF. We characterized persistent IRIF up to 7 days after exposure to ionizing radiation and evaluated their impact on the resumption of the cell cycle and the division of normal human primary cells irradiated during the G0/G1 phase.

2. Materials and Methods

2.1. Cell cultures and irradiation

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, C2519A, lot. 0000087758) were isolated by Lonza from human tissue (from 3 females and 1 male) donated after permission was obtained for its use in research applications by informed consent or legal authorization. All cells tested negative for mycoplasma, bacteria, yeast, and fungi. Cell lots and donors were tested and negative for HIV-1, hepatitis B, and hepatitis C. The HUVECs were cultured at 37 °C, with 95% humidity and 5% CO₂ in EGM-2 media optimized for the proliferation of endothelial cells and supplemented with 5% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, hEGF, gentamicin, and amphotericin-B (EGM-2MV BulletKit, CC-3202, Lonza). We used HUVEC primary cells at low passages and evaluated their cytogenetic status by M-FISH during passages 2 (P2) and 4 (P4) [17]. No clonal abnormality was observed, and the proportions of males and females obtained by cytogenetic analysis were consistent with the initial cell pools (3 females and 1 male). To obtain cells in G0/G1 phase of the cell cycle at irradiation, we synchronized cells by contact inhibition induced in confluent culture. Subsequently, synchronized cells were seeded on glass in Nunc® Lab-Tek® II chamber slide systems (Thermo Fisher Scientific) for 5 hours before irradiation. The experimental protocol was designed to ensure that the DNA damage took place in cells in G0/G1 (initial synchronization of the cells) but also that nothing other than irradiation could block resumption of the cell cycle. We therefore verified that at 5 hours post-seeding, cells were in G0/G1 and almost all adherent and that the density of seeding would allow future cell growth. An Elekta Synergy Platform (linac accelerator) was used to deliver X-rays with a maximum energy of 4 MeV (4 MVp) at a dose rate of 2.3 Gy·min⁻¹ and with a delivered dose uncertainty rate of 7%. We delivered two different doses: 1 and 5 Gy. Culture media were not renewed after irradiation. To monitor cell proliferation we added 50 μ M 5-bromo-2'deoxyuridine

(BrdU; B-5002, Sigma-Aldrich) to the cell culture medium just after its exposure to X-rays.

2.2. Immunofluorescence staining

Cells were washed with 1X PBS (14190-094, Life Technologies), fixed with 4% paraformaldehyde solution (199431LT, Affymetrix), and permeabilized with 0.5% Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich). The following primary antibodies were used in this study: mouse IgG1 monoclonal anti-phospho-histone H2AX (Ser139) antibody (dilution of 1/800; 05-636, clone JBW301, Upstate), rabbit IgG polyclonal anti-53BP1 antibody (dilution of 1/1000; A300-272A, Bethyl Laboratories), and rat IgG2a monoclonal anti-BrdU antibody (dilution of 1/200; ab6326, clone BU1/75 (ICR1), Abcam). Antibodies were diluted in 1X PBS with 2% (w/v) BSA (bovine serum albumin; A9418, Sigma-Aldrich) and incubated with cells for 1 hour at room temperature (RT). After washing, the following secondary antibodies were used: donkey anti-mouse IgG polyclonal antibody conjugated to FITC (1 mg.ml⁻¹; dilution of 1/100; AP192F, Chemicon), donkey anti-rat IgG polyclonal conjugated to Alexa Fluor® 594 (2 mg.ml⁻¹; dilution of 1/500; A21209, Life Technologies), and goat anti-rabbit IgG polyclonal conjugated to Alexa Fluor® 647 (2 mg.ml⁻¹; dilution of 1/1000; A21245, Life Technologies) or chicken anti-goat IgY polyclonal conjugated to Alexa Fluor® 647 (2 mg.ml⁻¹, dilution of 1/500; A21469, Life Technologies). They were diluted in PBS with 2% BSA and incubated with cells for 1 hour at RT. DNA was stained with DAPI (0.2 µg.ml⁻¹; 1050A, Euromedex) and mounted with ProLong® Antifade Reagents (P36930, Life Technologies). For BrdU labeling, we performed a DNA denaturation step between fixation and permeabilization by incubation for 30 minutes at RT in 1 M HCL (Prolabo).

2.3. Analysis of binucleated cells

To obtain binucleated cells, cytokinesis was blocked with cytochalasin B (0.35 µg.ml⁻¹; c2743, Sigma-Aldrich) and added to culture medium 24 hours after exposure to 5-Gy irradiation. *In situ* immunofluorescence staining was performed 24 hours after cytochalasin B treatment began.

2.4. Image acquisition and analysis

Images were acquired and analyzed with the Scan[^]R platform (Olympus), as described previously [17]. Briefly, images were acquired on an inverted Olympus IX81 fluorescence microscope with a UPLSAPO 100XO oil immersion objective (Olympus) and an NA of 1.4; the microscope was coupled with an Orca R² CCD camera (Hamamatsu) and a motorized SCAN IM IX2 stage (Märzhäuser). Image analysis was performed with Scan[^]R analysis software (Olympus). An edge segmentation algorithm based on Canny's method [18] was used to detect nuclei in the DAPI channel (main object) and γ H2AX foci in the FITC channel (sub-object 1). A first selection based on the area and circularity of the nuclei excluded clusters of cells and cellular debris. Cells were selected in the different phases of the cell cycle by assessing the integrated intensity of the DAPI signal (DNA content) combined with the integrated intensity of the γ H2AX signal in the entire nucleus, which increased dramatically in S phase [17,19].

3. Results

3.1. Characterization of IRIF as a function of time and dose

To investigate the IRIF dynamics induced in G0/G1 phase, we exposed synchronized G0/G1 phase human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to 1 or 5 Gy of 4 MV X-rays and studied IRIF from 10 minutes to 7 days after exposure by monitoring γ H2AX foci. Using automated detection of nuclei and foci, we analyzed a mean of 4,000 cells for each condition so that we could screen subpopulations of cells or foci by different characteristics, such as size, shape, or cell-cycle phase, and weight their representativeness within the entire population of exposed cells. All results presented here concern only cells in the G0/G1 phase of the cell cycle.

The number of γ H2AX IRIF peaked 30 minutes after exposure (Fig. 1A), consistent with previous reports [5,6,20]. By 24 hours after exposure, the frequency of γ H2AX IRIF per nucleus decreased by more than 90% for both doses. Some IRIF nonetheless remained observable, their numbers dose-dependent; we observed 4.6 times more IRIF for the cells exposed to 5 Gy compared with 1 Gy of irradiation: 4.2 ± 0.5 and 0.9 ± 0.2 γ H2AX IRIF per nucleus, respectively (Table 1). By 7 days after exposure to 5 Gy, the mean number of γ H2AX IRIF per nucleus was still 0.8 ± 0.3 , still significantly more than that measured in unirradiated cells (0.4 ± 0.2 per nucleus;

Table 1). Co-immunostaining of γ H2AX and 53BP1 showed nearly invariable co-location between these proteins from 10 minutes to 7 days after exposure (Fig. 2C).

To characterize these γ H2AX/53BP1 IRIF over time, we measured the area of about 100,000 to 460,000 early IRIF (before 24 hours postexposure) and 9,600 to 22,000 persistent IRIF (from 24 hours postexposure). Their area increased as their number per nucleus decreased (Fig. 1). Most early IRIF were small, whereas persistent IRIF were characterized by their larger size (Fig. 1B), in accordance with previous work [13]. Comparison of the distributions of IRIF areas at 30 minutes and 72 hours confirmed this observation. Fig. 2 depicts the two different ranges of size observed for early (Fig. 2A) and persistent (Fig. 2B) IRIF induced specifically by ionizing radiation (i.e., normalized with respect to the corresponding non-irradiated condition). Hence, early IRIF were characterized by an area ranging from 0.2 to 1.3 μm^2 (Fig. 2A) and persistent IRIF by an area greater than 1.1 μm^2 (Fig. 2B). We therefore use these areas as thresholds to study persistent IRIF in the rest of this work and report in Table 1 the frequencies of these IRIF as a function of time since irradiation and dose. A basal rate of foci with size characteristics similar to the persistent IRIF was observed in non-irradiated cells.

At 24 hours after exposure, $12.7\% \pm 3.3\%$ of the cells exposed to 1 Gy irradiation contained at least one persistent IRI focus (Fig. 3), that is, about one fifth of the percentage among 5 Gy irradiated cells: $73.2\% \pm 12.8\%$. These results underline the substantial number of cells affected, especially as only $4.3\% \pm 0.01\%$ of non-irradiated cells contained at least one large γ H2AX focus.

3.2. Persistent IRIF and cell proliferation

We investigated the role of the cell cycle in IRIF behavior. To identify the cells that had completed a full cell cycle, we added BrdU just after irradiation. Fig. 4A and 4B show the cell distribution at different phases of the cell cycle as a function of dose and time. The results for unirradiated cells were consistent with normal HUVEC cell growth in our cell culture conditions. At 24 hours after exposure, the cell cycle had resumed, dose-dependently (Fig. 4A). Consistent with the cell synchronization in the G0/G1 phase at irradiation, the main activated checkpoint was G1/S. The lack of any significant increase in the proportion of cells in G2 at 24

(Fig. 4A) or 48 hours (Fig. 4B) after irradiation suggests that the G2/M checkpoint was not significantly activated in our experimental conditions.

The density of the cell monolayer (Fig. 4C) was consistent with cell cycle resumption between 24 and 48 hours after irradiation. Interestingly, although BrdU-positive cells in G0/G1 accounted for almost half of the cell population exposed to 5 Gy (Fig. 4B), monolayer density did not increase significantly (Fig. 4C). Phase contrast live-cell imaging of synchronized cells exposed to 5 Gy showed that around 45% of cells that reached M phase (when the adherent cells became transiently spherical) died. Of the 157 cells that entered M phase, 86 produced adherent daughter cells, while the other 71 died during this phase. This finding may explain the apparent stability of the cell monolayer density after irradiation with 5 Gy, despite the presence of dividing cells.

At 24 hours after exposure, most of the cells with persistent γ H2AX/53BP1 IRIF were halted in G0/G1, that is, were still BrdU-negative (Fig. 5A). Surprisingly, the situation was reversed at 48 hours: as most of the cells with persistent γ H2AX/53BP1 IRIF were G0/G1 BrdU-positive ($16.7\% \pm 1.3\%$ and $42.3\% \pm 3.6\%$ for 1 and 5 Gy, respectively, see Fig. 5A and B). These results indicate that the presence of persistent IRIF does not permanently prevent cells from progressing through the cell cycle. It is interesting to note that BrdU incorporation significantly increased the frequency of large foci measured in unirradiated cells after cell division; at 48 hours, their frequency of cells with large foci was close to that measured for cells exposed to a 1-Gy dose (Fig 5A). To prevent this from interfering with subsequent measurements, we focused on cells exposed to the 5 Gy dose.

3.3. Transmission of persistent IRIF to daughter cells

To investigate the transmission of persistent IRIF through cell division, we determined its frequency as a function of BrdU labeling and time since exposure. The frequency of persistent IRIF decreased significantly between 24 and 48 hours after exposure, apparently simultaneously with the resumption of cell cycle progression (Figs. 4, 5, and 6A). Interestingly, the frequency of persistent IRIF remained stable over time in each subpopulation of G0/G1 BrdU-negative cells and G0/G1 BrdU-positive cells (Fig. 6A). This finding suggests that cell division, rather than a repair process occurring in G0/G1 after exposure, was primarily responsible

for reducing the frequency of persistent IRIF. These IRIF therefore do not permanently block cell proliferation, which is indeed likely to influence the number of IRIF in the daughter cells. To examine this point in more detail, we analyzed the distribution of G0/G1 BrdU-negative and BrdU-positive cells according to their number of persistent IRIF (Fig. 6B and C). The shape of the distribution in G0/G1 BrdU-negative cells, like the frequency, remained the same between 24 and 48 hours (gray bars in Fig. 6B and C). The proportionately equal decrease for all classes indicates that the number of persistent IRIF per cell did not influence ability to progress through the cell cycle. In addition, the distribution observed for G0/G1 BrdU-positive (compared with G0/G1 BrdU-negative) cells clearly shifted to the classes with fewer IRIF. This result indicates a class change between the mother cell and its daughter cells; daughter cells had fewer persistent IRIF than their mothers. To verify this hypothesis, we blocked cytokinesis with cytochalasin B 48 hours after exposure to 5 Gy. Around half of the binucleated cells had an asymmetric number of persistent IRIF in the daughter nuclei (Fig. 7). Our data thus suggest that the decrease in the frequency of persistent IRIF over time may be linked not to a repair process but rather to a substantially asymmetric distribution of IRIF between daughter cells. Furthermore, this asymmetry suggests that IRIF segregation during anaphase may be abnormal.

To confirm this hypothesis, we analyzed the missegregation events in G0/G1 BrdU positive cells observed at 48 hours after exposure (without cytochalasin B treatment). Among the entire population of G0/G1 BrdU-positive cells, the number of micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in mono- and binucleated cells clearly increased and did so dose-dependently (Table 2). More than 85% of these missegregation events were associated with the presence of a γ H2AX signal, however; this finding suggests that the structure formed after the passage of a persistent IRI focus across the S and G2 phases may impede the correct segregation of the affected chromosome's sister chromatids (Fig. 8 and Table 2).

4. Discussion

Many studies have described the correlation of transient IRIF with DSBs [5,19,21,22]. ATM phosphorylation of histone H2AX on serine 139 near the break, its amplification over megabases around the break and the resulting observation of

nuclear foci have been well described in mammalian cells [6,7,19]. Moreover, this histone modification leads to relaxation of the chromatin architecture, which in turn allows the DNA repair machinery to access the spatially confined region surrounding the break [23-25]. The disappearance of IRIF is generally associated with DSB repair [22] and restoration of the initial chromatin structure [24]. Our data show that, depending on the dose, 5 to 10% of the total IRIF observed at 30 minutes after exposure remain 24 hours after irradiation in 10 to 70% of cells. Relatively few studies have examined the nature and cellular impact of these persistent IRIF. Consistently with the progressive increase of the size of 53BP1 and ATM IRIF reported by Yamauchi *et al* [13], we observed that the area of γ H2AX/53BP1 IRIF increased over time as the frequency of γ H2AX/53BP1 IRIF decreased (Fig. 1). At 72 hours after exposure, persistent γ H2AX IRIF were predominantly large, with areas 2 to 6 times bigger than those measured at 30 minutes (Fig. 2). Some studies suggest that chromatin movement may cause adjacent IRIF to merge, thus contributing to both the reduction of their frequency and their increase in size [26-29]. These observations, however, involved asynchronous cells, in which DSB repair by homologous recombination (HR) can occur when DNA damage is produced during S or G2. In our study, we ensured that DNA damage occurred mainly to cells in G0/G1, thus preventing the use of HR and limiting putative chromatin movements [30]. In this case, persistent γ H2AX IRIF may grow larger over time through the amplification of γ H2AX signals, probably due to persistent ATM presence at their site [13,15,31,32]. The cause of the persistence and amplification of the phosphorylation nonetheless remains unclear. No repair activity appears to take place at the site of these persistent IRIF [33], although several DNA damage signaling proteins, such as 53BP1 (Fig. 2C), MRE11, and NBS1, co-locate there [32-34]. In addition, and consistent with other studies [32-34], we observed that promyelocytic leukemia nuclear bodies were almost invariably associated with these persistent IRIF (data not shown).

Consistently with the results of Yamauchi *et al* [13], a majority of cells with persistent γ H2AX/53BP1 IRIF were halted in G1 until 24 hours after exposure (Fig. 5A). However, analyzing later post-irradiation time points, we observed that this inhibition was not permanent in our model of normal primary endothelial cells (Fig. 4B and 5A). The persistent IRIF analyzed in our study were compatible with cell-

cycle progression and were transmitted to daughter cells: HUVECs irradiated in the G0/G1 phase that had persistent IRIF 24 hours after exposure – and not just a few of them – were able to complete a whole cell cycle. Moreover, the ability of cells to progress through a complete cell cycle did not appear to depend on their number of persistent IRIF: between 24 and 48 hours; the frequency of BrdU-negative cells decreased at the same rate, regardless of their number of persistent IRIF (gray bars in Fig. 6B and C).

These observations raise questions about the real nature of these IRIF. Normal cells, such as primary HUVECs, have active cell-cycle checkpoints able to block the cycle's progression until the resolution of DSBs [35-37]. Thus, if persistent IRIF correspond to a somehow stabilized unrejoined DSB, our observations would seem to indicate that this mechanism failed to detect this structure. Several studies suggest that the G1/S phase checkpoint can be bypassed, despite unrepaired DSBs, particularly if cells are in the late G1 phase during irradiation and have passed a point where they can no longer initiate a global shutdown of the S phase [38]. This hypothesis seems unlikely in our case, as it would mean that this restriction point would have been passed 24 hours before the cells entered the S phase. Moreover, DSBs induced in the G0/G1 phase can also persist after DNA replication, as shown by G2 premature chromosome condensation assays combined with FISH using pantelomeric PNA probes [39]. In this case, the observation of incomplete chromosome elements (chromosome fragments without a telomere signal at each end) demonstrated the presence at G2 phase of unrejoined chromosome breaks from DSBs induced in the G0/G1 phase. Another study reported the presence in G2 phase of chromosome breaks (without discriminating complete from incomplete chromosome elements) and γ H2AX IRIF in fibroblasts irradiated in the G0/G1 phase [40]. On the other hand, the G2/M checkpoint appears to induce a drastic reduction in the rate of incomplete chromosome elements in M-phase cells [39], although the rate of incomplete chromosome elements per cell in M phase remains dose-dependent. The selection that appears to occur during the G2/M transition may be consistent with the difference in the frequency of persistent IRIF observed in our experiments between G0/G1 BrdU-negative cells and G0/G1 BrdU-positive cells (Fig. 6A). However, the absence of any significant arrest in G2 in our model suggests that this mechanism may not apply here (Fig. 4A).

Thus if these incomplete chromosome elements are able to reach cytokinesis, they should be transmitted to daughter cells, as were the persistent IRIF observed in our study. Analyzing metaphase cells, Martin *et al.* reported that persistent IRIF do not seem to co-locate with either telomere-free chromosome ends or misrepaired breaks [41]. It is nonetheless important to note that histone H2AX phosphorylation takes place on serine 139 along the chromosome arms from metaphase to telophase, independently of any DNA damage induced [42-44]. Thus, it appears difficult, or even impossible, to distinguish clearly between the H2AX phosphorylation that occurs normally during M phase and that induced by DDR.

Nevertheless, the asymmetric distribution of persistent IRIF between daughter cells (Fig. 7) suggests that it may be difficult for this structure to segregate correctly during anaphase. The normal distribution of chromosomes between daughter cells is driven by the presence of a centromere that allows sister chromatids to segregate equally in each cell [45,46]. Thus, the structure formed after the passage of a persistent IRI focus across the S and G2 phases may impede the correct segregation of the affected chromosome's sister chromatids. The rate of missegregation associated with the presence of a γ H2AX signal strongly supports this hypothesis (Table 2 and Fig. 8). All these observations suggest that the nature of the IRIF must differ at least slightly before and after the first cell division following exposure. If DNA damage is induced in G0/G1 phase but the cell nonetheless reaches metaphase, the process of chromosome segregation during anaphase may encounter numerous problems, including the conversion of a remaining DSB into chromosome breaks (CRB) (Fig. 9). This transition into CRBs of DSBs induced in the G1 phase and reaching metaphase has been described in yeast where two types of associations may occur: one between the two sides of the DNA break (intrachromosomal association) and the other between sister chromosomal fragments from either side of the DNA break (interchromosomal association) [47]. These two associations lead to a kind of “tug-of-war” between the two spindle poles during the anaphase, which almost always results in co-segregation of the acentric chromosome fragments [47]. According to this model, the persistent IRIF observed after cellular division in our study might correspond to several kinds of atypical chromosomal structures composed of segregated chromatids with

unrejoined DSBs either stabilized or converted into CRBs. These chromosome elements may be included in the cell nucleus or may form micronuclei (Fig. 9).

In conclusion, we observed that cells containing persistent IRIF do not block the cell cycle permanently and that these IRIF can be transmitted to daughter cells. Moreover the asymmetric distribution of persistent IRIF between daughter cells indicates that cell division likely affects the structure signaled by persistent IRIF and may lead to the formation of an atypical chromosomal structure in daughter cells. This atypical chromosomal assembly may be lethal or result in gene dosage imbalance and possibly enhanced genomic instability in daughter cells. The consequences of this phenomenon should be further analyzed, especially as more than 50% of the progeny of cells exposed to 5 Gy of irradiation (10% for 1 Gy) may carry this abnormal structure.

Acknowledgments

The authors would like to thank C. Baldeyron and M. Benderitter for their constructive comments. The authors would also like to thank M. Baumann, Y. Ristic, and L. Van Ryckeghem for performing the radiation exposure with the Elekta Synergy Platform and the related dosimetry. The authors gratefully acknowledge the financial assistance awarded by “Electricité de France” (EDF).

References

- [1] M. Löbrich, P.A. Jeggo, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction., *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 861-9. doi:10.1038/nrc2248.
- [2] S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42462-42467. doi:10.1074/jbc.C100466200.
- [3] T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Löbrich, P.A. Jeggo, ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation, *Cancer Res.* 64 (2004) 2390-2396. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3207.
- [4] C.J. Bakkenist, M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation., *Nature.* 421 (2003) 499-506. doi:10.1038/nature01368.
- [5] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858-68. doi:10.1074/jbc.273.10.5858.
- [6] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, Megabase chromatin domains

- involved in DNA double-strand breaks in vivo., *J. Cell Biol.* 146 (1999) 905-16. doi:10.1083/jcb.146.5.905.
- [7] A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis, Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin., *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 5678-5694. doi:10.1093/nar/gkn550.
 - [8] H. van Attikum, S.M. Gasser, Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response., *Trends Cell Biol.* 19 (2009) 207-17. doi:10.1016/j.tcb.2009.03.001.
 - [9] M. Lisby, R. Rothstein, Choreography of recombination proteins during the DNA damage response, *DNA Repair (Amst).* 8 (2009) 1068-1076. doi:10.1016/j.dnarep.2009.04.007.
 - [10] T.T. Paull, E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, W.M. Bonner, A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage, *Curr. Biol.* 10 (2000) 886-895. doi:10.1016/S0960-9822(00)00610-2.
 - [11] M.C. Keogh, J.A. Kim, M. Downey, J. Fillingham, D. Chowdhury, J.C. Harrison, et al., A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery., *Nature.* 439 (2006) 497-501. doi:10.1038/nature04772.
 - [12] D. Chowdhury, M.C. Keogh, H. Ishii, C.L. Peterson, S. Buratowski, J. Lieberman, gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair., *Mol. Cell.* 20 (2005) 801-809. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.003.
 - [13] M. Yamauchi, Y. Oka, M. Yamamoto, K. Niimura, M. Uchida, S. Kodama, et al., Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling, *DNA Repair (Amst).* 7 (2008) 405-417. doi:10.1016/j.dnarep.2007.11.011.
 - [14] F. d'Adda di Fagagna, P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, et al., A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence., *Nature.* 426 (2003) 194-8. doi:10.1038/nature02118.
 - [15] F. Rodier, J.P. Coppé, C.K. Patil, W.A.M. Hoeijmakers, D.P. Muñoz, S.R. Raza, et al., Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion., *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 973-9. doi:10.1038/ncb1909.
 - [16] S. Yang, C. Kuo, J.E. Bisi, M.K. Kim, PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2., *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 865-870. doi:10.1038/ncb869.
 - [17] G. Gruel, C. Villagrasa, P. Voisin, I. Clairand, M. Benderitter, J.-F. Bottollier-Depois, et al., Cell to Cell Variability of Radiation-Induced Foci: Relation between Observed Damage and Energy Deposition., *PLoS One.* 11 (2016) e0145786. doi:10.1371/journal.pone.0145786.
 - [18] J. Canny, A computational approach to edge detection., *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 8 (1986) 679-98. doi:10.1007/s11263-010-0392-0.
 - [19] M. Löbrich, A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A.A. Goodarzi, et al., γH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization, *Cell Cycle.* 9 (2010) 662-669. doi:10.4161/cc.9.4.10764.
 - [20] S. V Costes, I. Chiolo, J.M. Pluth, M.H. Barcellos-Hoff, B. Jakob, Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization., *Mutat. Res.* 704 (2010) 78-87.

doi:10.1016/j.mrrev.2009.12.006.

- [21] O.A. Sedelnikova, I. Horikawa, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, W.M. Bonner, J.C. Barrett, Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks., *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 168-70. doi:10.1038/ncb1095.
- [22] K. Rothkamm, M. Löbrich, Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5057-62. doi:10.1073/pnas.0830918100.
- [23] T. Misteli, E. Soutoglou, The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 243-254. doi:10.1038/nrm2651.
- [24] G. Soria, S.E. Polo, G. Almouzni, Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response, *Mol. Cell.* 46 (2012) 722-734. doi:10.1016/j.molcel.2012.06.002.
- [25] B.D. Price, A.D. D'Andrea, Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks, *Cell.* 152 (2013) 1344-1354. doi:10.1016/j.cell.2013.02.011.
- [26] B. Jakob, J. Splinter, M. Durante, G. Taucher-Scholz, Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 3172-7. doi:10.1073/pnas.0810987106.
- [27] W. Georgescu, A. Osseiran, M. Rojec, Y. Liu, M. Bombrun, J. Tang, et al., Characterizing the DNA Damage Response by Cell Tracking Algorithms and Cell Features Classification Using High-Content Time-Lapse Analysis., *PLoS One.* 10 (2015) e0129438. doi:10.1371/journal.pone.0129438.
- [28] I. Chiolo, A. Minoda, S.U. Colmenares, A. Polyzos, S. V Costes, G.H. Karpen, Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair., *Cell.* 144 (2011) 732-44. doi:10.1016/j.cell.2011.02.012.
- [29] M.J. Kruhlak, A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W.G. Müller, J.G. McNally, et al., Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks., *J. Cell Biol.* 172 (2006) 823-34. doi:10.1083/jcb.200510015.
- [30] E. Soutoglou, J.F. Dorn, K. Sengupta, M. Jasin, A. Nussenzweig, T. Ried, et al., Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells., *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 675-82. doi:10.1038/ncb1591.
- [31] M. Suzuki, K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe, Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation., *Radiat. Res.* 165 (2006) 269-276. doi:10.1667/RR3508.1.
- [32] G. Dellaire, R.W. Ching, K. Ahmed, F. Jalali, K.C.K. Tse, R.G. Bristow, et al., Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR, *J. Cell Biol.* 175 (2006) 55-66. doi:10.1083/jcb.200604009.
- [33] F. Rodier, D.P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, et al., DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion., *J. Cell Sci.* 124 (2011) 68-81. doi:10.1242/jcs.071340.
- [34] R. Carbone, M. Pearson, S. Minucci, P.G. Pelicci, PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage., *Oncogene.* 21 (2002) 1633-1640. doi:10.1038/sj.onc.1205227.

- [35] G.K. Dasika, S.C. Lin, S. Zhao, P. Sung, A. Tomkinson, E.Y. Lee, DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis., *Oncogene*. 18 (1999) 7883-99. doi:10.1038/sj.onc.1203283.
- [36] B.B. Zhou, S.J. Elledge, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective., *Nature*. 408 (2000) 433-9. doi:10.1038/35044005.
- [37] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection., *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001) 196-206. doi:10.1038/35056049.
- [38] K.L. Cann, G.G. Hicks, Absence of an immediate G1/S checkpoint in primary MEFs following gamma-irradiation identifies a novel checkpoint switch., *Cell Cycle*. 5 (2006) 1823-30. doi:10.4161/cc.5.16.3009.
- [39] P. Rodríguez, J.F. Barquinero, A. Duran, M.R. Caballín, M. Ribas, L. Barrios, Cells bearing chromosome aberrations lacking one telomere are selectively blocked at the G2/M checkpoint, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 670 (2009) 53-58. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.07.003.
- [40] D. Deckbar, T. Stiff, B. Koch, C. Reis, M. Löbrich, P.A. Jeggo, The limitations of the G1-S checkpoint, *Cancer Res.* 70 (2010) 4412-4421. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3198.
- [41] M. Martín, M. Terradas, L. Hernández, A. Genescà, γ H2AX foci on apparently intact mitotic chromosomes: Not signatures of misrejoining events but signals of unresolved DNA damage., *Cell Cycle*. 13 (2014) 3026-36. doi:10.4161/15384101.2014.947786.
- [42] K.J. McManus, M.J. Hendzel, ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells., *Mol. Biol. Cell*. 16 (2005) 5013-25. doi:10.1091/mbc.E05-01-0065.
- [43] Y. Ichijima, R. Sakasai, N. Okita, K. Asahina, S. Mizutani, H. Teraoka, Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 807-12. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.164.
- [44] V. Turinetto, C. Giachino, Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 2489-98. doi:10.1093/nar/gkv061.
- [45] J. Zhou, J. Yao, H.C. Joshi, Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint., *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3547-3555. doi:10.1242/jcs.00029.
- [46] A. Musacchio, E.D. Salmon, The spindle-assembly checkpoint in space and time., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 379-93. doi:10.1038/nrm2163.
- [47] J.A. Kaye, J.A. Melo, S.K. Cheung, M.B. Vaze, J.E. Haber, D.P. Toczyski, DNA breaks promote genomic instability by impeding proper chromosome segregation., *Curr. Biol.* 14 (2004) 2096-106. doi:10.1016/j.cub.2004.10.051.

Figures

Fig. 1

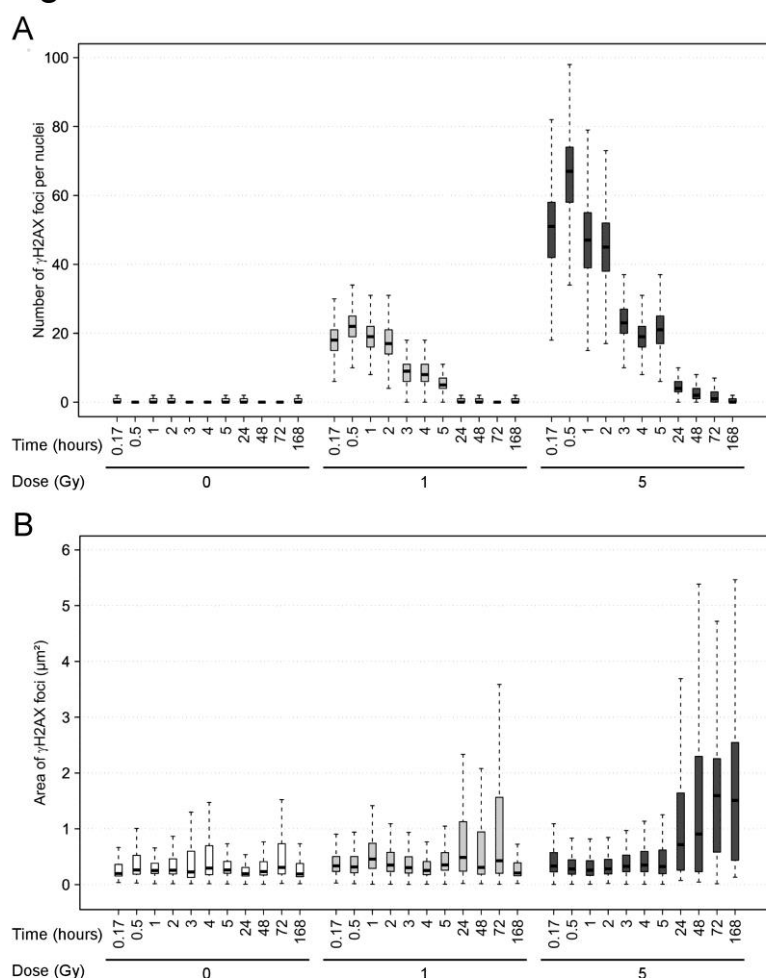


Fig. 1. Numbers and areas of γ H2AX foci in G0/G1 primary HUVECs as a function of time after irradiation by 1 Gy (light gray boxes), 5 Gy (dark gray boxes), and in non-irradiated cells (white boxes). Box-and-whisker plots of (A) the number of γ H2AX foci per nucleus, and (B) their corresponding areas. Bold black bars of boxplots correspond to medians. The lower and upper borders of the box correspond to the first and third quartiles, respectively, and the upper and lower whiskers to 1.5 times the interquartile distance. The numbers of γ H2AX foci per nuclei and their respective areas were evaluated with image analysis software on around 3,000 cells for each post-irradiation time, corresponding to one representative experiment. The number of γ H2AX IRIF peaked 30 minutes post-exposure. The area of γ H2AX IRIF increased as the number per nucleus decreased. Most early γ H2AX IRIF (before 24 hours after exposure) were small, but persistent IRIF were characterized by a larger size.

Fig. 2

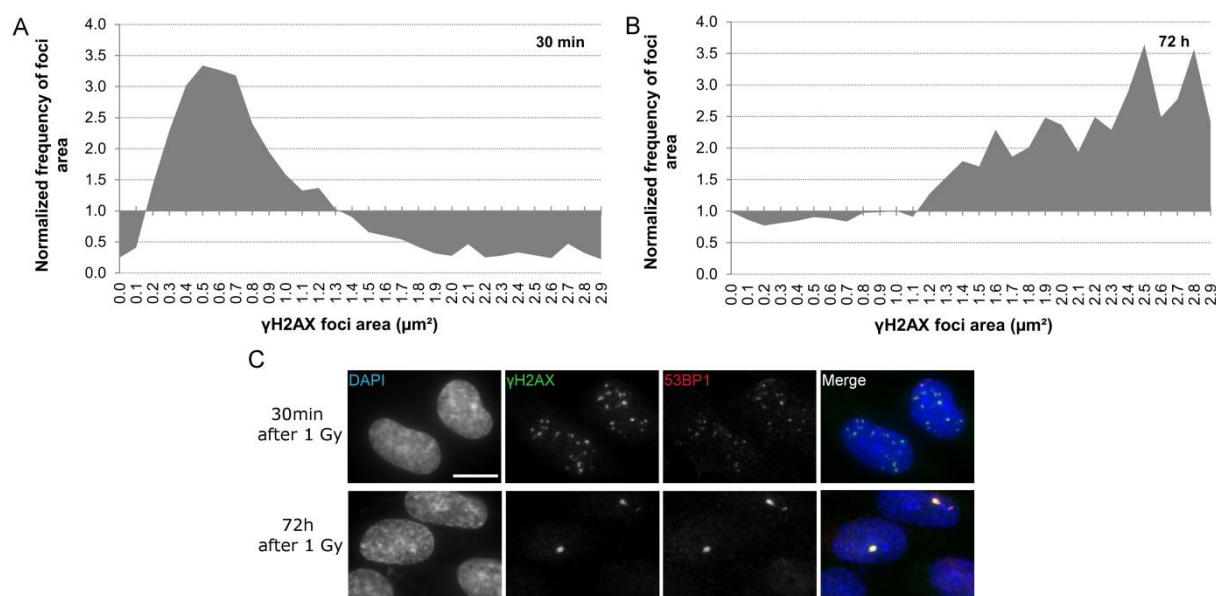


Fig. 2. Distribution of IRIF area in G0/G1 cells after X-ray exposure at 1 Gy. Frequencies of γ H2AX foci area at (A) 30 minutes and (B) 72 hours after irradiation were normalized relative to the corresponding non-irradiated condition to define the different ranges of size observed for early and persistent IRIF. Because spontaneous foci are also present in irradiated cells, to focus only on the size of IRIF (foci induced by irradiation), we normalized them, that is, calculated a ratio (irradiated versus control) of the frequency of each class of the size distribution. The results shown are obtained by pooling the data of 5 experiments and correspond to the analysis of the distribution of size of about 460,000 IRIF at 30 minutes and 21,000 IRIF at 72 hours after irradiation. Early IRIF were characterized by an area ranging from 0.2 to 1.3 μm^2 and persistent IRIF by an area greater than 1.1 μm^2 . (C) Representative pictures of the co-labeling by immunofluorescence of γ H2AX (FITC) and 53BP1 (Alexa Fluor® 594) corresponding to early (upper panel, 30 min) and persistent (lower panel, 72 h) IRIF in HUVECs. DNA was stained with DAPI. We observed co-localization of γ H2AX and 53BP1 IRIF for both early and persistent IRIF. Scale bar corresponds to 10 μm .

Fig. 3

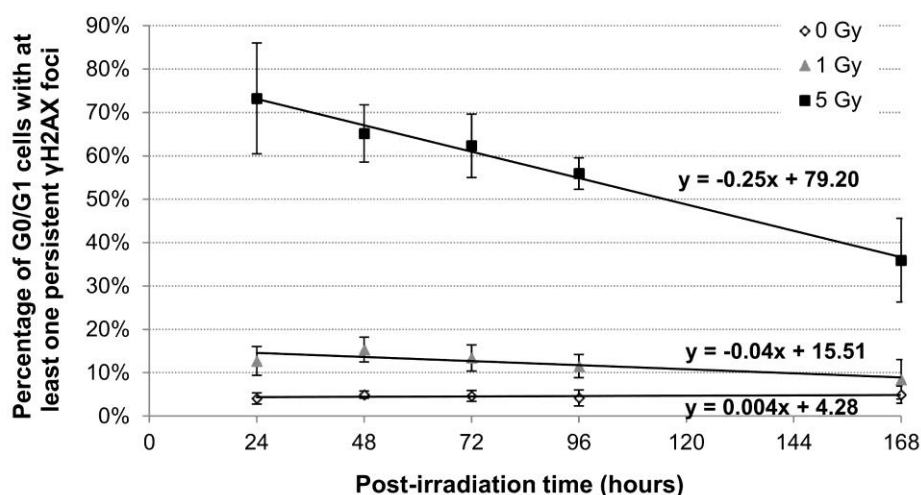


Fig. 3. The proportion of G0/G1 cells with at least one persistent IRI focus as a function of time since exposure. The analyses were performed on cells exposed to irradiation of 1 Gy (light gray triangles) and 5 Gy (dark gray squares) and on unirradiated cells (white diamonds). The mean percentages of cells with at least one persistent γ H2AX focus $\pm$ standard error (s.e.) were calculated from at least 5 experiments. For each condition, the average number of analyzed cells ranged from about 1,300 to 11,000. The decrease in the percentage of cells with persistent IRIF was more pronounced for those irradiated by 5 Gy, compared with 1 Gy, about 6% per 24 hours for 5 Gy and only 1% per 24 hours for 1 Gy.

Fig. 4

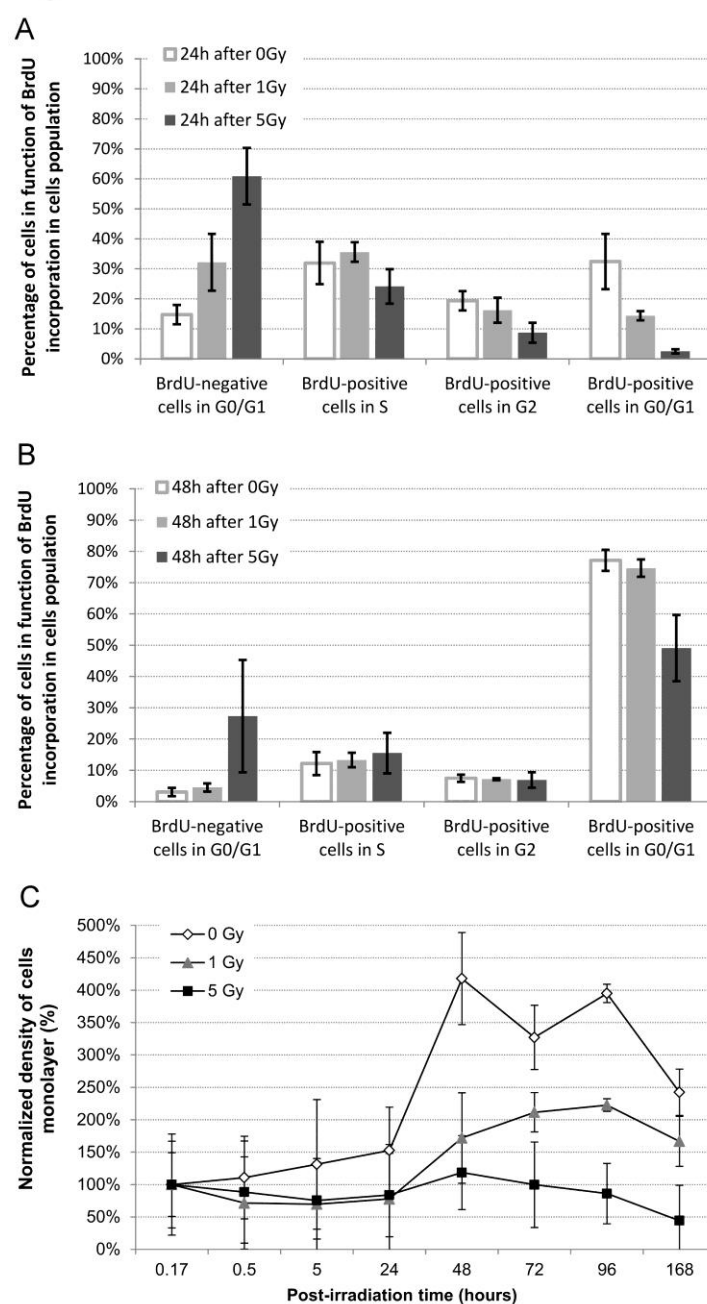


Fig.4. Persistent IRIF and cell proliferation. (A-B) To study the evolution of cell division after irradiation, we added BrdU just after exposure. Cells in the different phases of the cell cycle were selected by assessment of the integrated intensity of the DAPI signal (DNA content) combined with the integrated intensity of γ H2AX signal in the entire nucleus (S phase). Percentages of cells in each phase of the cell cycle were measured at 24 hours (A) and 48 hours after irradiation (B) on unirradiated cells (white bars) and on cells exposed to 1 Gy (light gray bars) and 5 Gy (dark gray bars). The mean percentages $\pm$ s.e. were calculated from the results of 5 experiments, with an average of about 3,000 cells analyzed per condition. (C) The density of the cell monolayer was evaluated at different time points after exposure for unirradiated cells (white diamonds) and for cells exposed to 1 Gy (light gray triangles) and 5 Gy (dark gray squares). The cell monolayer density was measured by counting of the number of nuclei per cm^2 observed at different time points

after exposure. These measurements were performed on around 5,000 images per condition. The percentages were calculated for each condition with respect to the density measured 10 min after exposure. The percentages and error bars correspond to the calculation of means and standard errors based on 4 experiments.

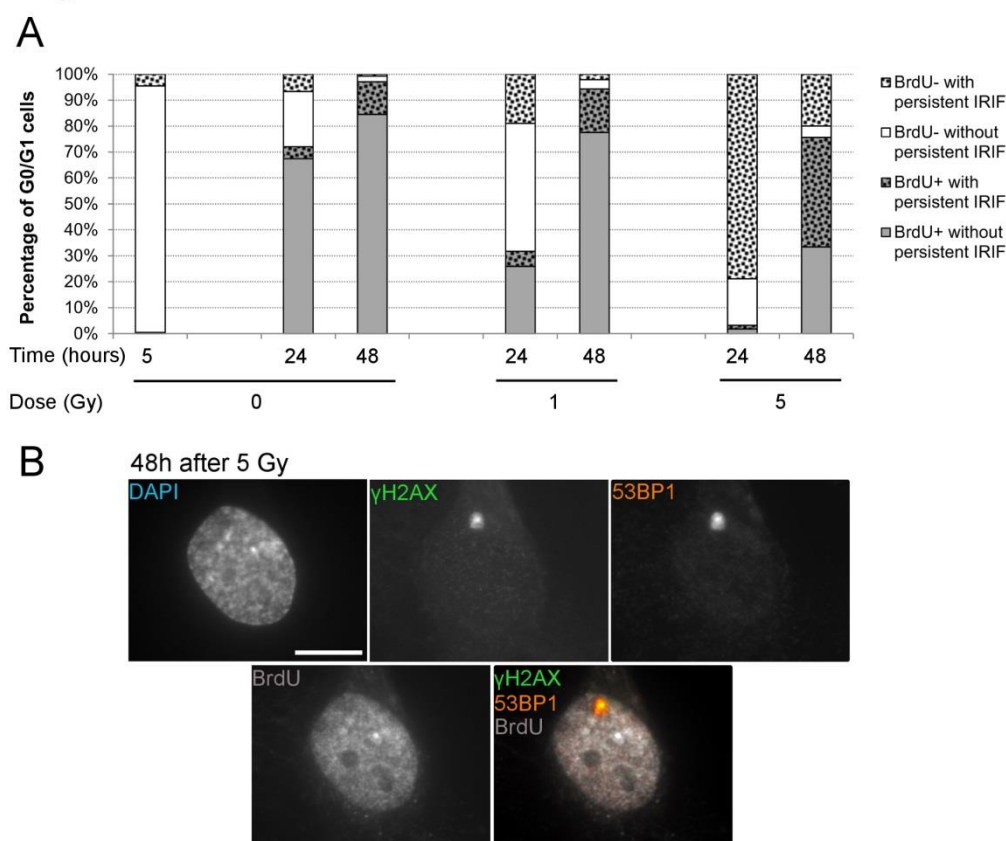
Fig. 5

Fig. 5. Persistent IRIF do not permanently block cell proliferation. To recognize cells that had completed a full cell cycle since irradiation, we added BrdU just after exposure and considered only G0/G1 cells. (A) Histograms of the proportion of G0/G1 cells as a function of BrdU incorporation (BrdU+ in light gray and BrdU- in white) and presence (dotted) or not (empty) of persistent IRIF. The percentages were calculated for unirradiated cells, respectively 5, 24 and 48 hours after the addition of BrdU, and for irradiated cells, respectively, 24 and 48 hours after exposure to 1 and 5 Gy and the addition of BrdU. The mean percentages were calculated from the results of 3 experiments, with an average of about 3,000 cells analyzed per condition. (B) Representative pictures of the co-labeling by immunofluorescence of γ H2AX, BrdU, and 53BP1 performed 48 hours after 5-Gy irradiation, using primary antibodies against γ H2AX, BrdU, and 53BP1, detected respectively by secondary antibodies conjugated to FITC, Alexa Fluor® 594, and Alexa Fluor® 647. DNA was stained with DAPI. Persistent γ H2AX/53BP1 IRIF were observed in G0/G1 BrdU-positive cells. Scale bar corresponds to 10 μ m.

Fig. 6

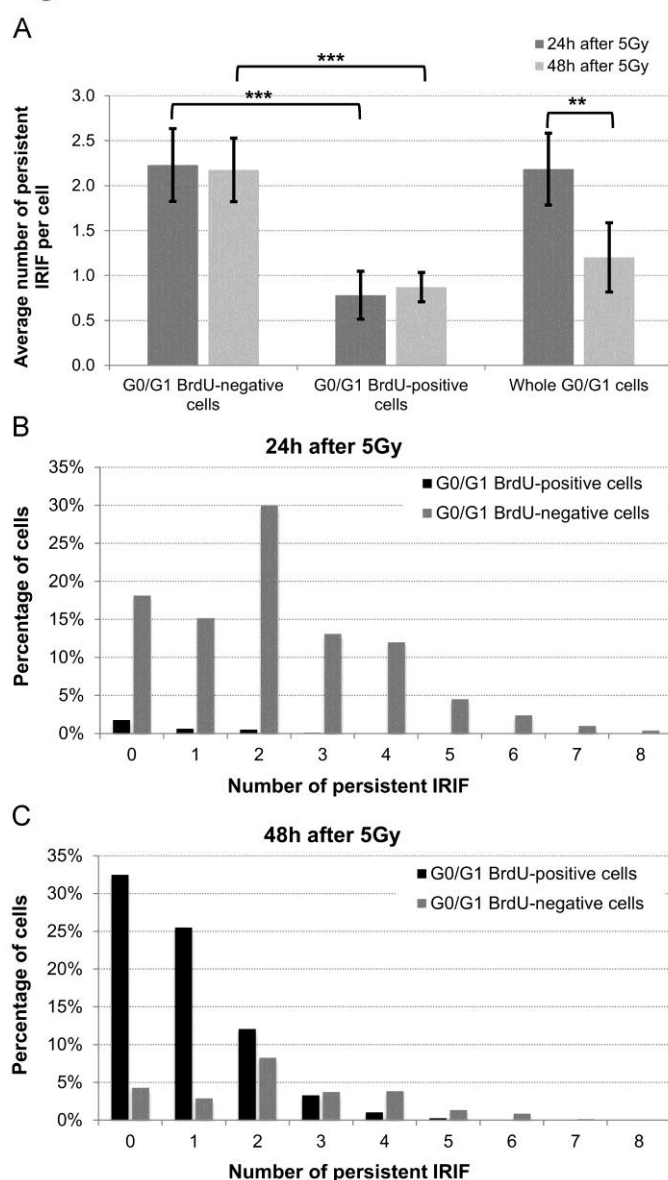


Fig. 6. Average numbers and distribution of persistent IRIF per cell in G0/G1 BrdU-positive and BrdU-negative cells. We evaluated the number of persistent γ H2AX IRIF in G0/G1 BrdU-positive versus G0/G1 BrdU-negative cells in the G0/G1 phase. (A) Average number of persistent IRIF per cell analyzed 24 hours (dark gray bars) and 48 hours (light gray bars) after exposure to 5 Gy of X-rays. The frequency of persistent IRIF remained stable over time in each subpopulation of G0/G1 BrdU-negative cells and G0/G1 BrdU-positive cells. The reduced frequency of persistent IRIF appears to be associated mainly with cell division rather than time since exposure. The mean number $\pm$ s.e. was calculated from the results of 3 experiments; for each condition the average number of analyzed cells ranged from about 3,000 to 14,000. Student's test: ** $\alpha < 0.025$ and *** $\alpha < 0.01$. (B-C) Percentages of cells with each number of persistent IRIF were calculated in G0/G1 BrdU-positive (black bars) and G0/G1 BrdU-negative (gray bars) cells at (B) 24 hours and (C) 48 hours after exposure to 5 Gy irradiation. The shape of the distribution observed in G0/G1 BrdU-negative cells (gray bars) remained the same at (B) 24 hours and (C) 48 hours. The proportionately equal decrease for all classes indicated that all had the same ability to go

through the cell cycle regardless of the number of persistent IRIF per cell. The distribution observed for G0/G1 BrdU-positive cells shifted to lower classes (i.e., cells with fewer IRIF) compared to G0/G1 BrdU-negative cells. This result indicates a class change between the mother and daughter cells; the daughter cells have fewer persistent IRIF than the mother. Percentages were calculated after pooling the data from 3 independent experiments corresponding to analysis of 3,000 to 14,000 cells, depending on the cell subpopulation (BrdU⁺ or BrdU⁻) and time since exposure.

Fig. 7

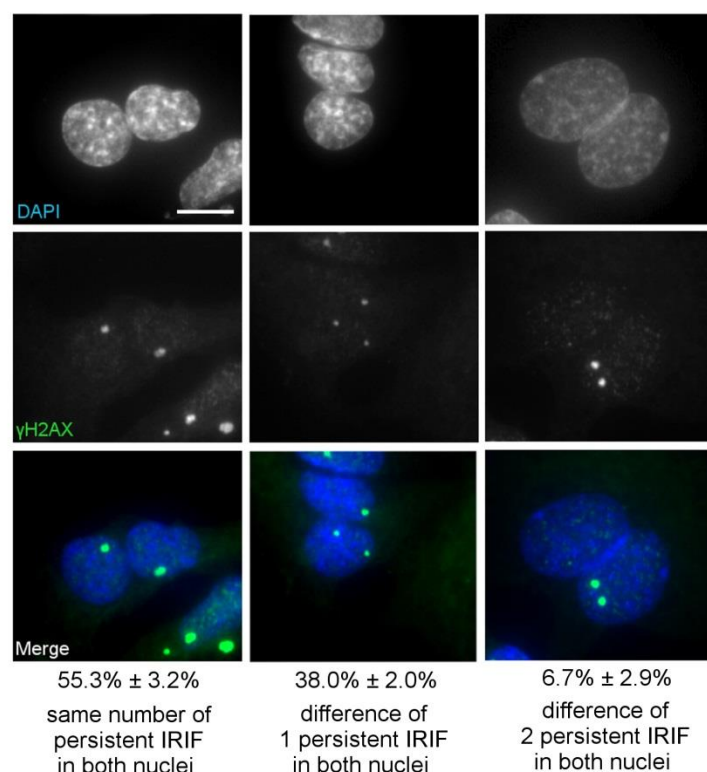


Fig. 7. Distribution of persistent IRIF between daughter cells. At 48 hours after exposure to 5 Gy, we blocked cytokinesis by adding cytochalasin B to cell culture medium; 24 hours later, we immunostained the cells with an antibody against γ H2AX and stained the DNA with DAPI. Representative pictures of the immunofluorescence labeling of γ H2AX of binucleated cells with a difference of 0 (left panel), 1 (middle panel), and 2 (right panel) persistent IRIF between the two daughter nuclei. Scale bar corresponds to 10 μ m. The percentage of binucleated cell with a difference of 0, 1, or 2 persistent IRIF between the two daughter nuclei was estimated from 3 independent experiments (around 100 binucleated cells for each). Around half of the binucleated cells had an asymmetric number of persistent IRIF in the daughter nuclei.

Fig. 8

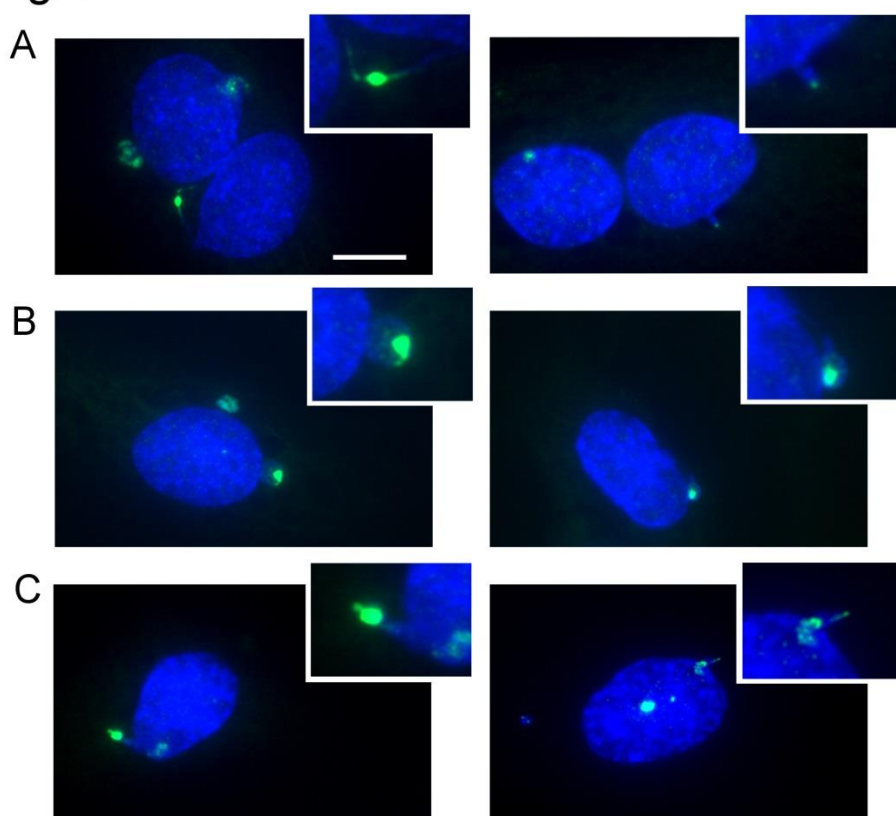


Fig. 8. Persistent IRIF induce missegregation phenotypes in BrdU-positive cells. Representative pictures of BrdU-positive cells with different kinds of missegregation observed 48 hours after irradiation, with primary antibodies against γ H2AX and BrdU (not shown), detected respectively by secondary antibodies conjugated to FITC and Alexa Fluor® 594. DNA was stained with DAPI. (A) binucleated cells including a micronucleus and a nucleoplasmic bridge or a broken nucleoplasmic bridge with a γ H2AX signal. (B) G0/G1 cells including a micronucleus with a γ H2AX signal. (C) G0/G1 cells including a broken nucleoplasmic bridge with a γ H2AX signal. Scale bar corresponds to 10 μ m.

Fig. 9

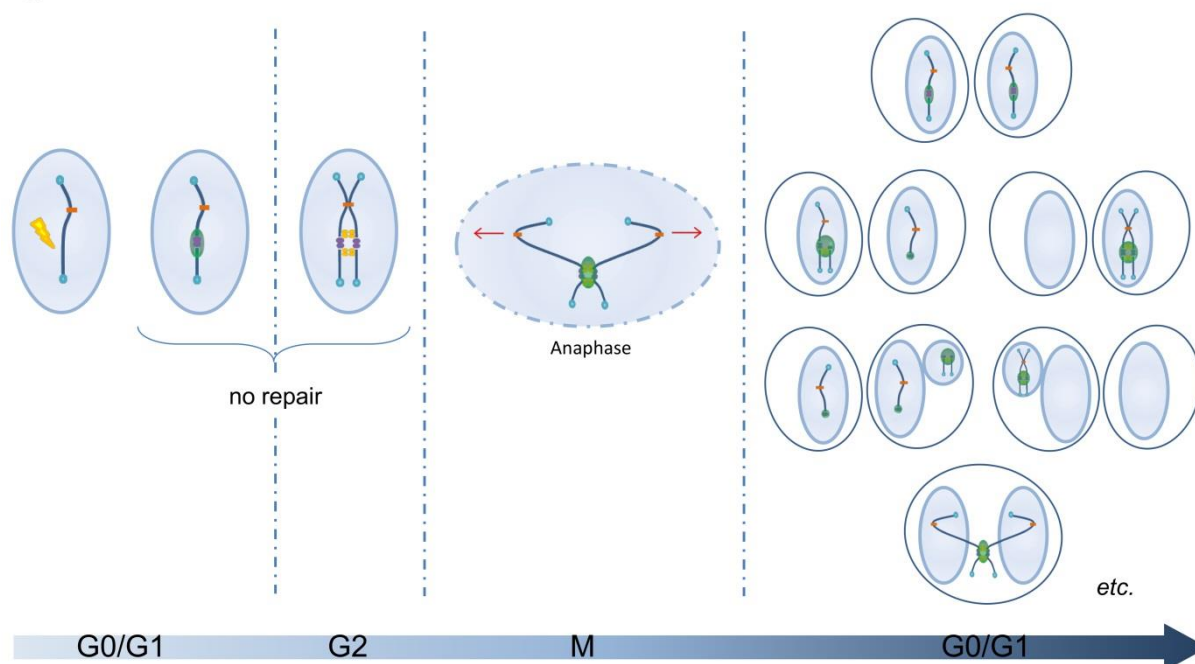


Fig. 9. Model of inheritance of one persistent IRIF based on the hypothesis of an unrepaired DSB. The two broken ends of a DSB are maintained close by non-homologous end-joining repair proteins (intrachromosomal association; purple circles). After DNA replication, association between sister chromosomal fragments from either side of the DNA break can occur (interchromosomal association; orange circles) [47]. The structure formed after the passage of a persistent IRI focus across the S and G2 phases may impede the correct segregation of affected chromosome's sister chromatids. Consequently, the nature of IRIF in the nucleus of daughter cells might differ before and after the first cell division. Thus, the IRIF observed in daughter cells might correspond to several atypical chromosomal structures resulting from abnormal anaphase resolution.

Table 1. Frequency of γ H2AX foci in G0/G1 cells exposed to X-rays

	Radiation dose	Time after exposure				
		24h	48h	72h	96h	168h
Frequency of γ H2AX foci per cell ^a	0Gy	0.27	0.22	0.26	0.25	0.39
	1Gy	0.86**	0.48***	0.45	0.52	0.59
	5Gy	4.22***	2.23***	1.67***	1.33**	0.84*
Frequency of large γ H2AX foci per cell ^a	0Gy	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	1Gy	0.23*	0.19**	0.16**	0.13**	0.10
	5Gy	2.02**	1.34***	1.19***	0.97***	0.53**

^a Values represent means calculated on five experiments (about 1 300 to 11 000 cells by condition)

Value significantly different of unirradiated cells using Student T-test with:

* $\alpha < 0.05$, or ** $\alpha < 0.01$, or *** $\alpha < 0.001$

Table 2. Frequency of cells with micronuclei and/or nucleoplasmic bridges in G0/G1 BrdU-positive cells

Radiation dose	All cells ^a	Cells with γ H2AX signal ^{a, b}	Cells without γ H2AX signal ^a
0Gy	9.1% $\pm$ 1.0%	59.6% $\pm$ 17.8%	40.4% $\pm$ 17.8%
1Gy	23.4% $\pm$ 3.6%	85.7% $\pm$ 0.8%	14.3% $\pm$ 0.8%
5Gy	78.0% $\pm$ 4.5%	86.5% $\pm$ 1.4%	13.5% $\pm$ 1.4%

^a Values represent means and s.e. calculated on three experiments (around 700 cells by condition)

^b Corresponding to γ H2AX signal observed in nuclei, micronuclei or nucleoplasmic bridges

Titre : Etude des conséquences génétiques et épigénétiques consécutives à la signalisation persistante des dommages radio-induits de l'ADN

Mots clés : Rayonnements ionisants, cassures double-brin, foyers γ H2AX, division cellulaire, corps nucléaires PML

Résumé : Les cassures double-brin de l'ADN (CDB) sont des événements clés dans la réponse aux rayonnements ionisants qui, avec le profil génétique et épigénétique individuel, peuvent conditionner le devenir des tissus sains d'un individu exposé. À la suite des cassures de la molécule d'ADN et de la déstabilisation de la chromatine, une série de modifications post-traductionnelles des histones se produit, notamment la phosphorylation de la serine 139 de l'histone H2A.X (γ H2A.X), conduisant à la formation de foyers radio-induits. La réparation des CDB, et donc la disparition de ces foyers, a lieu dans les heures suivant l'exposition. Toutefois, une certaine proportion de ces foyers γ H2A.X persiste 24 heures après l'irradiation. La nature et le rôle de ces foyers persistants sont encore peu clairs. L'objectif de ce travail a été d'explorer les caractéristiques de ces foyers persistants et leurs conséquences sur le devenir des cellules. Pour cela, nous avons évalué la fréquence et la cinétique des foyers persistants et analysé leur association temporelle de la protéine 53BP1 et les corps nucléaires PML (CN-PML). L'impact des foyers persistants sur la prolifération cellulaire a également été exploré. L'analyse par microscopie à fluorescence d'un grand nombre d'événements nous a permis de discriminer des sous-populations de cellules ou de foyers sur la base de différentes caractéristiques, telles que leur aire ou la phase du cycle cellulaire, et de mesurer leur représentativité dans l'ensemble de la population de cellules exposées. Ainsi, nous avons déterminé que plus de

70% des cellules exposées à 5 Gy ont au moins un foyer persistant 24 heures après l'exposition. De plus, ces foyers persistants sont observables au moins jusqu'à 7 jours après l'irradiation. Une association spatiale significative entre les CN-PML et les foyers γ H2A.X a été observée à partir de 10 minutes après l'exposition et 24 heures après l'exposition, environ 90% des foyers persistants sont associés à un CN-PML. De plus, la présence de foyers persistants ne bloque pas définitivement la prolifération des cellules. Cependant, la fréquence des foyers persistants est plus faible dans les cellules filles que dans les cellules irradiées, probablement en raison d'une certaine proportion de distribution asymétrique des foyers persistants entre les cellules filles. Nous avons également mesuré une corrélation positive entre la présence d'un foyer persistant et la probabilité de mauvaise ségrégation de l'ADN par l'observation de phénomènes de catastrophes mitotiques. Il semble donc que la structure formée après le passage d'un foyer persistant à travers les phases S et G2 soit susceptible d'empêcher la séparation correcte des chromatides sœurs du chromosome affecté. Nous suggérons donc que la nature des foyers persistants n'est pas la même avant et après la première division cellulaire due à une résolution anormale de l'anaphase. Ces assemblages chromosomiques atypiques résultants d'anaphases anormales pourraient être létaux pour la cellule ou entraîner un déséquilibre du dosage génique et une instabilité génomique accrue pouvant conduire à une mosaïque de phénotypes cellulaires.

Title : Study of genetic and epigenetic consequences consecutive to the persistent signaling of radiation-induced DNA damage

Keywords : Ionizing radiation, DNA double strand breaks, γ H2AX foci, cell division, Promyelocytic leukemia nuclear bodies

Abstract: The DNA double-stranded breaks (DSB) are key events in the cell response to ionizing radiation that may affect, with the individual genetic and epigenetic profile, the fate of healthy tissues of people exposed. Following initial breaks and chromatin destabilization, a set of post-translational modifications of histones occurs, including the phosphorylation of serine 139 of histone H2AX (γ H2A.X), which leads to the formation of ionizing radiation-induced foci (IRIF). DSB repair results in the disappearance of most IRIF within hours after exposure. However, a proportion of IRIF remains 24 hours upon irradiation. The nature and role of these persistent IRIF are still unclear. The goal of this work is to explore the characteristics of these persistent IRIF and their consequences on the cell behavior. To investigate the dynamic of IRIF in our model, we evaluated the frequency and kinetics of persistent IRIF and analyzed their temporal association with 53BP1 protein and Promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML NBs) and their impact on cell proliferation. The analysis of a large number of cells and foci allowed us to screen subpopulations of cells or foci through different characteristics, such as size, shape or cell cycle phase among others, and to weight their representativeness in the whole population of exposed cells.

We identified that more than 70% of cells exposed to 5 Gy had at least one persistent IRIF 24 hours after exposure and we observed these persistent IRIF up to 7 days post irradiation. A significant spatial association between PML NBs and IRIF was observed from 10 minutes after exposure; at 24h post irradiation, around 90% of persistent IRIF were associated with PML NBs. Moreover we demonstrated that persistent IRIF did not block cell proliferation definitively. The frequency of IRIF was lower in daughter cells, probably due to a certain amount of asymmetric distribution of IRIF between them. We report a positive association between the presence of an IRIF and the likelihood of DNA missegregation by observation of mitotic catastrophes. Hence, the structure formed after the passage of a persistent IRIF across the S and G2 phases may impede the correct segregation of sister chromatids of the chromosome affected. Consequently, the nature of IRIF in the nucleus of daughter cells might differ before and after the first cell division due to an abnormal resolution of anaphase. The resulting atypical chromosomal assembly may be lethal or result in a gene dosage imbalance and possible enhanced genomic instability, and could lead to a patchwork of cell phenotypes.

