

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 7242 - Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

THÈSE

présentée par :

Eric MOEGLIN

soutenue le **11 décembre 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire - Biotechnologie

Ciblage de la Réponse aux Dommages à l'ADN avec des Nanobodies

THÈSE dirigée par :

M. WEISS Etienne

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES:

Mme MIREY Gladys

Directrice de recherche, INRAE, Toulouse

M. WEBER Wilfried

Professor, University of Freiburg

EXAMINATEUR INTERNE :

Mme FOURNEL Sylvie

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Intervention Chemobiologique » de l'UMR-7242 – Biotechnologie et Signalisation Cellulaire. Les travaux présentés dans cette thèse ont été soutenus par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, par la Ligue Contre le Cancer ainsi que par le groupement européen Eucor.

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Etienne Weiss, pour son accueil au sein de notre équipe ainsi que son encadrement durant ma thèse et mes années de Master. Etienne, je te remercie très sincèrement pour ta disponibilité, ta pédagogie, ton soutien, ta confiance ainsi que pour les très nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Je te remercie également pour la liberté que tu m'as accordée dans la conduite de mon projet de thèse, j'ai énormément appris à tes côtés.

Je tiens à remercier le Dr. Gladys Mirey et le Pr. Wilfried Weber, rapporteurs, ainsi que le Pr. Sylvie Fournel, examinatrice, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Je remercie également mes proches collaborateurs : Audrey, merci d'avoir partagé tes connaissances avec moi, merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et disponibilité. Nadja, ce fut un plaisir de partager ces années de thèse en ta compagnie. Merci pour ton aide, ta positivité, ton soutien et tous les bons moments que nous avons pu passer ensemble, je te souhaite le meilleur pour la suite. Dominique, merci pour vos précieux conseils qui m'ont permis de réaliser les travaux présentés dans ce manuscrit. Merci enfin à Guy et Manuela pour leur soutien et les nombreux échanges que nous avons pu avoir.

Merci également à Christian Massute, Jeremy Ranniger et Barbara Di Ventura du groupe « Molecular and Cellular Engineering » du Centre d'Etudes de Signalisation Biologique de l'université de Freiburg avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer lors du développement du système LEXY

J'adresse également un remerciement à tous les membres de notre unité, la liste est trop longue pour pouvoir tous vous nommer, mais merci pour votre aide, votre soutien et votre sympathie, j'ai pu, grâce à vous, passer de formidables années au sein de cette unité.

Je remercie le Dr. Christian Gaidon ainsi que le Dr. Pierre Lafaye pour avoir évalué mes travaux de thèse à mi-parcours.

Merci au Dr. Mustapha Oulad-Abdelghani, au Dr Sascha Conic ainsi qu'au Pr. Pascal Didier pour leur accueil ainsi que pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de ce travail.

Je remercie mes proches et ma famille pour leur soutien et leur accompagnement pendant toutes ces années. Je tiens en particulier à remercier mon oncle Christian pour son aide précieuse. Merci également à Eric, Fabien, Ludovic, Nicolas, Philippe et Pierre, les membres de Lumia, la construction de ce projet en votre compagnie m'a permis de me ressourcer et de décompresser. Merci Didier pour le partage de tes connaissances rythmiques ainsi que de ton humanité.

Merci Mélusine d'être à mes côtés, merci pour ton accompagnement, ta patience et ton soutien tout cela est très précieux pour moi.

Enfin, je dédie ce travail de thèse à mon père, Gilles. Tu es parti trop tôt mais je n'y serai pas parvenu sans ton soutien. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir rendu possible cet accomplissement, je ne t'oublie pas.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Abréviations	9
Liste des figures	13
Liste des tables	21
Préambule	23
Introduction	25
1 La division cellulaire	27
1.1 Le cycle cellulaire	27
1.2 La réplication de l'ADN	29
1.2.1 Le réplisome	30
1.2.1.1 Le complexe pré-réplicatif	31
1.2.1.2 Le complexe de pré-initiation	31
1.2.1.3 L'initiation de la réplication	31
1.2.2 L'organisation temporo-spatiale de la réplication	33
2 Stress réplicatif et dommages à l'ADN	34
2.1 Le stress réplicatif dans le contexte des cellules cancéreuses	35
2.1.1 Stress réplicatif endogène	36
2.1.2 Stress réplicatif exogène	36
2.1.2.1 Les traitements génotoxiques	37
2.2.1.1 Les inhibiteurs de la Ribonucléotide réductase (RnR)	38
2.2.1.1 Les analogues de nucléotides	39
2.2.1.1 Les Inhibiteurs de la topoisomérase I	40
2.2.1.1 Les inhibiteurs de la topoisomérase II	40
2.2.1.1 Les sels de platine	41
2.2.1.1 Les agents alkylants	41
2.2.1.1 Les inhibiteurs de la réponse aux dommages à l'ADN	41
2.2.1.1 Les radiations ionisantes	43
2.2 Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN	43
2.2.1 La réponse au stress réplicatif (RSR)	44
2.2.1.1 L'importance de RPA pour la protection du génome	46
2.2.2 La réparation des CDBs	46
2.2.2.1 La jonction d'extrémités non-homologues	46
2.2.2.2 La recombinaison homologue	47
2.2.2.3 Le choix de la voie de réparation des CDBs	48
2.2.3 Les autres mécanismes de réparation	49
2.2.3.1 Réparation par excision de base (BER)	49
2.2.3.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)	50
2.2.3.3 Synthèse translésionnelle	50
2.3 L'évaluation de la génotoxicité	51
3 L'histone H2AX	53

3.1	L'organisation de la chromatine	53
3.2	H2AX, variant de l'histone H2A	54
3.2.1	Les modifications post-traductionnelles de H2AX (Figure 12)	55
3.3	γ -H2AX et la réponse aux dommages à l'ADN (Figure 13)	57
3.3.1	La phosphorylation de H2AX dans le contexte des CDBs	57
3.3.2	La phosphorylation de H2AX lors du stress réplicatif	60
3.4	L'utilisation de γ -H2AX comme biomarqueur	60
3.4.1	L'utilisation de γ -H2AX comme marqueur pour évaluer la génotoxicité	61
3.4.2	γ -H2AX : un marqueur pour le stress réplicatif létal ?	62
4	Les outils pour la détection des modifications post-traductionnelles	64
4.1	Les anticorps :	64
4.1.1	Structure des anticorps	64
4.1.1.1	Le domaine immunoglobuline	64
4.1.1.2	La chaîne lourde des anticorps	65
4.1.1.3	La chaîne légère des anticorps	65
4.1.1.4	L'association des anticorps en hétérotétramères	65
4.1.1.5	Les fragments dérivés des anticorps	66
4.1.5.1	Le fragment Fab	66
4.1.5.1	Le fragment Fc	67
4.1.2	L'organisation génique et la diversité des domaines variables	67
4.1.2.1	Les loci des immunoglobulines	67
4.1.2.2	La diversité des domaines variables	67
4.2.2.1	La recombinaison V(D)J	68
4.2.2.1	La maturation d'affinité	70
4.1.2.3	Les domaines constants	71
4.1.3	Les anticorps dans la réponse immunitaire	72
4.1.4	Les anticorps en recherche et en thérapeutique	72
4.1.4.1	Les anticorps en recherche	72
4.4.1.1	Les anticorps polyclonaux et monoclonaux	73
4.4.1.1	Le ciblage intracellulaire avec des anticorps	73
4.1.4.1.1	Le format ScFv (Single-chain variable fragment)	73
4.1.4.1.2	La vectorisation	74
4.1.4.2	Les anticorps en thérapeutique	74
4.2	Les nanobodies	75
4.2.1	Les spécificités des anticorps à chaîne lourde	75
4.2.1.1	Les résidus hydrophiles de la région FR2	76
4.2.1.2	Les CDRs	76
4.2.1.3	Le pont disulfure intra-chaîne supplémentaire	77
4.2.2	Le locus H des camélidés	77
4.2.3	Intérêt des VHHs	78
4.3	Développement de VHHs contre une nouvelle cible	80
4.3.1	Création d'une banque de phages	80
4.3.2	La sélection par phage-display	81
4.3.3	La production des VHHs	82
4.3.4	Application des VHHs en recherche	82
4.3.4.1	Les chromobodies	82
4.3.4.2	L'utilisation des VHHs pour la cristallographie	83

4.3.5	Application des VHHs en clinique	83
4.3.5.1	Imagerie <i>in vivo</i>	84
4.3.5.2	Stratégies thérapeutiques	84
4.3.5.3	Études cliniques et nanobodies commercialisés	85
	Objectifs de la thèse	87
	Matériels et Méthodes	89
1	Clonage moléculaire	91
1.1	Vecteurs d'expression utilisés	91
1.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :	91
1.3	Digestion et ligation :	91
1.4	Transformation des bactéries :	92
1.4.1	Transformation CaCl ₂ et choc thermique :	92
1.4.2	Electroporation :	92
1.4.3	Antibiotiques :	93
1.5	Préparations ADN	93
1.5.1	Minipréparations	93
1.5.2	Midipréparations	93
1.6	Présentations des différents clonages réalisés	94
1.6.1	Insertion du Tag E6 dans le plasmide p β -Actin-VHHC6 -eGFP	94
1.6.2	Création du C6 bivalent (C6B) :	95
1.6.3	Remplacement de l'eGFP par la mCherry	96
1.6.4	Chromatibody bivalent et bispécifique :	97
1.6.4.1	Chromatibody bivalent :	97
1.6.5	Le chromatibody bispécifique : Hybride Chromatibody/C6 :	98
1.6.6	Intégration des séquences NES et NLS	98
1.6.6.1	Intégration des séquences NES	98
1.6.6.2	Intégration d'une séquence NLS dans la construction C6B NES	99
1.6.7	Mutation des résidus du CDR3 du VHH C6	100
1.6.8	Intégration de cystéines dans la séquence du VHH C6	102
2	Test ELISA	103
2.1	Test ELISA par compétition	104
3	Production des VHHs	104
3.1	Transformation des bactérie <i>E.coli</i> BL-21 et induction de l'expression	104
3.2	Lyse des bactéries	105
3.3	Chromatographie d'affinité	105
3.4	Chromatographie d'exclusion de taille	105
3.5	Concentration et stockage	106
4	Conjugaison des VHHs avec des fluorochromes	106
4.1	Fluorochromes activés avec un groupement NHS	106
4.2	Fluorochromes activés avec un groupement Maléimide	106
4.2.1	Production	106
4.2.2	Marquage	107
4.3	Analyse du degré de marquage (Degree of Labeling, D.O.L.)	107
5	Culture cellulaire	108
5.1	Généralités	108
5.2	Traitements	108
5.2.1	L'induction de γ -H2AX	109

5.3	Transfection	110
5.4	Transduction	110
5.5	Évaluation de la survie cellulaire	111
5.5.1	Mesure de la densité cellulaire	111
5.5.2	Tests clonogéniques	111
6	Microscopie	112
6.1	Généralités	112
6.2	Immunofluorescence	112
6.3	Evaluation des interaction VHH-antigène avec le tampon CSK	113
6.3.1	Principe :	113
6.3.2	Composition du tampon CSK	114
6.3.3	Protocole	114
6.4	Quantification de l'intensité nucléaire	115
	Etude de la relation entre le stress répliatif et la formation de γ-H2AX	117
1	Introduction	119
2	Article n°1	120
3	Conclusions	152
	Génération d'un nanobody et d'une stratégie optogénétique pour le suivi de γ-H2AX dans les cellules vivantes	155
1	Introduction	157
2	Article n°2	159
3	Résultats complémentaires	213
3.1	Caractérisation initiale des VHHs	213
3.1.1	Séquences des VHHs isolés	213
3.1.2	Test ELISA	214
3.1.3	Immunofluorescence	215
3.1.4	Transduction	216
3.1.5	Transfection	217
3.1.6	Extraction avec le tampon CSK	218
3.1.7	Conclusions	218
3.2	Caractérisation du VHH C6 bivalent (C6B)	218
3.2.1	Purification	218
3.2.2	Test ELISA	219
3.2.2.1	Test ELISA par compétition	220
3.2.3	Immunofluorescence	221
3.2.4	Caractérisation <i>in cellulo</i> :	223
3.2.4.1	Transduction	223
3.2.4.2	Transfection	225
3.2.5	Conclusions	226
3.3	Témoin positif pour la liaison à un antigène nucléaire : le Chromatibody	226
3.3.1	Le Chromatibody monovalent	226
3.3.2	Le Chromatibody bivalent	227
3.3.3	Le Chromatibody bispécifique	228
3.4	Témoin négatif pour la liaison à γ -H2AX : les mutants du VHH C6.	230
3.4.1	Mutations de la région CDR3	230
3.4.2	Purification des VHHs C6 mutés	231
3.4.3	Caractérisation des mutants par test ELISA	232

3.4.4	Evaluation de la solubilité après transfection dans les cellules	233
3.4.5	Résonance plasmonique de surface	233
3.4.6	Le VHH C6 muté bivalent (C6BM1)	233
3.4.6.1	Purification	233
3.4.6.2	Caractérisation par ELISA	234
3.4.6.3	Immunofluorescence	234
3.4.6.4	Caractérisation <i>in cellulo</i>	236
3.4.7	Bilan de la caractérisation du VHH C6BM1	236
3.5	L'export nucléaire constitutif	236
3.5.1	Insertion de la séquence NES PKI α :	237
3.5.2	Ajout d'une séquence NLS	239
3.5.3	Conclusions	240
3.6	Le système LEXY	241
3.6.1	Description	241
3.6.1.1	Observations avec le système C6B-LEXY	242
3.6.1.2	Perméabilisation des cellules exprimant le système C6B-LEXY	243
3.6.1.2.1	Influence du temps de fixation	244
3.6.1.3	Observations avec le système NLS-C6B-LEXY	246
3.6.1.4	Conclusions	248
3.7	Marquage du VHH C6 pour l'imagerie temps réel	248
3.7.1	Conjugaison du VHH C6B avec des Alexa-488-NHS	248
3.7.2	Conjugaison du VHH C6B avec des Alexa-488-maléimide	249
3.7.3	Conjugaison du VHH C6B avec des Sulfo-Cyanine3-maléimide	250
4	Conclusions	251
Quantification de γ-H2AX pour évaluer la létalité de traitements génotoxiques		253
1	Introduction	255
2	Utilisation du VHH C6 pour la détection <i>in vitro</i> de γ -H2AX en une étape	255
2.1	Test du marquage du C6 monovalent avec le protocole MLB	255
2.2	L'importance de la bivalence pour la détection des foci de γ -H2AX	258
2.3	VHH C6B fusionné à la mCherry comme alternative au VHH C6B marqué	260
2.4	Conclusions	261
3	Criblage de produits génotoxiques	262
3.1	Mises au point initiales	262
3.1.1	Transformation logarithmique	262
3.1.2	Détermination des concentrations létales	263
3.1.3	Persistance de γ -H2AX	264
3.1.4	Liste des traitements utilisés	266
3.2	Evaluation de la survie cellulaire : tests de clonogénicité	266
3.2.1	H1299 :	267
3.2.2	U2-OS :	268
3.3	Acquisition du signal γ -H2AX	268
3.3.1	Protocole suivi	268
3.3.2	Induction de γ -H2AX dans les cellules H1299	269
3.3.2.1	Signal γ -H2AX à 24 h	269
3.3.2.2	Signal γ -H2AX à 48 h	270

3.2.2.1	Comparaison des valeurs obtenues avec le VHH C6B marqué et l'anticorps 3F4.	271
3.3.3	Induction de γ -H2AX dans les cellules U2-OS	271
3.3.3.1	Signal γ -H2AX à 24 h	272
3.3.3.2	Signal γ -H2AX à 48 h	273
3.4	Détermination d'un seuil de γ -H2AX	273
3.4.1	Cellules H1299	274
3.4.2	Cellules U2-OS	275
4	Conclusions	277
	Discussion et perspectives	281
1	La phosphorylation de H2AX provoquée par le stress réplicatif	283
1.1	γ -H2AX comme marqueur pour la détection du stress réplicatif létal	284
1.1.1	La protéine p53 et l'induction de γ -H2AX	285
1.1.2	Conclusions	285
1.2	La dynamique de la phosphorylation de H2AX	286
2	Génération d'un VHH dirigé contre γ -H2AX	287
2.1	La génération de VHHs dirigés contre un peptide linéaire phosphorylé	288
2.2	L'accumulation nucléaire des VHHs	288
2.3	La bivalence et l'équilibre subtil entre sensibilité et aspécificité.	289
2.4	La visualisation de γ -H2AX <i>in cellulo</i>	289
2.4.1	La relocalisation des VHHs avec le système LEXY	290
2.5	Perspectives d'utilisation du VHH C6	291
	Conclusion générale	293
	Références bibliographiques	295

Abréviations

« h » : Heure	CDR : Complementarity Determining Region
« min » : Minute	CDT : Chromatin licensing and DNA replication factor
53BP1 : p53 Binding Protein 1	Chk : Checkpoint kinase
9-1-1 : Rad9-Hus1-Rad1	CIS : Cisplatine
A : AZD-7762 (Chk1i)	CMG : CDC45-MCM-GINS
ADC : Antibody Drug Conjugates	CMV : Cytomegalovirus
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity	CPT : Camptothécine
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	CRM1 : Chromosomal Maintenance 1
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase	CSK : Cytoskeletal (buffer)
APC : Anaphase Promoting Complex	D.O.L : Degree Of Labelling (degré de marquage)
ARN : Acide RiboNucléique	DAPI : 4',6'-diamino-2phenyl-indole
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated	DDK : DBF4-dependent kinase
ATP : Adénosine TriPhosphate	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein	DMF : N,N-dimethylformamide
ATRIP : ATR Interacting Protein	DMSO : DiMéthylSulfOxyde
BER : Base Excision Repair (Réparation par excision de base)	DNA-PKc : DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit
BLM : Bloom syndrome protein	dNTP : déoxynucléotides triphosphate
BRCA : Breast cancer (gene)	DO : Densité Optique
BSA : Bovine Serum Albumin	DR5 : Death Receptor 5
C : Clofarabine	EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid
CAR : Chimeric Antigen Receptor	EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor
Cb : Chromatibody	EGTA : Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CDB : Cassure double brin d'ADN	
CDC : Cell Division Cycle protein	
CDK : Cyclin Dependant Kinase	

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPI : Epirubicine

ETAA1 : Ewing's Tumor-Associated Antigen 1

ETO : Etoposide

EYA : Eyes Absent

FCS : Foetal Calf Serum

FEN1 : Flap Endonuclease 1

FR : Framework

G : Gemcitabine

GFP : Green Fluorescent Protein ; **eGFP** : enhanced Green Fluorescent Protein

GG-NER : Global Genome NER

GINS : Go-Ichi-Ni-San

HA : Hémagglutinine

HcAb : anticorps à chaînes lourdes

HEPES : N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HR : Homologous Recombination

HRP : HorseRadish Peroxidase

HU : Hydroxyurée

IF : ImmunoFluorescence

IgNAR : New Antigen Receptor

kDa : KiloDalton

LB : Lysogeny Broth

LOV2 : Light Oxygen Voltage

MCM : Minichromosome Maintenance

MDC-1 : Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1

MLB : Maleimide Labeling Buffer

MPT : Modification post-traductionnelle

MRN : MRE11-Rad50-NBS1

MWCO : Molecular Weight Cut-Off

N-EM : N-éthylmaléimide

NER : Nucleotide Excision Repair (Réparation par excision de nucléotide)

NES : Nuclear Export Signal

NHEJ : Non Homologous End Joining (Jonction d'extrémités non-homologues)

NHS : N-Hydroxysuccinimide

NLS : Nuclear Localization Signal

NSCLC : Non Small Cells Lung Cancer

O/N : Overnight

ORC : Origin Recognition Complex

OXA : Oxaliplatine

PARP : Poly-ADP-Ribose polymerase

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCNA : Proliferating Cells Nuclear Antigen

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PE : Plating Efficiency

PFA : ParaFormAldehyde

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinases

PLK : Polo-Like Kinase

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

PNK : Polynucleotide Kinase

PPP : PhosphoProtein Phosphatase

RAG : Recombination-Activating Gene

RB : Rétinoblastome

RDA : Réponse aux Dommages à l'ADN

RFC : Replication Factor C

RNF : Ring Finger Protein

RnR : Ribonucléotide Réductase

ROI : Region Of Interest

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives de l'Oxygène)

RPA : Replication Protein A

RSR : Réponse au Stress Réplicatif

RSS : Recombination Signal Sequence

RT : Room Temperature (température ambiante)

ScFv : Single-chain variable fragment

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SF : Surviving Fraction

ssDNA: Single Strand DNA (ADN simple brin)

T : Triapine

TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride

TC-NER: Transcription Coupled NER

TdT: Terminal deoxynucleotidyl-Transferase

TFIIH: Transcription Factor IIH

TGF: Tumor Growth Factor

TLS : Translesion Synthesis (Synthèse translésionnelle)

TopBP1: DNA topoisomerase 2-binding protein 1

UBC : Ubiquitin-Conjugating enzyme

USP : Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase

UV : Ultraviolet

V : VE-821 (ATRi)

VEGFR2: Vascular Epidermal Growth Factor Receptor 2

VHH : domaine variable des anticorps à chaînes lourdes

VIH : Virus de L'immunodéficience Humaine

WRN : Werner syndrome ATP-dependent helicase

WSTF : Williams–Beuren syndrome Transcription Factor

XLF : XRCC4 Like Factor

XPC: Xeroderma Pigmentosum type C

XRCC4: X-ray Repair Cross-Complementing protein 4

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu du cycle cellulaire et de sa régulation par l'activité des complexes cyclines-CDKs. Adapté de Otto & Sicinski, 2017

Figure 2 : Représentation schématique de l'assemblage du réplisome. (A) Formation du complexe pré-répliatif. (B) Formation du complexe de pré-initiation. (C) Initiation de la réplication. Adapté de Fragkos et al., 2015.

Figure 3 : Modèle de l'organisation d'une fourche de réplication. Illustration de Lujan et al., 2016.

Figure 4 : Représentation du stress répliatif. (A) Progression d'une fourche de réplication en absence de stress répliatif. (B) Exposition d'ADN simple brin lors du stress répliatif. (C) Effondrement de la fourche de réplication

Figure 5 : Représentation schématique de facteurs à l'origine du stress répliatif. Adapté de Zeman & Cimprich, 2014

Figure 6 : Illustration du dépassement des capacités de réparation des cellules cancéreuses par ajout d'un stress répliatif exogène. Adapté de Zhang et al., 2016

Figure 7 : La réponse au stress répliatif. (A) Reconnaissance de l'ADN simple Brin par la protéine RPA. (B) Recrutement d'ATR. (C) Activation d'ATR. (D) Les substrats d'ATR. (E) La régulation du cycle cellulaire par Chk1

Figure 8 : Réparation des CDBs par Jonction des extrémités non homologues. (A) Recrutement de l'hétérodimère Ku 70/80 au niveau des CDBs. (B) Recrutement des facteurs de la NHEJ. (C) Ligation des brins d'ADN par l'ADN-ligase IV. (D) Complexe dissocié et brins d'ADN ligués. Adapté de Blackford & Jackson, 2017

Figure 9 : Réparation des CDBs par recombinaison homologue. (A) Recrutement du complexe MRN en association avec ATM sur la CDB. (B) Phosphorylation par ATM. (C) Résection de l'ADN et recrutement de RPA. (D) Remplacement de RPA par Rad51. (E) Recherche de séquence homologue. (F) Synthèse d'ADN et ligation. Adapté de Wright et al., 2018

Figure 10 Les mécanismes favorisant la réparation des CDB par NHEJ ou HR

Figure 11 : Le nucléosome et la fibre de 10 nm. bp = paire de bases

Figure 12 : Vue d'ensemble des modifications post-traductionnelles de H2AX et des processus dans lesquels elles sont impliquées

Figure 13 : Le rôle de H2AX dans la réparation des cassures double-brin d'ADN

Figure 14 : Phosphorylation de H2AX en réponse au stress répliatif

Figure 15 : Les principales techniques utilisées pour la détection et la quantification de γ -H2AX in vitro. Des références d'études ayant mis en œuvre les différentes techniques sont indiquées

Figure 16 : Description du marquage pan-nucléaire associé au stress répliatif létal dans la littérature

Figure 17 : Structure cristallographique d'un domaine immunoglobuline variable (gauche,

domaine variable de la chaîne lourde du Fab 388, PDBid 5i1a) et d'un domaine immunoglobuline constant (droite, domaine constant de la chaîne légère du Fab 5844, PDBid 5i18). Illustration provenant de Chiu et al., 2019

Figure 18 : Structure d'un anticorps (A) Schématisation d'un domaine immunoglobuline et de son assemblage en chaîne lourde ou légère. (B) Représentation de l'assemblage hétérotétramérique formant un anticorps

Figure 19 : Fragments d'anticorps issus de la digestion à la pepsine ou à la papaïne

Figure 20 : Les locus IG humains, adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012. Chr : Chromosome ; L : séquence leader ; V : domaine variable ; D : domaine diversity ; J : domaine joining ; C : domaine constant.

Figure 21 : Structure des séquences signal de recombinaison (RSS) de 12 et 23 nucléotides dans le cas de la recombinaison VDJ d'une chaîne lourde. Adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012.

Figure 22 : Principales étapes de la recombinaison V(D)J. (A) Reconnaissance et clivages des RSS par les enzymes RAG 1&2. (B) Reconnaissance et assemblage des domaines clivés par les enzymes de la NHEJ. Adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012.

Figure 23 : Structure des anticorps et HcAbs présents dans le sérum des camélidés

Figure 24 : Représentation schématique d'un domaine VHH et de ses caractéristiques propres. Adapté de Muyldermans, 2013

Figure 25 : Représentation du nombre de domaines V, D et J au sein du locus IGH chez le dromadaire et l'alpaga.

Figure 26 : Vue d'ensemble des différentes étapes de la création d'une banque de phages après immunisation d'un animal

Figure 27 : Représentation schématique d'un tour de sélection par la méthodologie du phage display. Ag = antigène

Figure 28 : Insertion de l'E6-Tag dans les vecteurs p β -Actin-VHHC6-eGFP

Figure 29 : Création du VHH C6 bivalent par PCR recombinante

Figure 30 : Remplacement de l'eGFP par la mCherry

Figure 31 : Création des Chromatibody bivalent et hybride par PCR

Figure 32 : Clonage des séquences NES dans les vecteurs p β -Actin-C6/C6B et pCMV-Chromatibody

Figure 33 : Clonage des séquences NLS dans le vecteur p β -Actin-VHHC6B-E6T-NESPK1 α -eGFP

Figure 34 : Création des versions du VHH C6 mutées dans la région CDR3 par PCR recombinante

Figure 35 : Création du VHH C63C par PCR

Figure 36 : Création des VHH C62C et C61C par PCR

Figure 37 : VHHs C6B3C, C6B2C et C6B1C

Figure 38 : Les différentes conditions d'induction de γ -H2AX

Figure 39 : Principe du test au tampon CSK

Figure 40 : Séquences des 4 VHHs caractérisés. Jaune : régions CDR, bleu : variabilité dans les régions FR, rouge : variabilité dans la région CDR3, vert : résidus hydrophiles de la région FR2.

Figure 41 : Analyse par test ELISA des VHHs C6, A9 et A4 contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139) (A) ou une sérine (S139) en position 139 (B).

Figure 42 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH A4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 43 : IF avec le VHH A4 (100 ng/ml) sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. Révélation du Tag E6 avec l'anticorps 4C6. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 44 : Transduction des VHHs A4, A9 et C6 dans des cellules U2-OS traitées ou non à l'hydroxyurée pendant 48 h. 8 μ g/transduction. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m

Figure 45 : Transfection des VHHs A4, A9 et C6 dans des cellules U2-OS et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 46 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification du VHH C6B. (A) Analyse de l'expression chez E. coli BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'éluion obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent (flowthrough); W : lavage (wash).

Figure 47 : Analyse par test ELISA des VHHs C6 (A) et C6B (B) contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139), une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 (pS139 + pY142) ou non-phosphorylé (S139).

Figure 48 : Analyse par test ELISA par compétition des VHHs C6 (A) et C6B (B) contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine en position 139. Préincubation des VHHs à 1 μ g/ml avec le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139), une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 (pS139 + pY142) ou non-phosphorylé (S139) aux concentrations indiquées

Figure 49 : IF avec le VHH C6B révélé par le tag E6 sur des cellules HeLa traitées 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 50 : IF avec le VHH C6B (10 ng/ml) révélé par le tag E6 sur des cellules HeLa et HeLa H2AFX -/- traitées 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 51 : Transduction du VHH C6B dans des cellules U2-OS et traitement pendant 24 ou 48 h. 2 μ g pour 10^5 cellules par transduction ; NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 52 : Transduction du VHH C6B dans des cellules U2-OS, incubation de 24 h et traitement pendant 24 h. (A) Protocole suivi, 2 μ g pour 10^5 cellules par transduction. (B) IF avec l'anticorps 4C6. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 53 : Transfection du VHH C6B dans des cellules H1299 et incubation de 48 h. NT : non

traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 54 : Transfection du VHH CB dans des cellules HeLa et test au tampon CSK, incubation de 24 h. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 55 : Transfection des VHHs CbB dans des cellules U2-OS et test au tampon CSK, incubation de 24 h. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 56 : Transfection du VHH CbH dans des cellules U2-OS et test au tampon CSK, incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 57 : Séquences des CDR3 du VHH C6 et des 2 mutants générés, les résidus mutés sont indiqués en rouge

Figure 58 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% de la purification du VHH C6M1. (A) Analyse de l'expression chez E. coli BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'élution obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

Figure 59 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% de la purification du VHH C6M2. (A) Analyse de l'expression chez E. coli BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'élution obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

Figure 60 : Analyse par test ELISA des VHHs C6, C6M1 et C6M2 contre le peptide C-terminal de H2AX phosphorylé (A) ou non-phosphorylé (B)

Figure 61 : Transfection des VHHs C6M1 et C6M2 dans des cellules U2-OS et incubation de 24h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 62 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification du VHH C6BM1. (A) Analyse de l'expression chez E. coli BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'élution obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

Figure 63 : IF avec les VHHs C6BM1 et C6B (révélés par le tag E6) sur des cellules U2OS traitées pendant 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 64 : Transfection du VHH C6BM1 dans des cellules H1299 et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 65 : Alignement de la séquence d'export nucléaire de la protéine PKI α avec la séquence NES consensus de classe 1a. Les résidus hydrophobes participant à l'interaction avec la protéine CRM1 sont indiqués en gras.

Figure 66 : Transfection des VHHs C6-NESPKI α et CB-NESPKI α dans des cellules HeLa et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 67 : Transfection des VHHs C6B-NESPKI α dans des cellules HeLa et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 68 : Séquences des NLS SV-40 et cMyc. Les résidus lysines et arginines sont indiqués en gras

Figure 69 : Transfection des VHHs C6B-NESPK1 α -NLS dans des cellules U2-OS et incubation de 40 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 70 : Description du système d'export nucléaire optogénétique LEXY

Figure 71 : Transfection du plasmide pC6B-mCherry-LEXY dans des cellules H1299 et incubation de 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 72 : Perméabilisation des cellules H1299 transfectées avec le plasmide pC6B-mCherry-LEXY et incubées 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 73 : Influence du temps de fixation sur la diffusion des VHHs. (A) Construction transfectée dans les cellules H1299. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 74 : Hypothèse permettant d'expliquer le marquage de γ -H2AX après un temps de fixation court. (A) Cellule avec marquage γ -H2AX au voisinage d'une cellule transfectée (cellules traitées à l'hydroxyurée). (B) Représentation schématique de la diffusion des VHHs consécutive de la perméabilisation des cellules.

Figure 75 : Transfection du plasmide pNLS-C6B-mCherry-LEXY dans des cellules H1299 et incubation de 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 76 : Transduction du VHH C6B1C conjugué à l'Alexa-488-maléimide dans des cellules HeLa et traitement pendant 48 h. 3 μ g/transduction ; NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 77 : IF avec le VHH C6B1C couplé à la Sulfo-Cyanine3-maléimide (10 ng/ml) sur des cellules U2-OS traitées 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 78 : Transduction du VHH C6B1C conjugué à la Sulfo-Cyanine3-maléimide dans des cellules H1299 et traitement pendant 48 h. 2 μ g/ 10^5 cellules. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 79 : IF avec les VHHs C63C couplés à l'Alexa-568-maléimide (200 ng/ml) sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 80 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C63C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 81 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C61C et C63C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au

nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 82 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C61C et C6B1C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 83 : IF avec les VHHs C61C, C6B1C (marqués avec un Alexa-568) ou l'anticorps 3F4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de cisplatine. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Figure 84 : Quantification des intensité nucléaire moyennes obtenues après IF avec les VHHs C6B1C couplés à l'Alexa568, C6B fusionné à la mCherry et l'anticorps 3F4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 85 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C6B1C couplés à l'Alexa568 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 86 : Analyse de la densité cellulaire par coloration au Cristal Violet et lecture de la densité optique. Cellules H1299 traitées pendant 24 h puis incubées pendant 72 h. En encadré rouge sont présentées les concentrations utilisées pour le criblage.

Figure 87 : Analyse de la persistance de γ -H2AX après traitement de cellules H1299 pendant 8 h. Quantification des intensités nucléaires moyennes (\log_{10}) obtenues après IF avec l'anticorps 3F4. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 88 : Evolution de la population cellulaire des cellules H1299 traitées pendant 8 h ou non traitées. NT : non traité ; H + A : hydroxyurée + AZD-7762 ; G + A : gemcitabine + AZD-7762.

Figure 89 : Fraction survivante des cellules H1299 obtenue après un traitement des cellules pendant 24 h avec les différents produits génotoxiques.

Figure 90 : Fraction survivante des cellules U2-OS obtenue après un traitement des cellules pendant 24 h avec les différents produits génotoxiques.

Figure 91 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 92 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h et incubées pendant 24 h à l'issue du traitement. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 93 : Représentation graphique des signaux γ -H2AX moyens mesurés avec le VHH C6B

en fonction des signaux γ -H2AX moyens mesurés avec l'anticorps 3F4 à l'issue d'un traitement des cellules H1299 pendant 24 h.

Figure 94 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules U2-OS traitées pendant 24 h. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 95 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules U2-OS traitées pendant 24 h et incubées pendant 24 h à l'issue du traitement. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Figure 96 : Détermination du nombre de cellules H1299 traitées pendant 24 h et positives pour γ -H2AX à l'issue d'un traitement de 24 h (A) ou après 24 h d'incubation à l'issue du traitement (B). La valeur seuil utilisée est indiquée au-dessus de l'histogramme.

Figure 97 : Relations entre le nombre de cellules H1299 traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité. (A) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX à l'issue du traitement (24 h). (B) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

Figure 98 : Détermination du nombre de cellules U2-OS traitées pendant 24 h et positives pour γ -H2AX à l'issue d'un traitement de 24 h (A) ou après 24 h d'incubation à l'issue du traitement (B). La valeur seuil utilisée est indiquée au-dessus de l'histogramme.

Figure 99 : Relations entre le nombre de cellules U2-OS traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité. (A) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX à l'issue du traitement (24 h). (B) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

Figure 100 : Relations entre le nombre de cellules H1299 (A) ou U2-OS (B) traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

Figure 101 : La phosphorylation de H2AX lors de l'exposition à des agents génotoxiques. (A) Phosphorylation de H2AX en réponse au stress répliatif. (B) Hypothèses sur la dynamique de γ -H2AX lors du traitement avec des agents provoquant des dommages à l'ADN.

Liste des tables

Table 1 : Exemples de molécules génotoxiques utilisées en clinique

Table 2 : Cycle de PCR

Table 3 : Liste des antibiotiques utilisés pour la culture bactérienne

Table 4 : Valeurs de l' A_{max} , du coefficient d'extinction (ϵ_{dye}) et du facteur de correction (CF) des différents fluorochromes utilisés.

Table 5 : Liste des produits génotoxiques et des concentrations utilisées

Table 6 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

Table 7 : Caractère fonctionnel des différents VHHs dans les expériences de caractérisation

Table 8 : D.O.L et concentration des VHHs obtenus avec les différents protocoles

Table 9 : Liste des traitements utilisés lors du criblage

Préambule

Le cancer est une pathologie responsable de nombreuses morts à travers le monde. Il s'agit d'une des premières causes de mortalité prématurée dans plus de 90 pays. L'incidence des cancers au sein de la population mondiale est en augmentation et la prévalence et l'incidence de cette pathologie sont liées au développement économique et à l'augmentation générale de l'espérance de vie conduisant à un vieillissement des populations. L'étude prévisionnelle GLOBOCAN publiée en 2018 par l'agence internationale de recherche sur le cancer estimait le nombre de nouveaux cas à 18,1 millions et 9,6 millions de morts liés aux cancers sur cette même année. Du fait de la prévalence importante de cette maladie et de l'augmentation à prévoir de son incidence, de nombreux efforts sont entrepris dans la recherche de nouvelles thérapeutiques. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées, par exemple grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux, laissent entrevoir une meilleure prise en charge de cette pathologie. Néanmoins, ces thérapeutiques sont onéreuses et ne sont pas efficaces chez tous les patients. Pour ces raisons, les traitements de chimiothérapie reposent en grande partie sur l'utilisation de petites molécules génotoxiques, plus accessibles et efficaces sur la majorité des cancers. Ces molécules sont couramment utilisées en clinique et plusieurs de ces molécules génotoxiques sont inscrites sur la liste des médicaments essentiels éditée par l'Organisation Mondiale de la Santé. Cependant, bien qu'ayant une action préférentielle sur les cellules cancéreuses, ces molécules présentent de nombreux effets secondaires délétères, car elles ne permettent pas de cibler spécifiquement les tumeurs. Ainsi il apparaît important de développer des méthodes permettant de réduire les effets secondaires liés à ces molécules tout en conservant leur potentiel génotoxique contre les cellules cancéreuses.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de H2AX (γ -H2AX) comme indicateur de la létalité du stress répliatif induit par des molécules génotoxiques. Un tel indicateur pourrait permettre d'évaluer les produits ou combinaisons de produits génotoxiques efficaces sur un type de cellules cancéreuses donné. Ceci pourrait permettre à l'avenir le développement de protocoles de chimiothérapie personnalisés efficaces contre les cellules cancéreuses et minimisant les effets secondaires sur les cellules saines. Un tel indicateur pourrait également servir à la découverte de nouvelles molécules génotoxiques.

Introduction

1 La division cellulaire

La prolifération d'une population cellulaire est possible grâce la division des cellules qui la compose. Au cours de la division cellulaire, l'ensemble de l'information génétique de la cellule parentale doit être répliqué en 2 exemplaires identiques, transmis aux cellules filles.

L'information génétique est contenue dans l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) formé de 2 brins antiparallèles. La réplication de l'ADN est un processus hautement régulé afin d'éviter l'apparition de mutations pouvant être transmises aux cellules filles. Dans cette partie seront abordés les notions concernant le cycle cellulaire ainsi que les principes régissant la réplication de l'ADN.

1.1 Le cycle cellulaire

Les différentes étapes nécessaires à la division sont regroupées au sein des 4 phases du cycle cellulaire, il s'agit des phases G1, S (synthèse), G2 et M (mitose). A chacune de ces phases est associé un ensemble d'activités biologiques nécessaires pour la phase suivante. L'activation des différentes protéines effectrices impliquées dans les différentes phases est contrôlée par leur phosphorylation par les complexes cycline-CDK (Cyclin Dependant Kinase). Des complexes cyclines-CDK spécifiques interviennent dans les différentes phases du cycle cellulaire mais certaines redondances ont pu être observées dans le rôle des différentes cyclines ou CDKs (Hochegger et al., 2008) (Figure 1).

Les cellules ne se divisant pas, du fait de l'absence de signaux de prolifération ou d'une différenciation terminale sont dans une phase dite G0 correspondant à un arrêt de la prolifération cellulaire. Sous l'action de facteurs de croissance, ces cellules peuvent ré-entrer dans le cycle cellulaire et entamer leur division. Les facteurs de croissance induisent la synthèse des cyclines D qui vont interagir avec les CDKs 4 et 6 et les complexes cyclineD-CDK4/6 vont alors phosphoryler leur protéines cibles (Otto and Sicinski, 2017). L'activité de ces complexes entraîne le démarrage d'un programme de transcription propre à la phase G1 et nécessaire à la réplication de l'ADN, impliquant entre autres les facteurs de transcription de la famille E2F. Les cyclines D-CDK4/6 permettent de libérer les activateurs de transcription E2F1, 2 et 3 de leur inhibition par la protéine RB (Rétinoblastome), permettant la synthèse des gènes cibles et d'adresser au cytoplasme les répresseurs de transcription (E2F4 et 5) levant

ainsi l'inhibition de la transcription par ces facteurs. Ce programme transcriptionnel aboutit à la synthèse de nouveaux répresseurs de la famille E2F (E2F6, 7 et 8) qui inhibent progressivement la transcription de leurs gènes cibles au cours de la phase G1 (Bertoli et al., 2013a). Parmi les gènes régulés par les facteurs de transcription de la famille E2F se trouvent de nombreux gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et il a récemment été montré que le répresseur E2F6 inhibe la synthèse de ces gènes à la fin de la phase G1. Du fait de cette inhibition, la cellule dispose à l'entrée de la phase S d'une « capacité répliquative » conditionnant la quantité d'ADN pouvant être synthétisée par unité de temps (Pennycook et al., 2020).

Ce programme transcriptionnel permet la synthèse des cyclines E qui interagissent avec les CDKs2 et l'augmentation du niveau de ces complexes cyclineE-CDK2 permet la phosphorylation de nouvelles cibles et l'entrée en phase S. Lors de la phase S, les cyclines A sont synthétisées, ces cyclines interagissent avec les CDKs 1 et 2. La quantité de ces complexes cycline A-CDK1/2 augmente au cours des phases S et G2 et ils activent de nombreuses protéines dont les kinases Polo-like (PLK) et Aurora. Finalement, un dernier complexe, le complexe cycline B-CDK1 permet l'entrée en phase M et la division cellulaire. Lors de la division, l'E3-ubiquitine ligase APC/C (Anaphase Promoting Complex) permet la dégradation des cyclines A et B et la réinitialisation du cycle cellulaire (Hydbring et al., 2016; Lemmens and Lindqvist, 2019).

Les phosphatases de la famille CDC25 participent également à l'activité des complexes cyclines-CDKs. En effet les CDKs portent des phosphorylations inhibant leur activité et l'activité phosphatase des protéines CDC25 permet le retrait de ces phosphorylations. Ainsi CDC25A déphosphoryle les CDKs2, permettant l'activité des complexes cyclineE-CDK2 et cyclineA-CDK2 et la phosphatase CDC25C déphosphoryle CDK1 permettant l'activité des complexes cyclineA-CDK1 et cyclineB-CDK1.

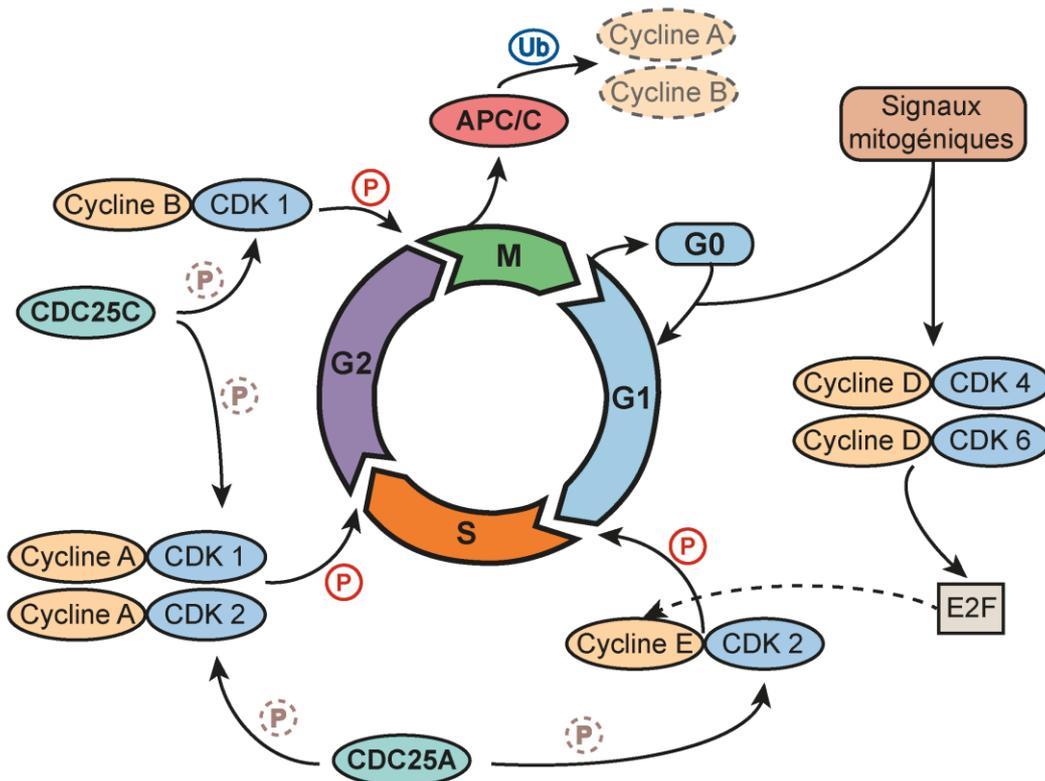


Figure 1 : Aperçu du cycle cellulaire et de sa régulation par l'activité des complexes cyclines-CDKs. Adapté de Otto & Sicinski, 2017

1.2 La réplication de l'ADN

La réplication prend place au cours de la phase S du cycle cellulaire et correspond à l'étape de duplication du génome de la cellule. Afin de permettre la transmission d'une exacte copie du génome, la réplication est dite semi-conservative, c'est-à-dire que les brins d'ADN parentaux servent de modèle pour la synthèse des nouveaux brins (Meselson and Stahl, 1958). Chez les eucaryotes, la synthèse des brins d'ADN est assurée par les ADN polymérases (ϵ , δ et α). Ces enzymes utilisent les déoxynucléotides triphosphates (dNTPs) disponibles pour synthétiser les nouveaux brins d'ADN dans le sens 5'-3' et possèdent une haute-fidélité permettant de fortement réduire la probabilité de l'insertion de mutations dans le génome (Ganai and Johansson, 2016). De nombreuses protéines assistent les polymérases lors de la réplication et cet ensemble protéique est appelé le réplisome.

1.2.1 Le réplisome

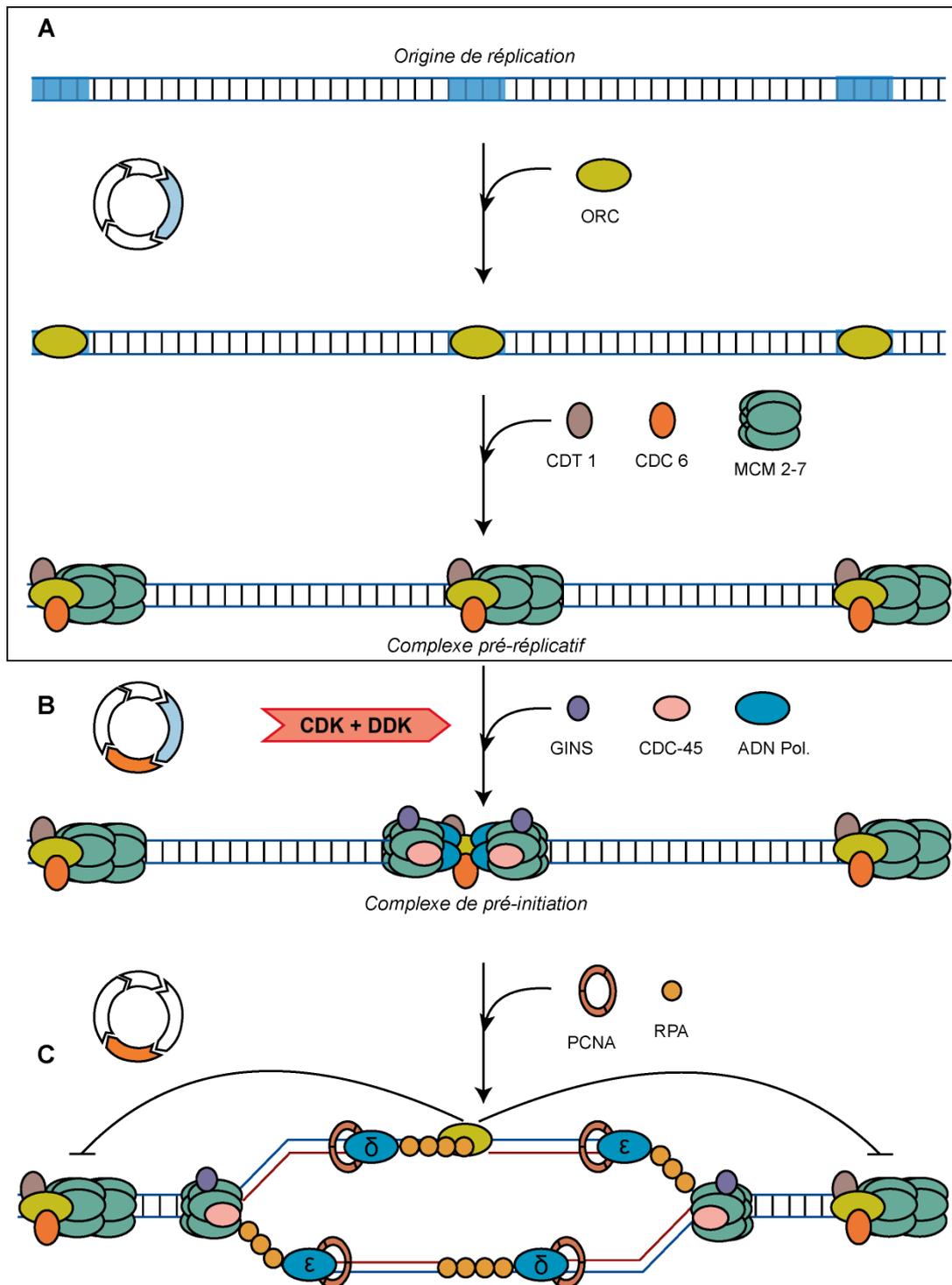


Figure 2 : Représentation schématique de l'assemblage du réplisome. (A) Formation du complexe pré-répliatif. (B) Formation du complexe de pré-initiation. (C) Initiation de la répliation. Adapté de Fragkos et al., 2015.

1.2.1.1 Le complexe pré-réplicatif

L'assemblage du réplisome commence en phase G1 du cycle cellulaire par le recrutement des origines de réplication par les protéines ORC (Origin Recognition Complex) en interaction avec CDC-6 (Cell Division Cycle 6). Ce complexe recrute à son tour la protéine CDT1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) associée au double hexamère de l'hélicase MCM 2-7 (Minichromosome Maintenance). Le complexe ainsi formé est appelé complexe pré-réplicatif (pré-RC). Les complexes pré-RC peuvent se former sur l'ensemble des origines de réplication présentes sur le génome (Figure 2A) (Fragkos et al., 2015).

1.2.1.2 Le complexe de pré-initiation

Certains complexes pré-RCs sont activés durant la transition de la phase G1 à la phase S grâce à l'activité des CDKs (dont CDK2) et de la kinase DDK (DBF4-dependent kinase). Ces kinases phosphorylent notamment les protéines CDC-45 et GINS (Go-Ichi-Ni-San) permettant leur interaction avec MCM 2-7 formant ainsi le complexe CMG. Ce complexe s'associe avec d'autres protéines (dont les polymérases) et forment le complexe de pré-initiation (Figure 2B). Les mécanismes dictant le choix des pré-RC qui seront activés ne sont pas encore élucidés mais ce choix semble dépendre de plusieurs facteurs tels que la distance entre 2 origines de réplication, la compaction de la chromatine et la localisation nucléaire des pré-RCs. Certains pré-RCs sont activés à différents temps de la phase S, notamment en fonction de l'état transcriptionnel des gènes sur lesquels ils sont situés (Rhind and Gilbert, 2013).

1.2.1.3 L'initiation de la réplication

La phosphorylation de MCM 2-7 par les kinases DDK et CDK au cours de la phase S permet de déclencher son activité hélicase et les 2 hexamères vont alors séparer les brins d'ADN dans les 2 directions en partant de l'origine de réplication créant ainsi 2 fourches de réplication. Sur chacune de ces fourches vont être recrutées les dernières protéines du réplisome telles que PCNA (Proliferating Cells Nuclear Antigen) et RPA (Replication Protein A) (Figure 2C).

La réplication commence par la synthèse de courtes amorces d'ARN (Acide RiboNucléique) sur chacun des brins par la polymérase α qui vont être prolongées par la synthèse d'ADN. L'ADN étant anti parallèle, le brin parental dont le sens de synthèse (de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3') est dans le sens de l'hélicase va être répliqué de façon continue par la polymérase ϵ . Le

brin antiparallèle dont le sens de synthèse est opposé à l'activité hélicase va être répliqué de façon discontinue en courts fragments successifs d'environ 200 nucléotides, appelés fragments d'Okazaki, par la polymérase δ . Durant la réplication, la protéine RPA reconnaît et protège de la dégradation par les nucléases l'ADN simple brin (ssDNA) généré par l'action des hélicases. La structure précise des fourches de réplication n'a pas encore été totalement élucidée, néanmoins, à partir des différentes interactions entre les composants du replisome le modèle de fourche de réplication présenté en Figure 3 a été établi. Ce modèle montre l'organisation du couplage entre l'hélicase et les différentes polymérases. La présence d'une boucle dans le brin retard permet d'expliquer comment la synthèse des fragments d'Okazaki par la polymérase δ peut suivre la progression de l'hélicase.

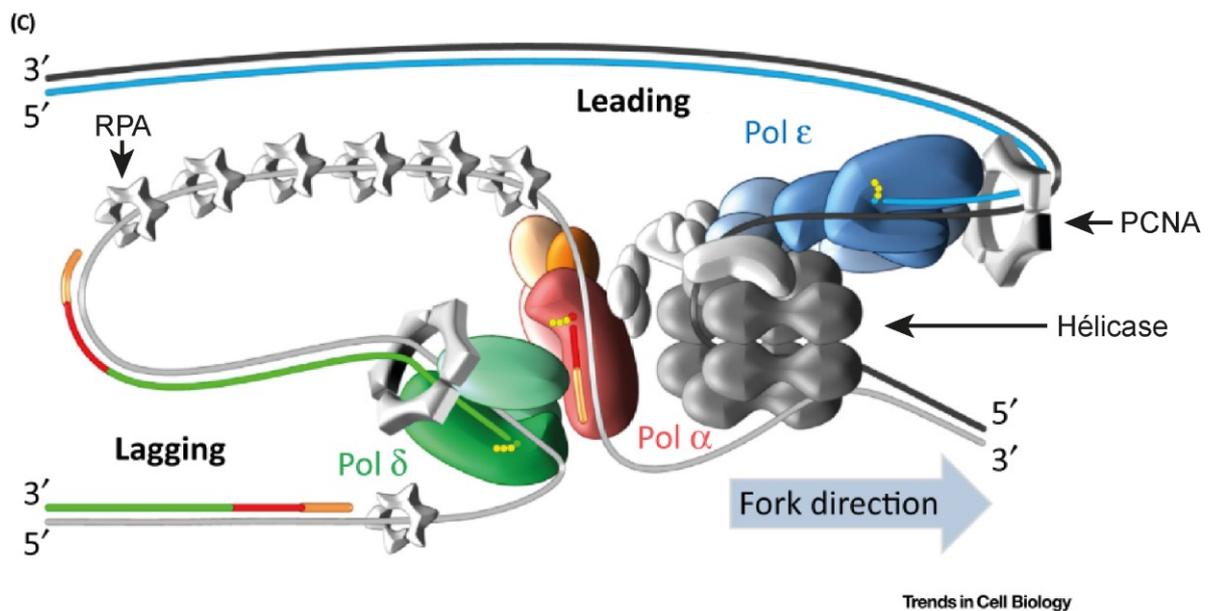


Figure 3 : Modèle de l'organisation d'une fourche de réplication. Illustration de Lujan et al., 2016.

Il est important que le génome ne soit dupliqué qu'une seule fois au cours de la réplication et pour ce faire, des mécanismes empêchent qu'une même origine soit recrutée plusieurs fois au cours d'une phase S. Ces mécanismes reposent entre autres sur la destruction pendant la phase S des protéines impliquées dans le recrutement des origines de réplication.

Sur l'ensemble des origines de réplication qui ont été recrutées, certaines ne seront pas activées au cours de la phase S, ces origines sont appelées dormantes et leur activation est réprimée lors de la réplication des origines activées voisines. Ces origines dormantes peuvent toutefois être activées dans le cadre du stress réplcatif, leur activation pouvant permettre de

secourir une fourche de réplication bloquée dans son voisinage (Ciardo et al., 2019; Kang et al., 2018).

1.2.2 L'organisation temporo-spatiale de la réplication

La détection et le suivi en microscopie à fluorescence de composants du réplisome, tels que la protéine PCNA, a permis de mettre en évidence une organisation spatiale et temporelle de la réplication. Ainsi, il a été montré que la réplication peut être observée sous forme de foci ou « replication factories » comprenant chacun plusieurs fourches de réplication actives. L'organisation de ces foci au sein du noyau évolue au cours de la phase S, avec l'observation de foci de réplication de petite taille correspondant à la réplication des zones transcriptionnellement actives de l'euchromatine en début de phase S. En fin de phase S, les foyers de réplication sont observés sous forme de clusters de grande taille correspondant à la réplication de l'hétérochromatine (Chagin et al., 2010; Rybak et al., 2015).

2 Stress réplcatif et dommages à l'ADN

La bonne marche du processus de réplication suppose que les composants du réplisome ne rencontrent pas d'obstacle à leur progression le long des brins d'ADN parentaux. Cependant, pour diverses raisons, il peut arriver que la progression des polymérase soit ralentie voire stoppée (Zeman and Cimprich, 2014). Lorsque les polymérase sont stoppées, un découplage entre les polymérase et l'hélicase a lieu et cette dernière continue de séparer les brins parentaux en aval du blocage, exposant ainsi de longues séquences de ssDNA. Ce ssDNA peut être reconnu par différentes nucléases et ceci peut aboutir à la formation d'une cassure double brin d'ADN (CDB), menace majeure pour l'intégrité du génome (Figure 4).

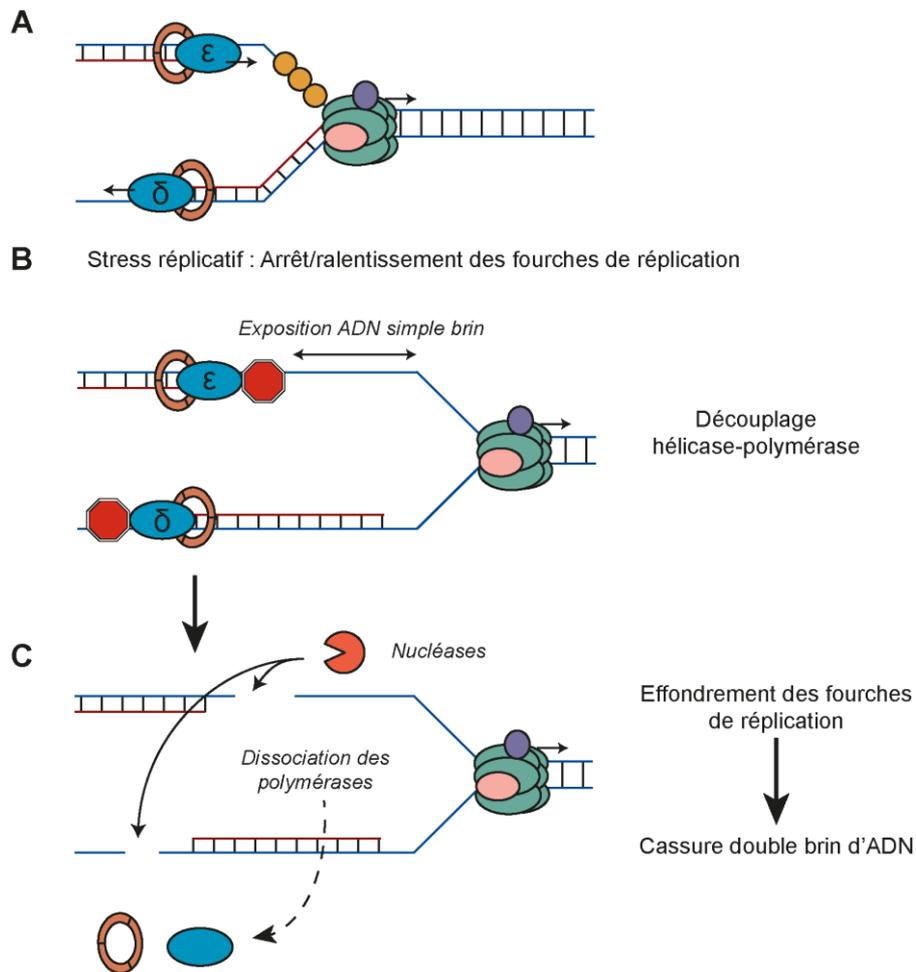


Figure 4 : Représentation du stress réplcatif. (A) Progression d'une fourche de réplication en absence de stress réplcatif. (B) Exposition d'ADN simple brin lors du stress réplcatif. (C) Effondrement de la fourche de réplication

Les cellules saines sont exposées naturellement à de faibles niveaux de stress réplcatif. Ce stress réplcatif peut provenir d'un mauvais appariement de nucléotides, de l'endommagement de ces nucléotides à cause de facteurs environnementaux (irradiations, ultraviolets, espèces réactives de l'oxygène, ...) ou de pontages intra ou inter-brins d'ADN. (Gaillard et al., 2015). Certaines séquences d'ADN sont également source de stress réplcatif, comme les séquences répétées ou des séquences à l'origine d'une structure de la molécule d'ADN pouvant entraver la progression des polyméras, comme par exemple les structures en épingle à cheveux. La collision des protéines du réplisome avec la machinerie transcriptionnelle ou la présence d'un stress torsionnel peuvent également provoquer un blocage des fourches de réplcation. Enfin un déséquilibre ou une pénurie de dNTPs peut également être une source de stress réplcatif (Figure 5) (Forment and O'Connor, 2018; Magdalou et al., 2014; Mazouzi et al., 2014; Técher et al., 2017).

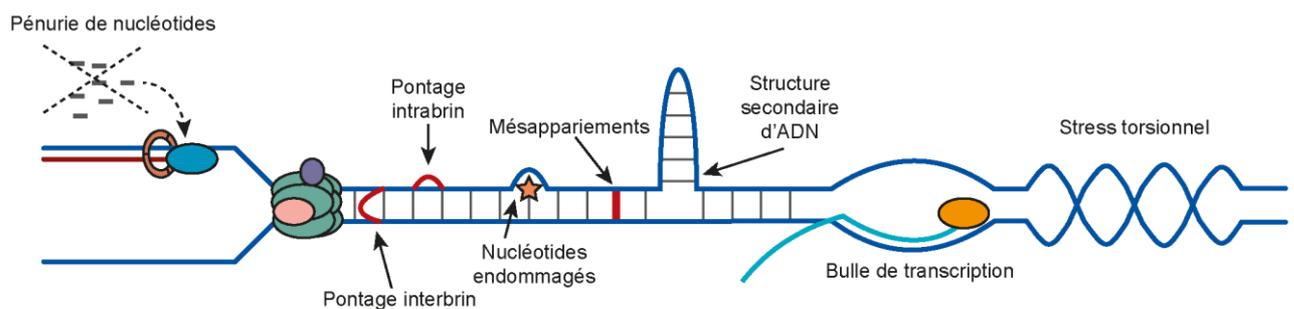


Figure 5 : Représentation schématique de facteurs à l'origine du stress réplcatif. Adapté de Zeman & Cimprich, 2014

2.1 Le stress réplcatif dans le contexte des cellules cancéreuses

Le cancer est une pathologie caractérisée par la prolifération incontrôlée d'un ensemble de cellules au sein de l'organisme. Les cellules cancéreuses acquièrent cette capacité à proliférer sans contrôle suite à l'apparition de mutations au sein du génome. Ces mutations leur confèrent par exemple la capacité à se diviser en absence de facteurs de croissance ou à ne plus être inhibées par les facteurs suppresseurs de croissance. Les gènes fréquemment mutés dans les cancers sont classés en 2 catégories : les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont des gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, par exemple les gènes codant pour les cyclines qui peuvent être surexprimés.

L'autre catégorie de gènes correspond aux suppresseurs de tumeurs, des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, par exemple la protéine p53, fréquemment mutée dans les cancers et qui intervient dans l'arrêt du cycle ou dans l'entrée en sénescence ou en apoptose des cellules en réponse à la détection de dommages à l'ADN. Du fait des dommages à l'ADN pouvant survenir du fait du stress réplicatif et de leur réparation potentiellement source d'erreurs dans la séquence d'ADN, le stress réplicatif est à l'origine d'une instabilité génomique qui peut entraîner l'apparition de nouvelles mutations au sein du génome. Ces nouvelles mutations peuvent ainsi augmenter la capacité de la cellule cancéreuse à proliférer (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Macheret and Halazonetis, 2015).

2.1.1 Stress réplicatif endogène

La prolifération soutenue ainsi que la perte de facteurs impliqués dans la régulation cellulaire font que les cellules cancéreuses sont soumises de façon endogène à un stress réplicatif. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la présence de ce stress réplicatif endogène. La mutation ou la surexpression de certains oncogènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire peut entraîner une entrée prématurée des cellules en phase S. Du fait de cette entrée précoce en phase S, l'ensemble des facteurs nécessaires au bon déroulement de la réplication n'ont pas nécessairement pu être synthétisés et ceci peut compromettre le processus de réplication.

Par exemple, il a été montré que la surexpression de la cycline E, impliquée dans la transition G1/S, est responsable d'une entrée prématurée en phase S avec une réserve de nucléotides insuffisante et ceci est à l'origine d'un stress réplicatif et donc d'une instabilité génomique pouvant conduire à l'apparition de nouvelles mutations (Bester et al., 2011).

La dérégulation des protéines impliquées dans le cycle cellulaire peut également avoir comme conséquence une perturbation de l'activation des complexes pré-RC avec soit une activation trop importante pouvant provoquer la re-réplication de l'ADN ou une activation trop faible ayant comme conséquence une distance trop importante entre 2 fourches de réplication.

2.1.2 Stress réplicatif exogène

Au stress réplicatif endogène présent dans les cellules cancéreuses, peut s'ajouter un stress réplicatif d'origine exogène, c'est-à-dire provenant de l'environnement extérieur. Le microenvironnement tumoral peut être une source de stress réplicatif, par exemple du fait

l'absence de vascularisation dans certaines zones de la tumeur ce qui expose les cellules présentes dans ces zones à des conditions d'hypoxie (Zhang et al., 2016).

2.1.2.1 Les traitements génotoxiques

En clinique, les protocoles de traitement des cancers utilisent des petites molécules chimiques qui, pour certaines, endommagent l'ADN ou interfèrent avec le processus de réplication. Ces agents génotoxiques, par leur mode d'action, provoquent des dommages à l'ADN dans l'ensemble des cellules. Les cellules saines, non exposées à un stress réplicatif endogène peuvent dans l'ensemble réparer ces lésions tandis que dans les cellules cancéreuses, ces dommages viennent s'ajouter au stress réplicatif endogène ce qui conduit au dépassement des mécanismes de réparation et aboutit à la mort cellulaire (Figure 6) (Ubhi and Brown, 2019). Ci-après sont décrit les principales classes de molécules génotoxiques utilisées en clinique et leur mode d'induction des dommages à l'ADN.

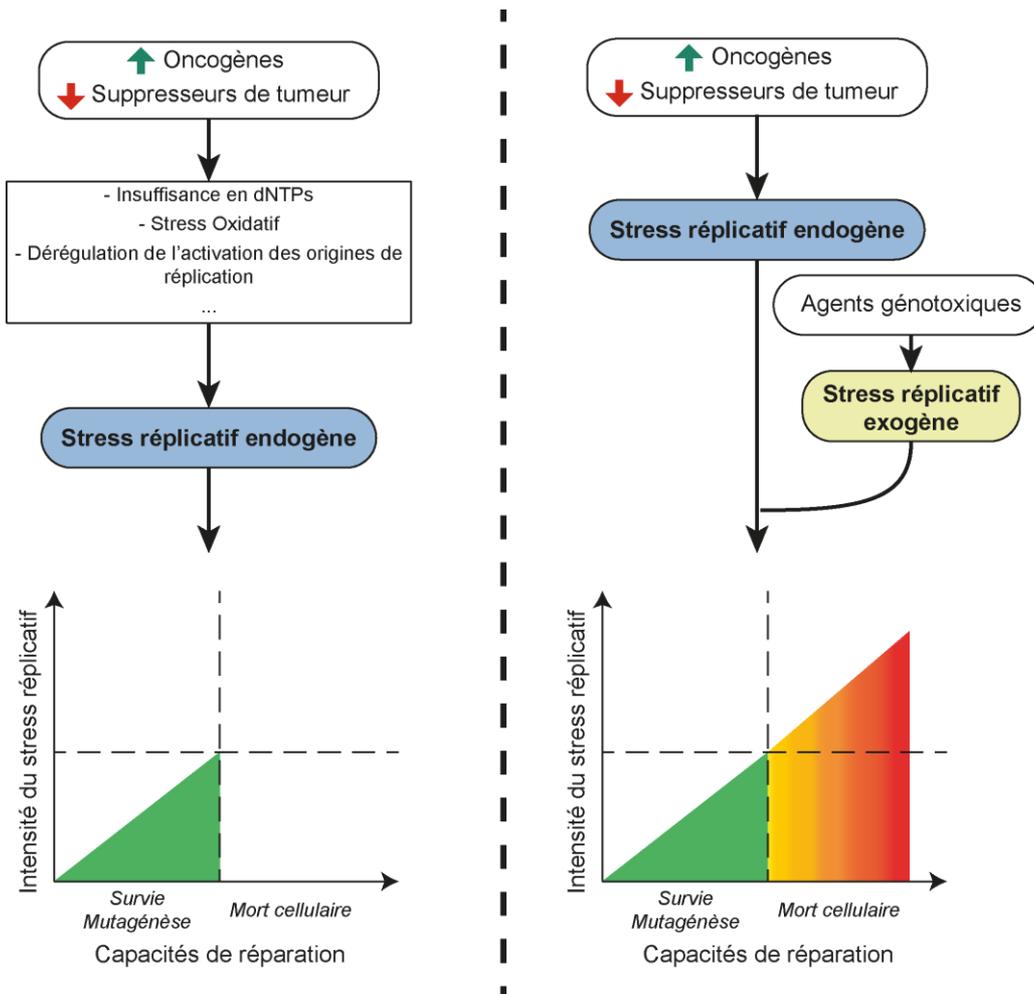


Figure 6 : Illustration du dépassement des capacités de réparation des cellules cancéreuses par ajout d'un stress réplicatif exogène. Adapté de Zhang et al., 2016

2.2.1.1 Les inhibiteurs de la Ribonucléotide réductase (RnR)

La RnR est l'enzyme qui catalyse la réduction des ribonucléotides diphosphates en déoxyribonucléotides diphosphates, nécessaires à la réplication. Cette enzyme est constituée de 2 sous-unités, la sous-unité R1 qui renferme le site actif et la sous-unité R2 contenant un radical tyrosyl et un centre ferrique nécessaires à l'activité enzymatique (Shao et al., 2006). L'activité de la RnR est modulée tout au long du cycle cellulaire et la synthèse de la sous-unité R2, possédant une demi-vie courte, est restreinte à la phase S du cycle cellulaire. Cette synthèse est régulée par divers facteurs, notamment les facteurs de transcription de la famille E2F activés au cours de la phase G1 (Lecona and Fernández-Capetillo, 2014). L'inhibition de la RnR prive la cellule de dNTPs et provoque le ralentissement voire le blocage des fourches de réplication.

Plusieurs molécules peuvent être utilisées afin de bloquer l'activité de la RnR. L'hydroxyurée (HU) par exemple inhibe la RnR par une réaction de réduction du radical tyrosyl dans la sous-unité R2. Cependant l'inhibition de la RnR par l'hydroxyurée est réversible. En plus de ce mécanisme, l'hydroxyurée entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui participent à sa cytotoxicité (Singh and Xu, 2016). La triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) est également un inhibiteur de la sous-unité R2 qui est utilisé en clinique.

Le 2',2'-difluoro-2'-déoxycytidine (dFdC) ou gemcitabine est également un inhibiteur de la RnR utilisé en clinique. Cette molécule est un analogue de nucléotide qui est métabolisé à l'intérieur de la cellule par différentes kinases. Parmi les métabolites actifs, on retrouve la forme diphosphate (dFdCDP) qui est reconnue par la RnR et l'inhibe de manière irréversible par liaison covalente à l'intérieur du site actif de la sous-unité R1 (De Sousa Cavalcante and Monteiro, 2014). La clofarabine (2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadénosine), un analogue de déoxyadénosine agit, après métabolisation intracellulaire, de façon similaire à la gemcitabine en inhibant la sous-unité R1 (Zhenchuk et al., 2009).

2.2.1.1 Les analogues de nucléotides

Les analogues de nucléotides sont des molécules possédant une structure similaire aux nucléotides. Ils sont reconnus par différentes enzymes cellulaires et sont capables d'inhiber les processus biologiques impliquant ces enzymes. La 5-fluorouracile (5-FU) appartient à cette classe de molécules, il est métabolisé dans la cellule sous différentes formes dont la fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP) et triphosphate (FdUTP) ainsi que la fluorouridine triphosphate (FUTP). La forme FdUMP est responsable de l'inhibition de l'enzyme thymidilate synthase qui est responsable de la production de déoxythymidine monophosphate (dTMP) à partir de déoxyuridine monophosphate (dUMP). Cette inhibition conduit à la diminution du pool de déoxythymidine triphosphate (dTTP) nécessaire à la synthèse d'ADN ce qui engendre du stress répliatif. Ceci peut conduire à la misincorporation de dUTP et de FdUTP dans l'ADN devant être réparé la voie de réparation par excision de nucléotides (NER). En plus de son action sur la répliation le FUTP peut également être incorporé dans l'ARN ce qui augmente son potentiel cytotoxique.

En plus de leurs actions sur la RnR, la gemcitabine et la clofarabine décrites précédemment peuvent être reconnues et incorporées par les ADN polymérase au cours de l'élongation et ainsi entraîner le blocage des fourches de réplication.

2.2.1.1 Les Inhibiteurs de la topoisomérase I

La topoisomérase I est une enzyme qui permet le relâchement de l'ADN super enroulé. Une telle structure d'ADN peut constituer un obstacle à la progression des bulles de transcription ou des fourches de réplication. La topoisomérase I permet le relâchement de ces structures en induisant une coupure simple brin dans l'ADN permettant ainsi la rotation du brin parallèle et sa religation ultérieure.

Les inhibiteurs de topoisomérase I, comme la camptothécine, se lient au complexe formé par la topoisomérase 1 et l'ADN clivé et le stabilise empêchant ainsi la religation. Ceci entraîne la persistance d'une cassure simple brin et du complexe de la topoisomérase I sur l'ADN tous deux pouvant bloquer la progression des fourches de réplication. La camptothécine n'est pas utilisée en clinique du fait de sa toxicité, mais des dérivés de cette molécule ont été créés comme l'irinotecan ou le topotecan (Pommier, 2006).

2.2.1.1 Les inhibiteurs de la topoisomérase II

Les topoisomérases de type II sont des enzymes qui catalysent la formation de cassures double brins d'ADN pour permettre le passage d'un double brin d'ADN avant de refermer la CDB. L'activité de ces enzymes est cruciale pour permettre la division cellulaire car elles participent à la séparation des chromosomes. Les topoisomérases de classe II sont des enzymes multimériques qui ont besoin d'adénosine triphosphate (ATP). Les inhibiteurs de topoisomérase II utilisés en clinique sont par exemple l'étoposide ou les molécules de la classe des anthracyclines.

L'étoposide agit en empêchant la religation de la CDB par la topoisomérase, aboutissant au maintien de la CDB associé à la topoisomérase II. Les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine, ...) agissent sur la topoisomérase II en créant un complexe ternaire constitué de l'ADN, la topoisomérase II et l'anthracycline. En plus de ce mode d'action les anthracyclines sont capable de s'intercaler dans l'ADN et de générer des ROS (Hande, 2008; Martins-Teixeira and Carvalho, 2020)

2.2.1.1 Les sels de platine

Les sels de platine sont des composés chimiques constitués d'un atome de platine chargé et entouré de ligands chimiques. Dans le cytoplasme cellulaire, ces molécules sont hydrolysées et deviennent réactives envers les bases puriques de l'ADN formant des liens covalents entre-elles ce qui aboutit à la formation de pontages intra ou inter-brins d'ADN. Bien que leur cytotoxicité soit attribuée à l'action sur l'ADN, il semblerait que ces composés soient également réactifs envers l'ARN et ceci participerait à leur effet cytotoxique. Parmi les sels de platines utilisés en clinique on trouve le cisplatine, l'oxaliplatine et le carboplatine (Shaloam and Tchounwou, 2014; Theile, 2017).

2.2.1.1 Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des molécules capables de réagir avec les atomes d'azote et d'oxygène présents au niveau des bases d'ADN pour y ajouter un groupement méthyl. La méthylation la plus fréquente est celle de l'atome d'azote en position 7 de la guanine formant de la 7-méthylguanine (7meG), une modification pouvant entraîner la dépurination, c'est-à-dire la perte de la base purique méthylée au sein du brin d'ADN. Les agents alkylants peuvent également provoquer des méthylations de l'adénine sur l'atome d'azote en position 3 qui sont capables de bloquer la progression des polymérase et la synthèse translésionnelle est généralement requise pour que la réplication puisse progresser. Enfin la méthylation de l'atome d'oxygène en position 6 de la guanine (O⁶meG) provoque le mésappariement de cette base méthylée avec une thymidine, favorisant ainsi la mutagénèse (Fu et al., 2012). Parmi les agents alkylants utilisés en clinique, on retrouve le témozolomide ou le cyclophosphamide.

2.2.1.1 Les inhibiteurs de la réponse aux dommages à l'ADN

Les cellules cancéreuses étant naturellement soumises au stress réplicatif, elles sont dépendantes pour leur survie du bon fonctionnement des différentes voies de réparation des dommages à l'ADN. Ces mécanismes de réparation pouvant également réparer les lésions induites par les traitements de chimiothérapie, ils peuvent également être à l'origine d'une résistance des cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie. L'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN (RDA) est considérée comme une stratégie thérapeutique efficace en monothérapie ou combinée aux molécules génotoxiques classiquement utilisées

en thérapie. L'inhibition de la Poly-ADP-Ribose polymérase 1 (PARP-1) est un exemple d'inhibiteur de la RDA. Ces inhibiteurs ont été testés en clinique sur des patients présentant des tumeurs déficientes pour le gène BRCA (Breast Cancer). Cette approche thérapeutique repose sur une létalité synthétique lorsque l'activité de la PARP-1 est inhibée en l'absence des protéines BRCA fonctionnelles (Yap et al., 2019).

En plus de l'inhibition de la protéine PARP-1, l'inhibition d'autres protéines impliquées dans la RDA a également été évaluée, comme par exemple les kinases ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein) et Chk1 (Checkpoint kinase 1). Ces kinases sont impliquées dans le recrutement des protéines de la RDA ainsi que dans l'arrêt du cycle cellulaire. Des inhibiteurs de ces kinases ont été testés lors d'essais clinique en monothérapie ou en association avec des molécules génotoxiques (Qiu et al., 2017). L'efficacité de ces thérapies, notamment de la combinaison entre l'inhibition d'ATR et de Chk1 est due à la perte de l'arrêt du cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN et une entrée en mitose en absence d'une réplication complète du génome pouvant conduire à une catastrophe mitotique (Ubhi and Brown, 2019; Zhang et al., 2016).

Des exemples de molécules génotoxiques utilisées dans les protocoles de chimiothérapie sont présentés en Table 1. Il est à noter cependant que les protocoles utilisés en clinique reposent généralement sur l'utilisation de combinaisons de plusieurs molécules génotoxiques.

Classe	Molécule	Exemple d'utilisation clinique	Référence
Inhibiteurs de la RnR	Hydroxyurée	Anémie Falciforme	(Singh and Xu, 2016)
	Gemcitabine	Cancer pancréatique	(De Sousa Cavalcante and Monteiro, 2014)
	Triapine	Essais cliniques	(Kunos and Ivy, 2018)
	Clofarabine	Leucémies pédiatriques	(Zhenchuk et al., 2009)
Analogues de nucléotides	5-fluorouracile	Cancers colorectaux	(Longley et al., 2003)
Inhibiteurs de topoisomérase I	Irinotecan	Cancers colorectaux	(Hevener et al., 2018)
	Topotecan	Cancers du col de l'utérus	
Inhibiteurs de topoisomérase II	Epirubicine	Cancers du sein	
	Etoposide	Cancers testiculaires	
Sels de platine	Cisplatine	Cancers pulmonaires	(Teixeira et al., 2016)
	Oxaliplatine		
Inhibiteurs de la PARP	Olaparib	Cancers du sein	(Yap et al., 2019)

Table 1 : Exemples de molécules génotoxiques utilisées en clinique

2.2.1.1 Les radiations ionisantes

En plus des traitements de chimiothérapie (molécules chimiques), la thérapie des cancers peut également utiliser la radiothérapie, c'est-à-dire l'exposition des cellules cancéreuses à un rayonnement ionisant. Lorsqu'une cellule est exposée à un tel rayonnement, l'énergie qu'il véhicule va entraîner de nombreuses modifications chimiques et notamment endommager l'ADN. Les lésions à l'ADN provoquées par de tels rayonnements sont par ordre de fréquence : les dommages aux bases de l'ADN (puriques et pyrimidiques), les cassures simple-brin et les cassures double-brin d'ADN. L'objectif d'un traitement par radiothérapie est donc d'exposer la tumeur à une dose de radiations suffisante pour entraîner le dépassement de la réponse au dommage et ainsi provoquer la mort cellulaire (Lomax et al., 2013).

2.2 Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN

Du fait de la menace que constitue le stress répliatif et les dommages à l'ADN pour l'intégrité du génome, les cellules disposent naturellement de nombreux mécanismes adaptés à la détection et la prise en charge de ces dommages. Bien que permettant aux cellules saines de

réparer les dommages à l'ADN auxquels elles peuvent être confrontées, ces mécanismes de réparation compliquent également la prise en charge thérapeutique des cancers. La réparation des dommages à l'ADN provoqués par les agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie pouvant engendrer une tolérance à ces traitements. Dans cette section seront traitées les réponses cellulaires au stress répliatif, la réparation des CDBs, les voies de réparation par excision de nucléotides et excision de bases et enfin la synthèse translésionnelle.

2.2.1 La réponse au stress répliatif (RSR)

Comme vu précédemment, le blocage des fourches de réplication expose en premier lieu des portions de ssDNA. Ce ssDNA peut être ciblé par des nucléases pouvant faire évoluer cette structure d'ADN en CDB. Le premier mécanisme mis en œuvre par les cellules est la RSR (Blackford and Jackson, 2017). Cette réponse fait intervenir en premier lieu la protéine RPA qui reconnaît et se lie au ssDNA. RPA est ensuite reconnu par la kinase ATR en association avec la protéine ATRIP (ATR Interacting Protein). La kinase ATR est ensuite activée par la protéine TopBP1 (DNA topoisomerase 2-binding protein 1) associée au complexe 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) ou par la protéine ETAA1 (Ewing's Tumor-Associated Antigen 1) (Figure 7A-C).

Parmi les protéines phosphorylées par ATR, la kinase Chk1 est fréquemment décrite dans la littérature notamment du fait de son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en réponse au stress répliatif. Chk1 inhibe les phosphatases CDC25A et CDC25C en les phosphorylant, ceci a pour conséquence d'inactiver les complexes cycline A/E-CDK2, évitant ainsi l'activation de nouvelles origines de réplication. L'inhibition de CDC25C inactive également le complexe cycline B-CDK1 ce qui conduit à au blocage du cycle cellulaire afin d'éviter l'entrée en mitose (Figure 7E).

En plus de la kinase Chk1, ATR phosphoryle d'autres cibles. Elle participe ainsi à la stabilisation de la fourche de réplication bloquée en phosphorylant les protéines RFC (Replication Factor C), MCM, RPA ainsi que les ADN polymérase. Elle phosphoryle également des facteurs de réparation tels que les protéines BRCA, WRN (Werner syndrome ATP-dependent helicase), BLM (Bloom syndrome protein). Il a été décrit qu'ATR participe également à l'augmentation du pool de nucléotides en stabilisant la sous-unité RRM2 de la RnR (Figure 7D). Enfin, la kinase ATR phosphoryle également la protéine p53 impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ou

l'induction l'apoptose ou de la senescence en réponse aux dommages à l'ADN (Cimprich and Cortez, 2008; Forment and O'Connor, 2018; Jones and Petermann, 2012).

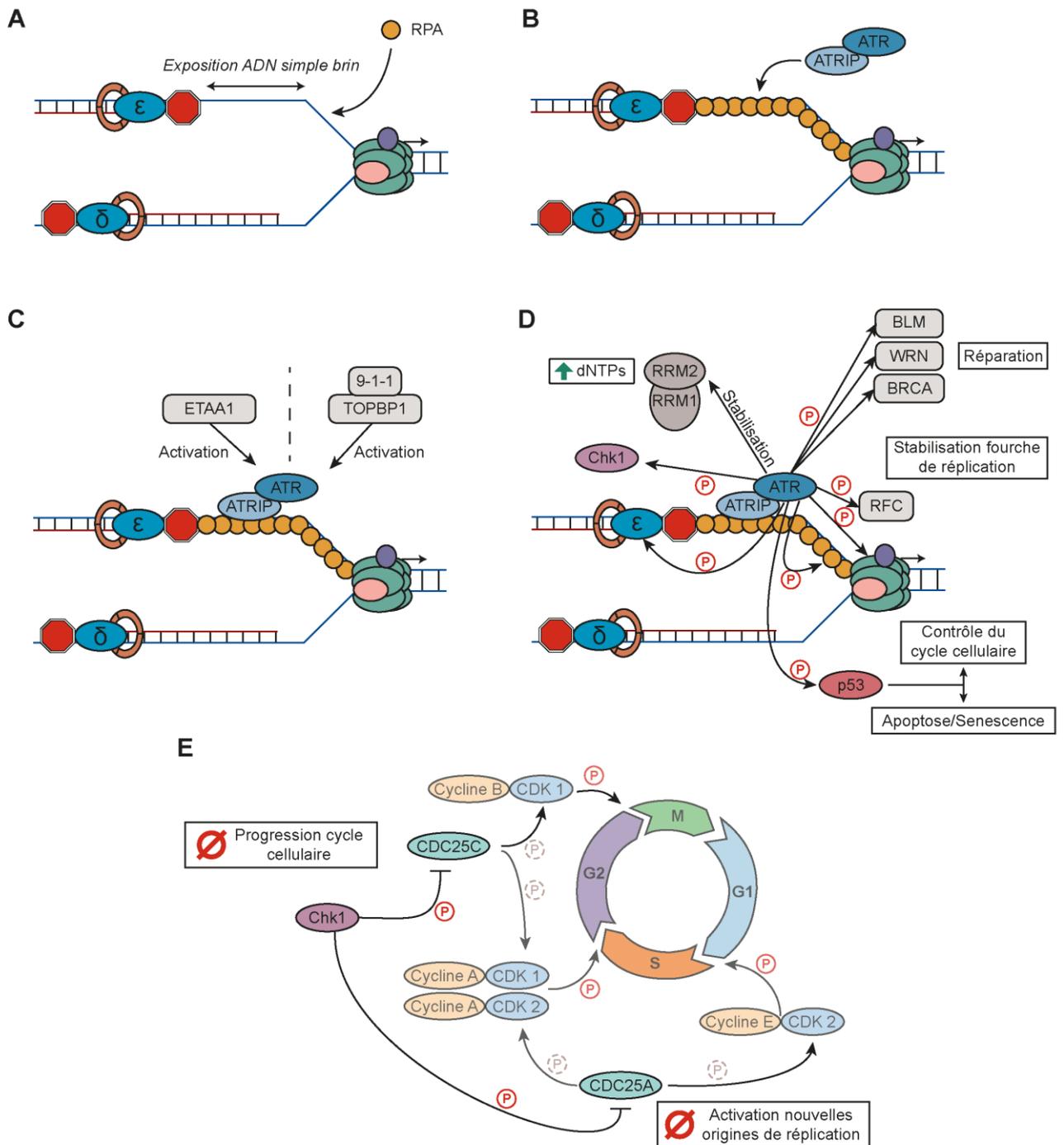


Figure 7 : La réponse au stress répliatif. (A) Reconnaissance de l'ADN simple Brin par la protéine RPA. (B) Recrutement d'ATR. (C) Activation d'ATR. (D) Les substrats d'ATR. (E) La régulation du cycle cellulaire par Chk1

2.2.1.1 L'importance de RPA pour la protection du génome

Une étude a mis en évidence l'importance de la voie de signalisation d'ATR et de Chk1 dans la protection du génome lors du stress réplicatif. En effet ces protéines interviennent dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de l'activation de nouvelles origines de réplication. Ceci permet d'éviter que de nouvelles fourches de réplication ne se retrouvent bloquées et exposent ainsi davantage de ssDNA. Si tel était le cas, la cellule devrait disposer d'une quantité de protéine RPA suffisante pour protéger l'intégralité du ssDNA ainsi généré. En absence de l'action d'ATR et de Chk1, la quantité de RPA n'est pas suffisante pour protéger l'ensemble du ssDNA généré et de très nombreuses CDBs apparaissent au sein du génome, conduisant à la mort cellulaire. En l'absence de l'action des protéines ATR et Chk1, le stress réplicatif peut ainsi provoquer un épuisement de la protéine RPA à l'origine de l'apparition de nombreuses CDBs et ceci peut expliquer l'efficacité des inhibiteurs d'ATR et de Chk1 dans le traitement des cancers (Toledo et al., 2014).

2.2.2 La réparation des CDBs

Si l'action de la RSR ne permet pas de lever le blocage des polymérase, la fourche de réplication peut s'effondrer et entraîner la formation d'une CDB. Dans ce cas (et également dans le cas de formation spontanée de CDB) des mécanismes de réponse spécifiques sont mis en place. On distingue 2 voies de réparation des CDBs : la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR).

2.2.2.1 La jonction d'extrémités non-homologues

La NHEJ fait intervenir en premier lieu les hétérodimères Ku-70/80 au niveau des extrémités de la CDB. Ces hétérodimères recrutent ensuite la kinase DNA-PKc (DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit) qui peut alors activer et recruter les facteurs nécessaires à la réparation : XRCC4 (X-ray Repair Cross-Complementing protein 4), XLF (XRCC4 Like Factor), PAXX, Artemis et l'ADN Ligase IV. La jonction de 2 extrémités franches d'une CDB est réalisée grâce à l'activité de la ligase IV en association avec XRCC4, XLF et PAXX (Figure 8). Si la CDB présente des extrémités cohésives, il a été montré que la nucléase Artemis est capable de digérer ces extrémités afin de former des extrémités franches, ligables par la ligase IV. La protéine 53BP1 (p53 Binding Protein 1) intervient également dans la NHEJ en empêchant la

résection de l'ADN, inhibant ainsi la réparation par HR (Goodwin and Knudsen, 2014; Pannunzio et al., 2018). Du fait de l'absence de reconnaissance de la séquence d'ADN des brins ligés, la réparation par NHEJ est souvent décrite comme pouvant introduire des erreurs dans la séquence d'ADN.

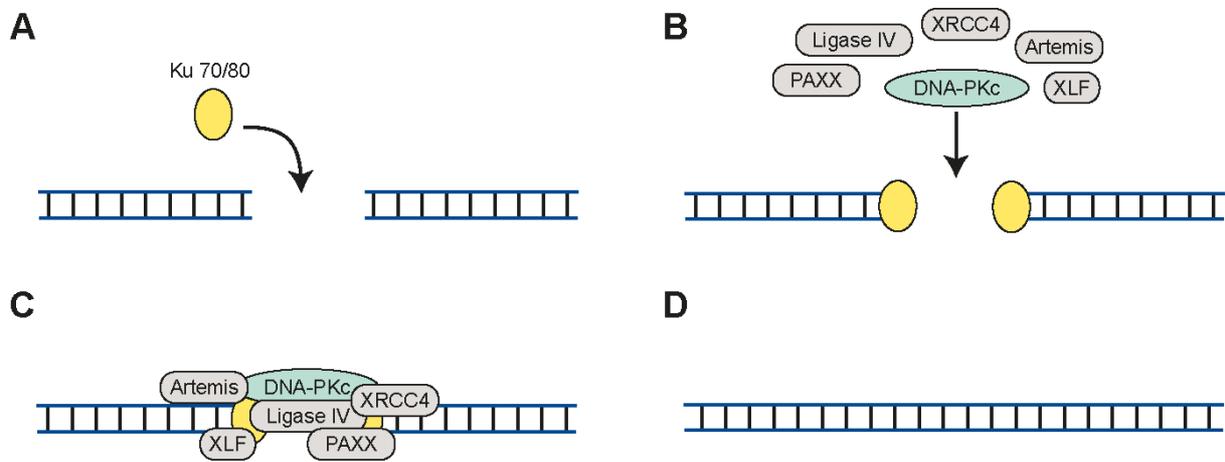


Figure 8 : Réparation des CDBs par Jonction des extrémités non homologues. (A) Recrutement de l'hétérodimère Ku 70/80 au niveau des CDBs. (B) Recrutement des facteurs de la NHEJ. (C) Ligation des brins d'ADN par l'ADN-ligase IV. (D) Complexe dissocié et brins d'ADN ligés. Adapté de Blackford & Jackson, 2017

2.2.2.2 La recombinaison homologue

L'autre mécanisme impliqué dans la réparation des CDBs est la HR, qui contrairement à la NHEJ, reconnaît la séquence d'ADN à réparer et se sert d'une séquence homologue comme modèle. La première étape de la HR est la reconnaissance de la CDB par le complexe MRN (MRE11-Rad50-NBS1) couplé à la kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated). La kinase ATM phosphoryle de nombreux substrats, notamment la protéine p53 ce qui participe à sa stabilisation ainsi que la protéine Chk2, qui comme dans le cas de Chk1, participe à l'arrêt du cycle cellulaire. Une fois la CDB reconnue par le complexe MRN, les brins d'ADN vont être digérés dans le sens 3'-5' par la protéine MRE11 associé à CtIP puis par la nucléase EXO1 exposant ainsi du ssDNA qui sera reconnu par RPA. La protéine BRCA2 va permettre le remplacement de RPA par Rad51. Les filaments d'ADN recouverts par Rad51 vont chercher une séquence d'ADN homologue sur la chromatide sœur. Cette séquence d'ADN homologue va servir de modèle pour prolonger le brin d'ADN endommagé par synthèse d'ADN. Ce brin d'ADN va ensuite se réappairer avec son brin complémentaire et les séquences d'ADN

précédemment digérées vont être resynthétisées et liguées (Figure 9). (Blackford and Jackson, 2017; Jones and Petermann, 2012; Liu and Huang, 2016).

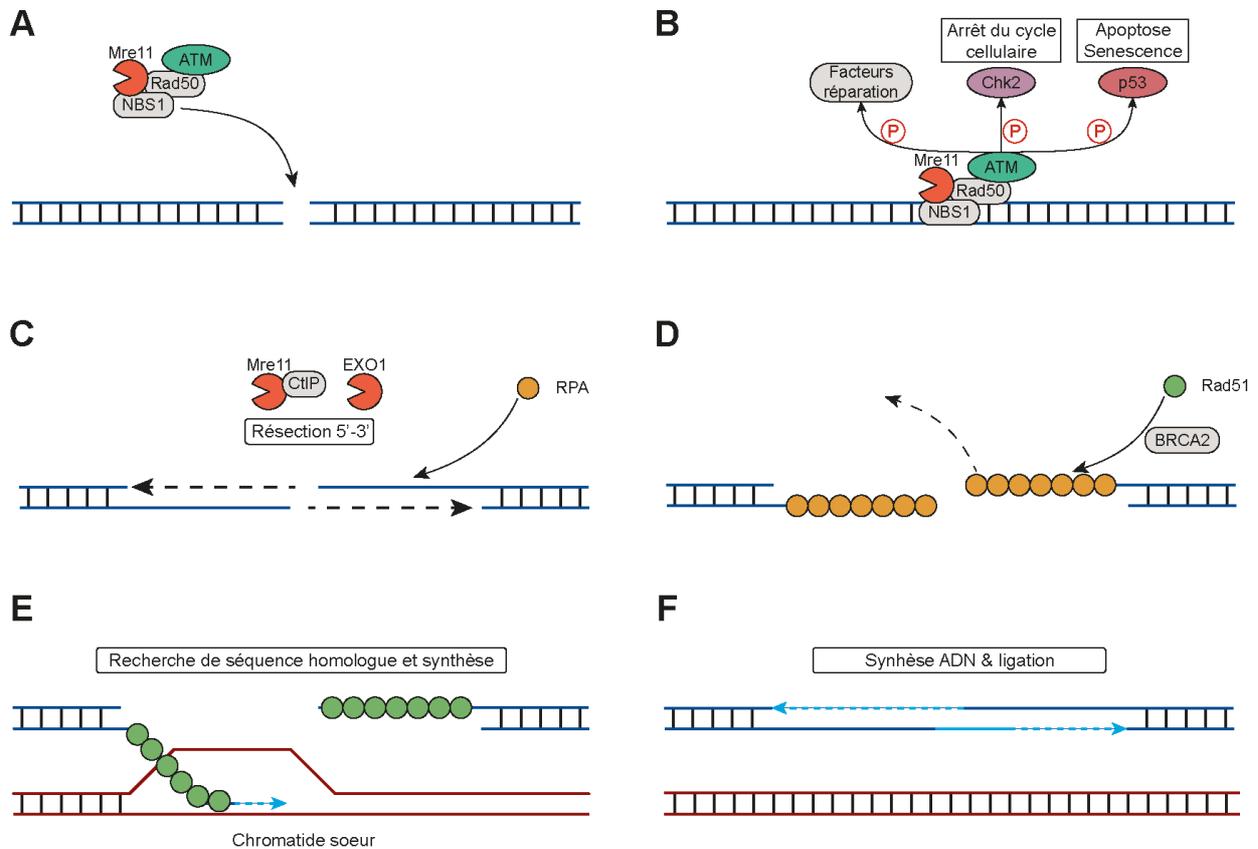


Figure 9 : Réparation des CDBs par recombinaison homologue. (A) Recrutement du complexe MRN en association avec ATM sur la CDB. (B) Phosphorylation par ATM. (C) Résection de l'ADN et recrutement de RPA. (D) Remplacement de RPA par Rad51. (E) Recherche de séquence homologue. (F) Synthèse d'ADN et ligation. Adapté de Wright et al., 2018

2.2.2.3 Le choix de la voie de réparation des CDBs

Le mécanisme dictant le choix de la réparation des CDBs par NEJ ou HR n'est pas encore parfaitement élucidé. Cependant, il semblerait que la réparation par HR soit restreinte à la phase S/G2 lorsqu'une chromatide sœur est disponible pour la recherche d'homologie (Kakarougkas and Jeggo, 2014). Deux protéines sont particulièrement décrites pour l'orientation de la réparation des CDBs vers la NHEJ ou la HR : 53BP1 et BRCA1 (Figure 10).

La protéine 53BP1, en inhibant la résection de l'ADN par MRE11 en association avec CtIP, favoriserait la réparation par NHEJ. La protéine BRCA1 quant à elle favoriserait la réparation par HR les 2 protéines s'excluant mutuellement au voisinage de la CDB (Ceccaldi et al., 2016). D'autres études ont également mis en évidence un rôle des modifications post-

traductionnelles des histones. Ainsi les segments d'ADN portant l'histone H3 tri-méthylé sur la lysine 36 (H3K36me3), marque des régions transcriptionnellement actives, seraient préférentiellement réparées par HR (Clouaire and Legube, 2015). De la même façon l'histone H4 di-méthylé sur la lysine 20 (H4K20me2), marque de l'ADN non répliqué, serait reconnu par la protéine 53BP1 via ses domaines Tudors, guidant ainsi la réparation par le mécanisme de NHEJ (Fernandez-Vidal et al., 2017; Pellegrino et al., 2017). L'histone H4 non méthylé sur la lysine 20 (H4K20me0), incorporé dans la chromatine après la réplication interagirait avec BRCA1 guidant ainsi la réparation vers la HR (Saredi et al., 2016).

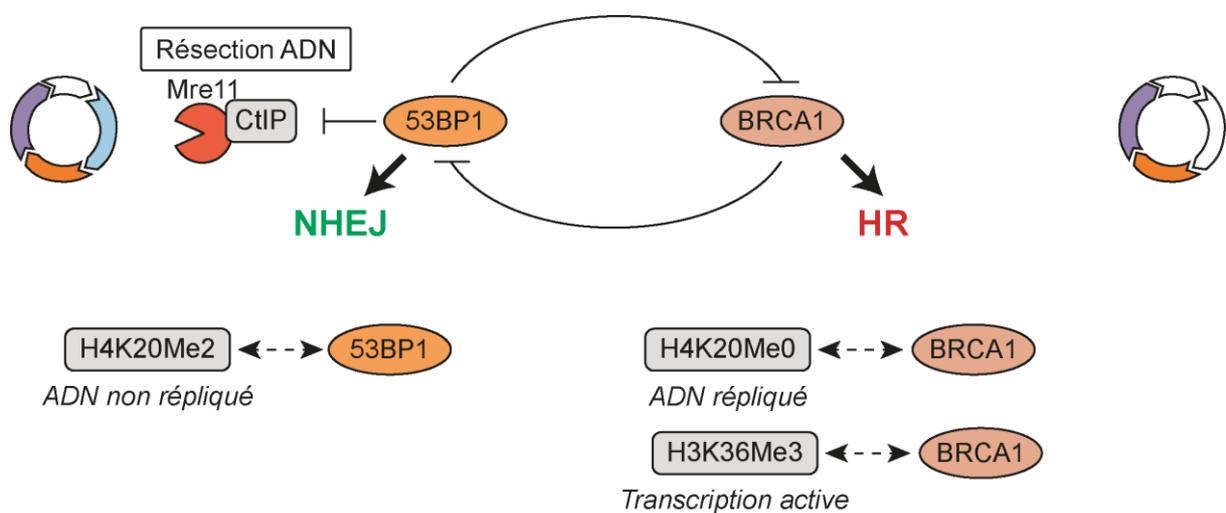


Figure 10 Les mécanismes favorisant la réparation des CDB par NHEJ ou HR

2.2.3 Les autres mécanismes de réparation

2.2.3.1 Réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est la voie de réparation qui traite les lésions telles que les désaminations, les oxydations et les méthylations pouvant toucher les bases de l'ADN. Parmi ces lésions, on peut citer les 8-oxoguanines, l'incorporation d'uraciles dans l'ADN par les polymérases en regard d'une adénine ou lors de désamination des cytosines ou encore les 3-méthylguanines et 3-méthyladénines (lésions pouvant être consécutives de l'exposition à des agents alkylants). La réparation par BER nécessite en premier lieu la reconnaissance de la lésion par une ADN glycosylase. Il existe plusieurs ADN glycosylases avec chacune une spécificité pour un type de lésion. Une fois la lésion reconnue, l'ADN glycosylase va séparer la base endommagée de la colonne sucre-phosphate créant un site apurique ou apyrimidique.

La colonne sucre-phosphate va ensuite être clivée par la glycosylase ou par une endonucléase (APE1). Le nucléotide excisé va ensuite être resynthétisé par une ADN polymérase (polymérase β le plus souvent). La polymérase peut soit synthétiser un nucléotide, il s'agit alors de la BER à synthèse courte et ce nucléotide va être ligué par la ligase III et XRCC1. La polymérase peut également synthétiser un brin plus long, de 8 à 10 nucléotides. Il s'agit alors de la BER à synthèse longue, les nucléotides en excès sont clivés par l'endonucléase FEN1 (Flap Endonuclease 1) et le nucléotide restant est ligué par la ligase I (Balliano and Hayes, 2015; Carter and Parsons, 2016).

2.2.3.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides (NER) est une voie de réparation traitant les lésions qui altèrent la structure de la double hélice d'ADN comme les dimères de pyrimidines ou les pontages intrabrin d'ADN. La NER est divisée en 2 sous catégories : la réparation sur l'ensemble du génome (GG-NER) et la NER couplée à la transcription (TC-NER).

Lors de la GG-NER, une lésion dans la double hélice d'ADN va être détectée par le complexe protéique XPC (Xeroderma Pigmentosum type C). Une fois la lésion reconnue, ce complexe va recruter le complexe TFIIH (Transcription Factor IIH) dont l'activité hélicase de ses 2 sous-unités XPB et XPD va permettre de séparer les brins d'ADN de part et d'autre de la lésion à la recherche d'un blocage dû aux dommages. La séparation des 2 brins d'ADN provoque le recrutement de la protéine RPA sur le brin opposé. La protéine XPA, capable de lier au nucléotide avec une structure modifiée, va permettre le recrutement des endonucléases XPF-ERCC1 et XPG qui vont exciser un fragment d'ADN de 20 à 30 nucléotides. Le fragment excisé est resynthétisé par des ADN polymérases (δ , ϵ ou κ) et ligué par la ligase I ou la ligase III et XRCC1. La réparation lors de la TC-NER implique les mêmes complexes protéiques mais la détection de la lésion se produit lors du blocage de l'ARN polymérase II par celle-ci. Ce blocage provoque le recrutement des protéines CSA et CSB puis de l'ensemble des protéines impliquées dans la réparation et décrites précédemment (Marteijn et al., 2014).

2.2.3.3 Synthèse translésionnelle

Bien que les voies de réparation par BER et NER permettent de réparer les nucléotides endommagés, évitant ainsi le blocage des fourches de réplication, certaines de ces lésions peuvent ne pas avoir été traitées avant le déclenchement de la phase S. Lorsque cela est le

cas, les ADN polymérases répliquatives sont bloquées par ces lésions et la cellule utilise alors la synthèse translésionnelle (TLS) pour permettre la progression des fourches de réplication. Cette TLS fait appel aux polymérases ζ (famille B), η , κ , ι (famille Y) qui possèdent un site actif plus large, capable de d'accueillir les nucléotides endommagés afin de poursuivre la synthèse de l'ADN. Ce site actif plus large est également à l'origine d'un taux d'erreur plus élevé. La TLS est un processus se passant en 2 étapes : une étape d'insertion au cours de laquelle le nucléotide en face de la base endommagée est synthétisé (par les polymérases η ou ι) et une phase d'extension où plusieurs nucléotides sont synthétisés en aval de la lésion par les polymérases κ ou ζ . Au cours de la TLS, PCNA monoubiquitinée sert de plateforme permettant l'interaction et la régulation des polymérases de la TLS (Vaisman and Woodgate, 2017).

2.3 L'évaluation de la génotoxicité

Les dommages à l'ADN et leur réparation peuvent être à l'origine de l'apparition de mutations au sein du génome. L'environnement ainsi que les différents composés présents dans des produits utilisés quotidiennement sont des sources potentielles d'agents génotoxiques et il est crucial de pouvoir évaluer leur potentiel carcinogène afin de réguler notre exposition à ces agents. Ces évaluations sont réalisées notamment par les industries pharmaceutiques, agro-alimentaires ou cosmétiques. En fonction des législations appliquées, les composés sont en premier lieu évalués avec un ensemble de tests *in vitro* et un l'obtention d'un résultat positif conduit généralement à l'évaluation du composé par des tests *in vivo*.

Le test d'Ames est un des tests *in vitro* utilisés pour évaluer la génotoxicité. Ce test mis au point en 1973 se base sur l'utilisation de souches de bactéries mutées dans la voie de synthèse d'un acide aminé. Si après exposition à une substance, ces bactéries sont capable de pousser sur un milieu privé de l'acide aminé en question, ceci indique que la substance à un pouvoir mutagène (Zeiger, 2019).

La génotoxicité peut également être évaluée grâce au tests des micronuclei *in vitro*. Ce test permet, par le recensement de l'apparition de micronuclei dans des cellules traitées avec différents composés chimiques, de déterminer si ces derniers endommagent la molécule d'ADN. Ce test permet de distinguer les substances aneugènes (provoquant une aneuploïdie) et les substances clastogènes (à l'origine de mutations ou d'aberrations structurale dans les chromosomes) (OCDE, 2014).

Malheureusement les tests utilisés à l'heure actuelle peuvent générer beaucoup de « faux-positifs » ce qui a pour conséquences d'augmenter inutilement le nombre de tests *in vivo*. L'identification de nouveaux biomarqueurs associée au développement de nouveaux tests de génotoxicité pourrait permettre d'affiner les résultats obtenus lors des tests *in vitro* et donc de diminuer le recours à l'expérimentation animale (Corvi and Madia, 2017). La phosphorylation de l'histone H2AX est un biomarqueur potentiel proposé pour évaluer la génotoxicité.

3 L'histone H2AX

3.1 L'organisation de la chromatine

L'information génétique d'une cellule eucaryote est contenue dans la molécule d'ADN dont la longueur totale avoisine les 2 mètres. Au sein du noyau des cellules, l'ADN est compacté dans une structure appelée chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome (Figure 11). Cette structure consiste en l'enroulement de 147 paires de bases d'ADN autour d'une structure protéique composée de 8 histones : 2 histones H2A, 2 histones H2B, 2 histones H3 et 2 histones H4. Cette structure est stabilisée par l'histone H1. 2 nucléosomes successifs sont séparés par un linker d'ADN de 20 à 80 paires de bases. La succession des nucléosomes constitue la fibre de 10 nm, premier niveau de compaction de l'ADN (Maeshima et al., 2014). Au sein du noyau, la chromatine présente différents niveaux de compaction supérieurs, permettant de distinguer l'euchromatine (relâchée) et l'hétérochromatine (compactée).

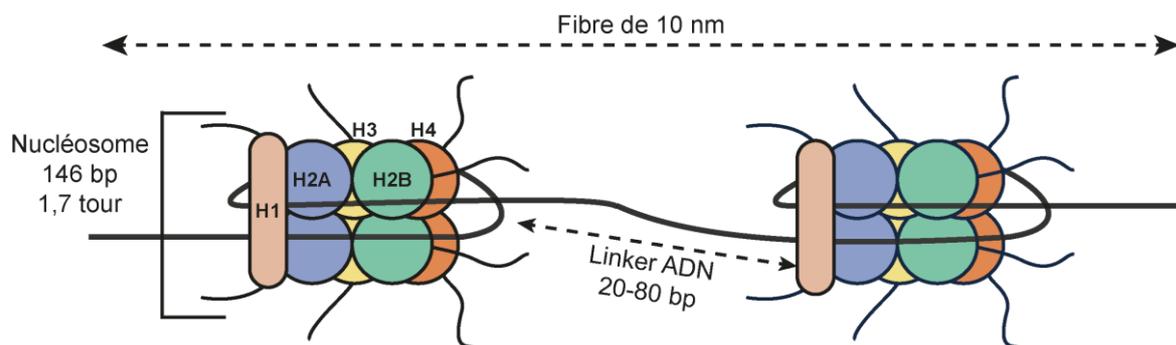


Figure 11 : Le nucléosome et la fibre de 10 nm. bp = paire de bases

Les histones sont des protéines globulaires d'une taille comprise entre 10 et 20 kDa possédant une queue N-terminale (ainsi qu'une queue C-terminale dans le cas de H2A) (Iwasaki et al., 2013). En plus des histones canoniques citées précédemment, des variants de ces histones sont également présents au sein de certains nucléosomes. On peut citer par exemple l'histone H3 centromérique (CENP-A) ainsi que les variants de l'histone H2A (H2AX, H2AZ, macroH2A). Ces variants se distinguent par une séquence d'acides aminés différente (Yuan and Zhu, 2012) et ils sont impliqués dans des processus biologiques particuliers, expliquant leur localisation en des endroits précis du génome. Les gènes codants pour les histones canoniques sont regroupés en différents clusters contenant chacun plusieurs copies des gènes de chaque

histone, tandis que les variants d'histones sont codés par 1 à 2 gènes seulement (Buschbeck and Hake, 2017; Tripputi et al., 1986).

Les histones sont sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs), ces MPTs se retrouvent principalement sur les acides aminés du domaine N-terminal (et C-terminal dans le cas de H2A) et participent à la régulation de nombreux processus biologiques tels que la transcription, la réparation de l'ADN, la dynamique de la chromatine, la division cellulaire. Parmi les modifications les plus documentées, on trouve la méthylation (lysines et arginines), l'acétylation (lysine), l'ubiquitination (lysine) et la phosphorylation (sérine, tyrosine) (Huang et al., 2015).

Ces MPTs sont mises en place et supprimées par des protéines spécifiques (*writers* et *erasers* respectivement) et sont lues par des protéines appelées *readers* (Audia and Campbell, 2016). Ces modifications sont décrites dans la littérature comme prenant place sur certaines régions du génome (enhancer, promoteurs exons,...), régulant ainsi par exemple l'expression des gènes (Zhou et al., 2011).

3.2 H2AX, variant de l'histone H2A

L'histone H2AX est un variant de l'histone H2A, et il représente, suivant le type cellulaire ou le tissu considéré, de 2 à 25% du contenu total en H2A. H2AX se distingue de H2A par la présence d'une queue C-terminale plus longue, intégrant un motif SQEY à son extrémité (Redon et al., 2012; Srivastava et al., 2009). La sérine de ce motif est principalement phosphorylée par les kinases de la famille PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinases) : ATM, ATR et DNA-PK (Georgoulis et al., 2017). H2AX est impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN où sa forme phosphorylée (γ -H2AX) est impliquée dans la signalisation des lésions à l'ADN. En dehors de son rôle ubiquitaire dans la réparation des dommages à l'ADN, γ -H2AX est également impliqué dans la recombinaison méiotique lors de la formation des spermatozoïdes ainsi que la recombinaison V(D)J dans les lymphocytes T et B et la commutation de classe dans les lymphocytes B (Fernandez-Capetillo et al., 2004).

Des modèles murins ne possédant pas H2AX ont pu être générés, montrant ainsi que la perte de H2AX n'est pas létale. Cependant, les résultats des études menées sur de tels modèles ont montré que ces individus présentent un retard de croissance, une instabilité génomique et une sensibilité aux rayonnements ionisants accrue. De plus ces souris possèdent un déficit

lymphocytaire et les mâles sont infertiles, montrant ainsi l'importance de ce variant de H2A dans les processus biologiques décrits précédemment (Celeste et al., 2002).

A l'échelle cellulaire cependant, notre équipe a récemment mis en évidence que l'absence de l'histone H2AX n'a pas d'incidence sur la survie cellulaire ou la réponse des cellules au stress réplicatif (Moeglin et al., 2019).

3.2.1 Les modifications post-traductionnelles de H2AX (Figure 12)

Comme les autres variants d'histones, H2AX est sujet à différentes MPTs importantes pour la régulation de divers processus au sein de la chromatine (Figure 12). Parmi les MPTs documentées, résumées en Figure 12, on peut citer l'acétylation de la lysine 5 (K5Ac) par TIP60, il a été montré que cette acétylation était nécessaire pour l'ubiquitination de H2AX par un mécanisme impliquant l'E2-ligase UBC13 (Ubiquitin-Conjugating enzyme E2) (Ikura et al., 2007). La SUMOylation d'H2AX par PIAS4, une SUMO-E3ligase a été mise en évidence (Chen et al., 2013). H2AX peut également être méthylé sur la lysine 134 par SUV39H2 ce qui favorise l'interaction d'H2AX avec les kinases ATM et ATR (Sone et al., 2014). H2AX peut également être ubiquitiné sur les lysines 13 et 15 par RNF-168 et les lysines 118 et 119, possiblement par le complexe Polycomb. Le rôle de l'ubiquitination sur les lysines 118 et 119 n'a pas encore été identifié alors que les lysines 13 et 15 ubiquitinées jouent un rôle dans la RDA.

H2AX peut également être phosphorylé sur la sérine 139 (S139) et la tyrosine 142 (Y142). La sérine 139 phosphorylée est la MPT la plus décrite dans la littérature (γ -H2AX), classiquement les kinases décrites comme étant à l'origine de cette phosphorylation sont ATM, ATR et DNA-PK, une étude cependant a également mis en évidence que la kinase N-terminale de cJUN (JNK) pouvait phosphoryler H2AX en S139 et que cette phosphorylation intervient dans un contexte pro-apoptotique (Lu et al., 2006). La phosphorylation de la tyrosine 142 a fait l'objet de plusieurs études, il a notamment été proposé qu'H2AX était constitutivement phosphorylé en Y142 du fait de l'action de la kinase WSTF (Williams-Beuren syndrome Transcription Factor) (Xiao et al., 2009). Lors de la détection de dommages à l'ADN, cette phosphorylation serait retirée par la phosphatase EYA (Eyes Absent) lorsque H2AX est phosphorylé en S139. Cette déphosphorylation semble orienter la RDA vers la survie cellulaire, des études ont en effet proposé que la présence simultanée des phosphorylations en S139 et Y142 constitue un signal pro-apoptotique (Brown et al., 2012; Cook et al., 2009).

La phosphorylation de la S139 peut être retirée par plusieurs phosphatases : WIP1, une phosphatase induite par p53 et active lorsque les lésions à l'ADN sont réparées (Cha et al., 2011). γ -H2AX peut également être déphosphorylé par les phosphatases de la famille PPP (PhosphoProtein Phosphatases) telles que PP4, une phosphatase impliquée dans la récupération du checkpoint et localisée au niveau des CDBs (Nakada et al., 2008) ; PP2A (Chowdhury et al., 2005) et PP6, une phosphatase interagissant avec DNA-PK (Douglas et al., 2010). La régulation précise de la déphosphorylation n'est en revanche pas élucidée et il a été proposé que les nucléosomes contenant γ -H2AX pourrait être remplacés par des nucléosomes contenant H2A ou H2AX, notamment par la protéine chaperonne FACT (Heo et al., 2008).

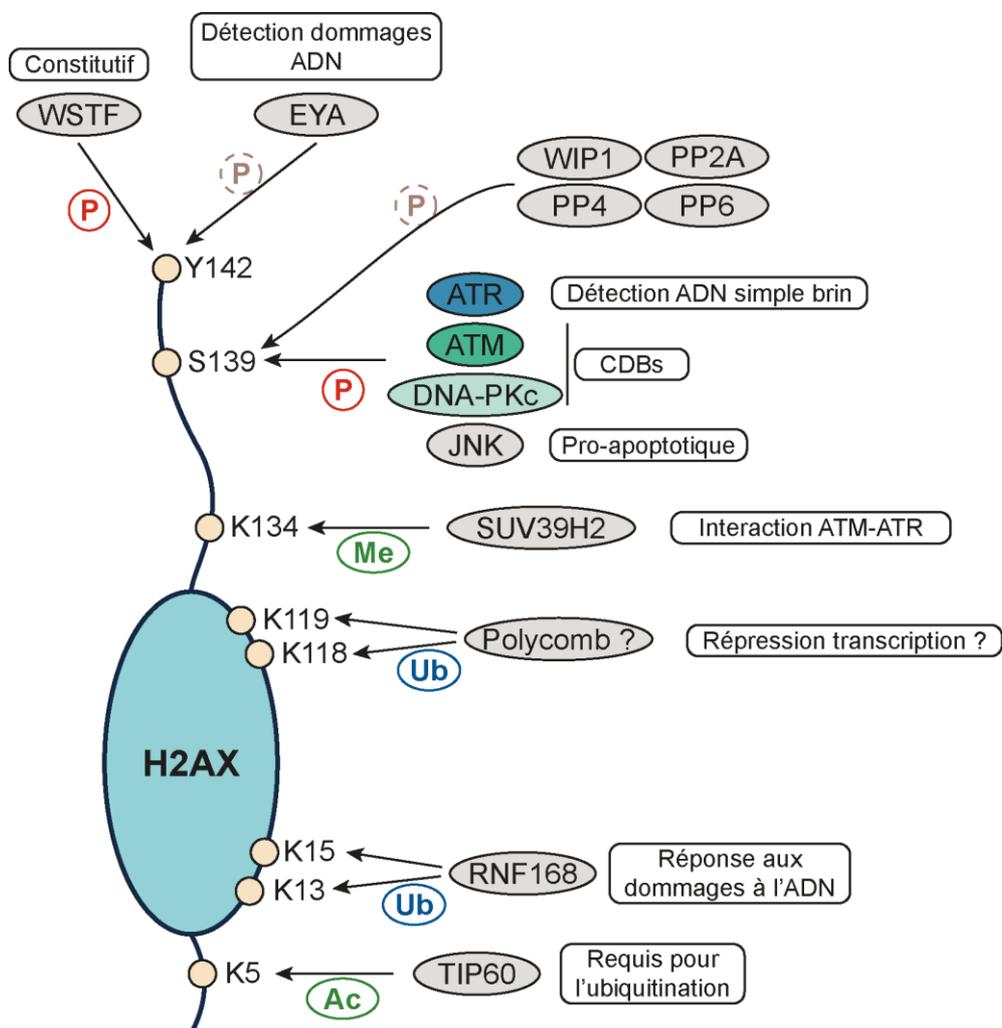


Figure 12 : Vue d'ensemble des modifications post-traductionnelles de H2AX et des processus dans lesquels elles sont impliquées

3.3 γ -H2AX et la réponse aux dommages à l'ADN (Figure 13)

La phosphorylation d'H2AX sur la sérine 139 est un évènement précoce dans la RDA. H2AX est phosphorylé rapidement après la détection d'une CDB ou de ssDNA et cette phosphorylation se propage très rapidement en cis sur le brin d'ADN touché (Iacovoni et al., 2010; Srivastava et al., 2009). Il a récemment été montré que lors de la détection de dommages à l'ADN, la protéine chaperonne FACT est impliquée dans le remplacement des histones H2AZ par H2AX à proximité du site des dommages contribuant ainsi à un enrichissement local en H2AX (Piquet et al., 2018)

3.3.1 La phosphorylation de H2AX dans le contexte des CDBs

A l'heure actuelle, le rôle de H2AX dans les processus de la RDA est principalement décrit lors de l'implication de la kinase ATM suite à la détection d'une CDB (Figure 13). La détection de la CDB par le complexe MRN en association avec ATM entraîne la phosphorylation de H2AX. γ -H2AX est ensuite reconnu par la protéine MDC-1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1) via son tandem de domaines BRCT (tBRCT), cette interaction permet de protéger γ -H2AX des différentes phosphatases et également d'amener d'avantage de complexes MRN-ATM au voisinage de la CDB (Coster and Goldberg, 2010). Il a été montré que l'interaction entre MDC-1 et le complexe MRN pouvait se faire en dehors des CDBs, ce complexe préassemblé pouvant alors reconnaître γ -H2AX (Spycher et al., 2008). Au cours de ces évènements, MDC-1 est phosphorylé par ATM, ce qui permet le recrutement de RNF8 (Ring Finger Protein 8). RNF8 est une E3-Ubiquitin ligase qui, en association avec UBC13, va polyubiquitiner l'histone H1 en formant des chaînes d'ubiquitine liées en K63 (Thorslund et al., 2015; Uckelmann and Sixma, 2017). L'histone H1 polyubiquitinée va être reconnue par RNF168, une autre E3-Ubiquitine ligase, via son module UDM1. Après son recrutement, RNF168 va pouvoir monoubiquitiner H2A/H2AX sur les lysines 13 et 15, ce qui peut conduire à la polyubiquitination de ces résidus par un mécanisme encore non identifié (Mattioli et al., 2012). L'ubiquitination de H2A/H2AX est impliqué dans le recrutement des protéines BRCA1 et 53BP1 impliquées respectivement dans la réparation par HR et par NHEJ, ces protéines s'excluant mutuellement. Le choix de la voie de réparation semble donc dépendre du statut de la chromatine comme présenté précédemment, mais il semblerait également que l'ubiquitination d'H2A/H2AX participe à cette régulation. Les mécanismes précis restent

encore à découvrir, mais il est décrit que 53BP1 peut reconnaître H2A-K15-Ub1 via son tandem de domaines TUDOR (tTUDOR) (Uckelmann and Sixma, 2017). De plus, des études sur l'implication des désubiquitinyases ont montré que la désubiquitination de H2A/H2AX sur les lysines 13-15 par USP3 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3) diminuait grandement le recrutement de 53BP1 et BRCA1 au niveau des CDBs (Sharma et al., 2014). USP11, responsable de la désubiquitination de γ -H2AX sur une lysine non identifiée augmenterait le temps de rétention de 53BP1 au niveau des CDBs (Yu et al., 2016). Ainsi le dosage de l'ubiquitination d'H2AX et d'H2A par les E3-ligases et les désubiquitinyases semble participer à la régulation du choix du mode de réparation des CDBs (Nakada, 2016).

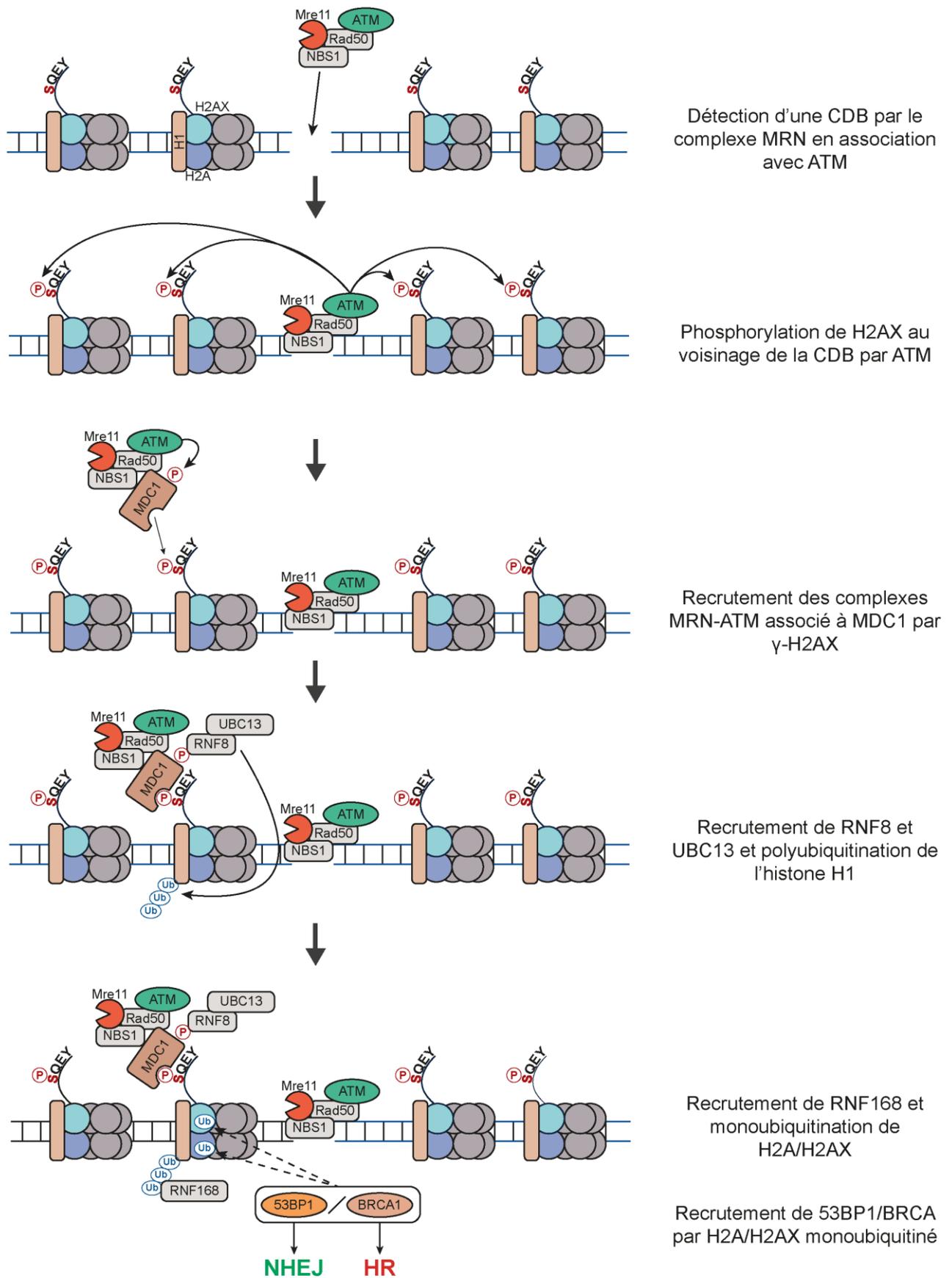


Figure 13 : Le rôle de H2AX dans la réparation des cassures double-brin d'ADN

3.3.2 La phosphorylation de H2AX lors du stress répliatif

En plus de sa phosphorylation consécutive à la détection d'une CDB, l'histone H2AX est également phosphorylé lors du déclenchement de la RSR. Dans ce cas H2AX est phosphorylé par la kinase ATR suite à la détection du ssDNA exposé du fait du découplage entre l'hélicase et les polymérase lors du blocage des fourches de répliation (Figure 14) (Jones and Petermann, 2012).

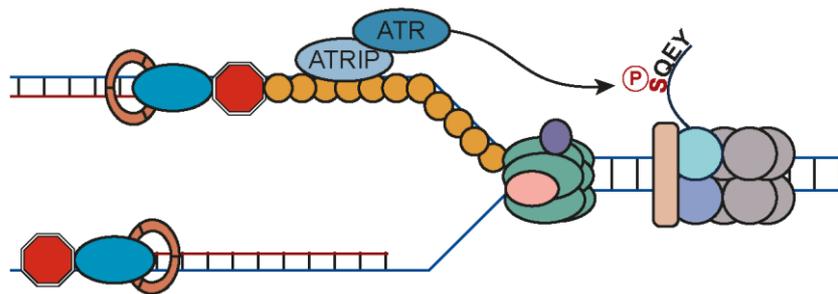


Figure 14 : Phosphorylation de H2AX en réponse au stress répliatif

3.4 L'utilisation de γ -H2AX comme biomarqueur

La phosphorylation de H2AX lors de la détection de dommages à l'ADN est un événement très précoce lors du déclenchement de la RDA. Cette phosphorylation intervient à la fois suite à la détection de CDBs mais aussi lors de la RSR ce qui permet d'envisager l'utilisation de γ -H2AX comme indicateur du niveau du stress répliatif. H2AX est une protéine ubiquitaire, présente dans l'ensemble des tissus et sa détection à l'aide d'anticorps permet d'utiliser plusieurs techniques communes pour sa détection (Figure 15). Ainsi la détection de γ -H2AX par tests ELISA (Ji et al., 2017) ou Western-Blot (Zhang et al., 2012) permet d'évaluer l'intensité de γ -H2AX à l'échelle d'une population cellulaire. Les méthodes de détection de γ -H2AX par immunofluorescence (Geißler et al., 2019) ou cytométrie en flux (Banáth et al., 2010) permettent quant à elles de quantifier les niveaux de γ -H2AX dans des cellules individuelles.

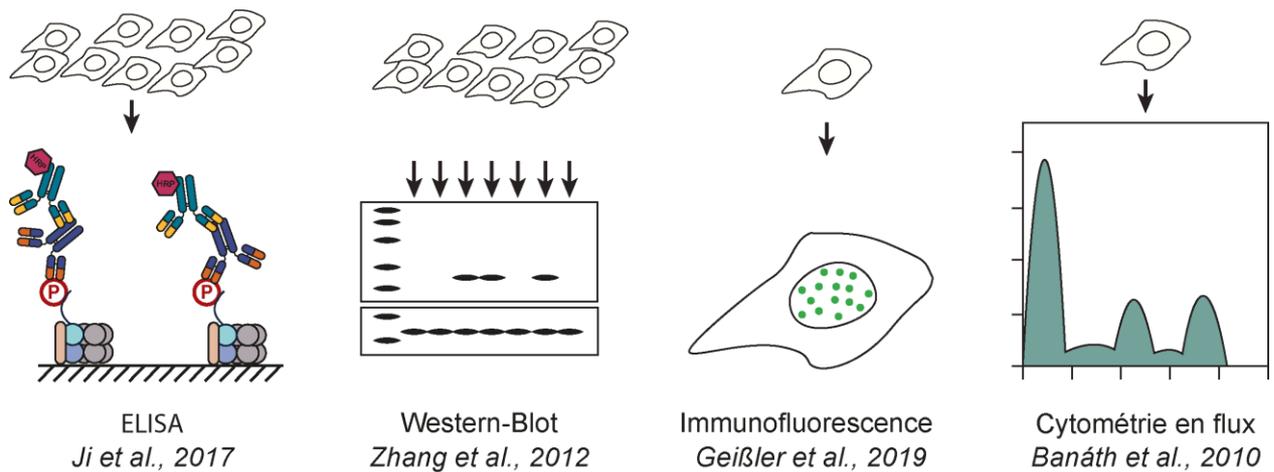


Figure 15 : Les principales techniques utilisées pour la détection et la quantification de γ -H2AX in vitro. Des références d'études ayant mis en œuvre les différentes techniques sont indiquées

L'approche de détection de γ -H2AX par microscopie présente l'avantage de permettre le dénombrement du nombre de foyers de γ -H2AX par cellule et apparaît comme la méthode de détection la plus sensible. Ces éléments font de γ -H2AX un candidat comme biomarqueur du stress répliatif et de la génotoxicité. Plusieurs études ont déjà utilisé ce marqueur en complément des tests classiquement utilisés afin d'évaluer l'efficacité de γ -H2AX pour déterminer le potentiel carcinogène de composés (Kopp et al., 2019).

3.4.1 L'utilisation de γ -H2AX comme marqueur pour évaluer la génotoxicité

L'efficacité de γ -H2AX comme marqueur pour le criblage de la génotoxicité de composés a été évaluée à plusieurs reprises. Une étude a notamment développé une méthodologie de détection de γ -H2AX dans des cellules hépatiques (HepG2) possédant les voies métaboliques permettant de reproduire l'activation hépatique de certains composés au sein d'un organisme. L'utilisation de γ -H2AX a été comparée aux tests validés pour l'évaluation de composés. L'évaluation de l'efficacité de γ -H2AX comme marqueur a été réalisée sur un ensemble de composés définis par le Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM). Les résultats ont montré que l'utilisation γ -H2AX pouvait fournir des résultats équivalents au test d'Ames tout en étant plus rapide et plus simple à mettre en œuvre (Khoury et al., 2013). Les tests de génotoxicité doivent également permettre de mettre en évidence le mode d'action des composés, c'est-à-dire s'ils ont un effet clastogène (ils endommagent l'ADN) ou aneugène (ils conduisent à des anomalies du nombre de

chromosomes). La détermination du mode d'action fait appel à des techniques laborieuses et ne sont pas adaptables au criblage à haut-débit. Une équipe a développé un test basé sur la détection des micronuclei associée à la détection de γ -H2AX pour déterminer le mode d'action et cette approche s'est montrée fonctionnelle et adaptable au criblage haut-débit (Takeiri et al., 2019). Ces 2 études sont des exemples d'applications potentielles de γ -H2AX dans le cadre du criblage de la génotoxicité.

3.4.2 γ -H2AX : un marqueur pour le stress répliatif létal ?

Lors du traitement de cellules cancéreuses avec des molécules ou des agents génotoxiques, l'objectif poursuivi est de générer des dommages à l'ADN excédant les capacités de réparation de la cellule. Un indicateur d'un tel dépassement pourrait ainsi trouver une application aussi bien en clinique que lors de la recherche de nouvelles molécules génotoxiques.

Les résultats d'une étude qui a mis en évidence la létalité synthétique observée lors du traitement simultané de cellules cancéreuses avec des inhibiteurs de ATR et de Chk1 ont montré que ces cellules présentaient un marquage γ -H2AX étendu à l'ensemble du noyau (pan-nucléaire) associé à une perte de la survie cellulaire (Sanjiv et al., 2016).

Des travaux menés dans notre laboratoire ont également montré que le stress répliatif létal provoqué par le blocage de PCNA à l'aide d'anticorps vectorisés dans les cellules vivantes provoquait également l'apparition d'un marquage γ -H2AX étendu à l'ensemble du noyau (Desplancq et al., 2016) (Figure 16).

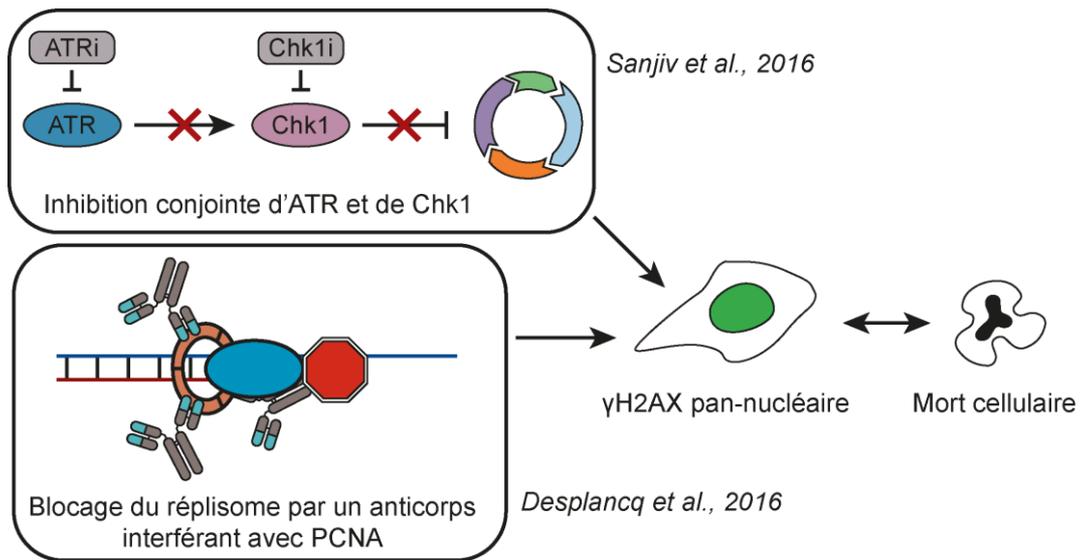


Figure 16 : Description du marquage pan-nucléaire associé au stress répliatif létal dans la littérature

Ces observations laissent présager que l'extension de la phosphorylation de H2AX à l'ensemble du compartiment nucléaire pourrait être un indicateur de la létalité du stress répliatif consécutive d'un dépassement de la capacité de réparation des dommages à l'ADN de la cellule.

4 Les outils pour la détection des modifications post-traductionnelles

γ -H2AX correspond à la forme phosphorylée sur la sérine 139 de l'histone H2AX. Cette phosphorylation est une MPT et à l'heure actuelle, les seuls outils permettant la détection et le suivi des MPTs sont les anticorps et leur fragments dérivés. Au cours de notre étude de γ -H2AX, nous avons généré 2 réactifs capable de détecter γ -H2AX : un anticorps monoclonal et un VHH. Dans cette section seront présentées les principales caractéristiques des anticorps et des VHHs.

4.1 Les anticorps :

Les anticorps sont des protéines circulantes sécrétées par les lymphocytes B et présentes dans le sérum. Ces protéines sont capables de reconnaître avec une très grande précision un antigène et sont donc des outils précieux en recherche comme en thérapeutique.

4.1.1 Structure des anticorps

Les anticorps sont des protéines hétéro-tétramériques constituées de l'association de 2 chaînes lourdes chacune associée à une chaîne légère. Le poids moléculaire moyen d'un anticorps est de 150 kDa.

4.1.1.1 Le domaine immunoglobuline

L'unité structurelle de base de l'anticorps est le domaine immunoglobuline (domaine Ig). Le domaine Ig est un domaine globulaire contenant environ 110 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 12,5 kDa. Il est constitué de 7 feuillets de brins β organisés en 2 groupes antiparallèles (A, B, E, D) et (C, F, G). Ces 2 groupes sont stabilisés par un pont disulfure reliant des cystéines situées dans les brins B et F ainsi que par d'autres interactions non-covalentes entre les acides aminés des différents feuillets. L'organisation structurelle des domaines variable des anticorps est légèrement différente. En effet, ceux si sont constitués 9 feuillets de brins β antiparallèles organisés en 2 groupes de (A, B, E, D) et (C'', C', C, F, G) (Figure 17) (Chiu et al., 2019).

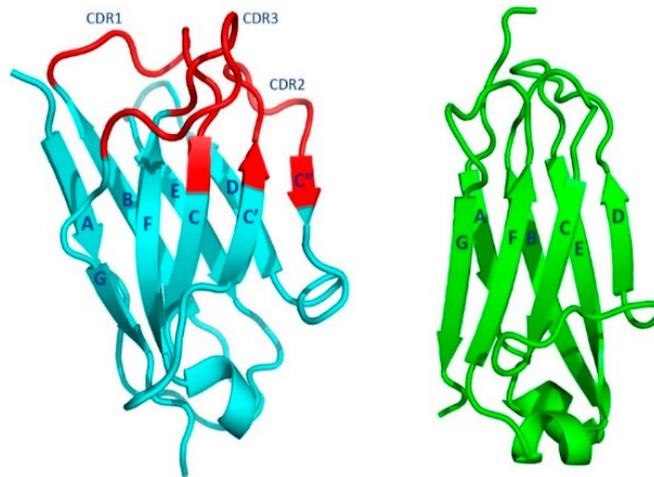


Figure 17 : Structure cristallographique d'un domaine immunoglobuline variable (gauche, domaine variable de la chaîne lourde du Fab 388, PDBid 5i1a) et d'un domaine immunoglobuline constant (droite, domaine constant de la chaîne légère du Fab 5844, PDBid 5i18). Illustration provenant de Chiu et al., 2019

4.1.1.2 La chaîne lourde des anticorps

Les chaînes lourdes des anticorps sont constituées de 4 à 5 domaines Ig avec un domaine variable à l'extrémité N-terminale (VH) et 3 ou 4 domaines constants à l'extrémité C-terminale (CH1-3/4). Une région charnière ou hinge sépare le domaine CH1 du domaine CH2. Le poids moléculaire d'une chaîne lourde est en moyenne de 50 kDa (Figure 18A).

4.1.1.3 La chaîne légère des anticorps

La chaîne légère contient 2 domaines Ig : 1 domaine variable (VL) et un domaine constant (CL). Son poids moléculaire moyen est de 25 kDa. Les chaînes légères peuvent être de type κ ou λ (Schroeder and Cavacini, 2010) (Figure 18A).

4.1.1.4 L'association des anticorps en hétérotétramères

Les chaînes lourdes sont associées entre elles par des ponts disulfures de nombre variable localisés dans la région hinge. Les chaînes lourdes et légères sont associées entre-elles par des ponts disulfures reliant le domaine CH1 au domaine CL. En plus de ces ponts disulfures, les anticorps sont stabilisés par de nombreuses interactions non covalentes impliquant les résidus des différentes chaînes, notamment des interactions hydrophobes (Wang et al., 2007) (Figure 18B).

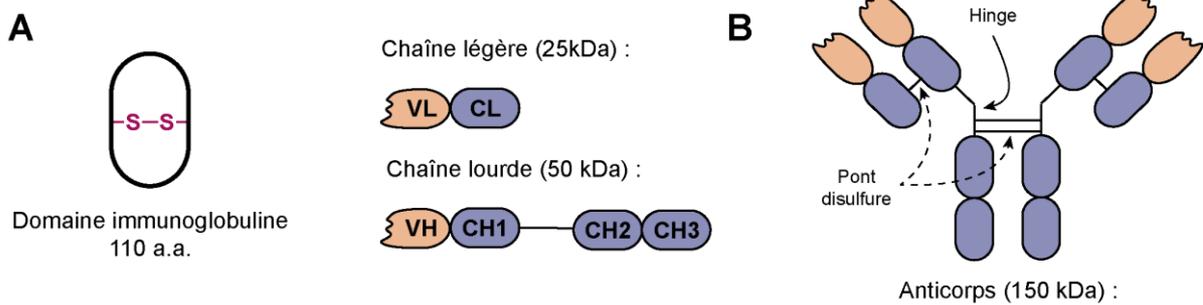


Figure 18 : Structure d'un anticorps (A) Schématisation d'un domaine immunoglobuline et de son assemblage en chaîne lourde ou légère. (B) Représentation de l'assemblage hétérotétramérique formant un anticorps

4.1.1.5 Les fragments dérivés des anticorps

La digestion des anticorps à l'aide de protéases permet de scinder les anticorps en différents fragments fonctionnels. La digestion à la papaïne donne lieu à la formation de 2 fragments Fabs constitués des domaines VL-CL en association avec les domaines VH-CH1 ainsi que d'un fragment cristallisable (Fc) constitué des domaines CH2-CH4 ou CH2-CH5. La digestion à la pepsine donne lieu à la formation d'un fragment F(Ab)'2 constitué de 2 fragments Fabs reliés entre eux par les ponts disulfures présents au niveau de la région hinge (Lipman et al., 2005) (Figure 19).

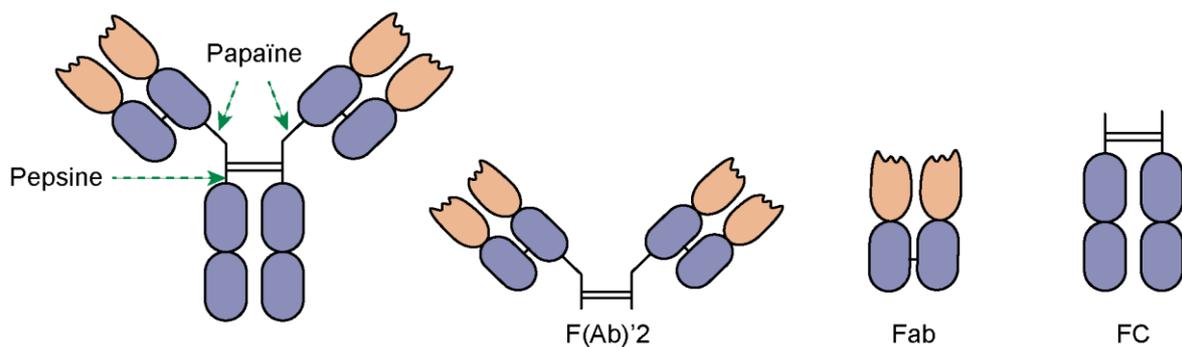


Figure 19 : Fragments d'anticorps issus de la digestion à la pepsine ou à la papaïne

4.1.5.1 Le fragment Fab

Le fragment Fab est capable de reconnaître l'antigène, et plus précisément un épitope au sein de l'antigène. L'épitope est reconnu par un anticorps au niveau de son paratope. Le paratope

d'un anticorps est constitué par l'association des domaines VH et VL. Ces domaines possèdent chacun 3 boucles hypervariables ou CDR (Complementarity Determining Region) dont la grande variabilité de séquence permet aux anticorps de reconnaître une très grande variété d'antigènes. Au sein des domaines variables, les séquences CDR sont entourées de séquences charpentes (Framework, FR). La variabilité des séquences des CDR est la conséquence de mécanismes prenant place lors du développement des cellules B et sera traitée en même temps que l'organisation des gènes codant pour les anticorps.

4.1.5.1 Le fragment Fc

Le fragment Fc est constitué par les domaines CH2-CH4/5 et la nature de ces domaines détermine l'isotype d'anticorps. On distingue 5 isotypes différents chez l'homme : IgM, IgD, IgG (réparti en 4 sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA et IgE. Les IgG, IgD et IgA possèdent 3 domaines CH, les IgM et IgE en possèdent 4. Les différents isotypes jouent des rôles différents dans la réponse immunitaire. Les différences de séquences et d'organisation des fragments Fc conditionnent l'interaction des anticorps avec les différents récepteurs membranaires et donc les réponses cellulaires qu'ils sont capables d'induire.

4.1.2 L'organisation génique et la diversité des domaines variables

4.1.2.1 Les loci des immunoglobulines

Au sein du génome sont présents 3 loci dédiés aux gènes des immunoglobulines : 1 locus pour la chaîne lourde situé sur le chromosome 14 chez l'homme et 2 loci pour la chaîne légère : 1 locus κ et 1 locus λ tous 2 situés sur le chromosome 22 chez l'homme. L'organisation de ces loci est très particulière, elle permet en effet de coder pour l'immense diversité nécessaire à la reconnaissance du très grand nombre d'antigènes auxquels peut être exposé l'organisme.

4.1.2.2 La diversité des domaines variables

La première source de diversité des domaines variables provient de l'organisation des gènes codants pour les domaines variables. Chaque locus codant pour une chaîne lourde ou légère contient plusieurs segments géniques pour le domaine variable qui sont associés aléatoirement par des processus de réarrangements géniques. La séquence du domaine variable d'une chaîne lourde est ainsi le produit de la réunion d'un domaine V (Variable), d'une

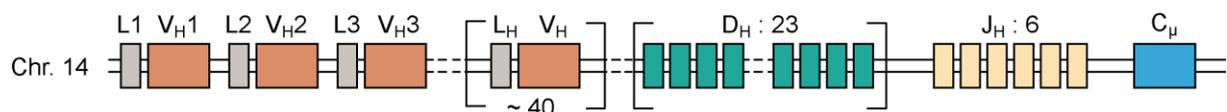
domaine D (Diversity) et d'un domaine J (Joining). Dans le cas d'une chaîne légère, il s'agit de la réunion d'un domaine V et d'un domaine J. Le locus de la chaîne lourde compte une quarantaine de domaines V fonctionnels, 23 domaines D fonctionnels et 6 domaines J fonctionnels (Matsuda and Honjo, 1997; Watson and Breden, 2012). Ces séquences codants pour le domaine variable sont suivies des séquences codant pour les domaines constants des différents isotypes d'anticorps.

Le locus de la chaîne légère λ comprend une trentaine de domaines V fonctionnels et 4/5 domaines J associés chacun à un domaine constant (LeFranc, 2001).

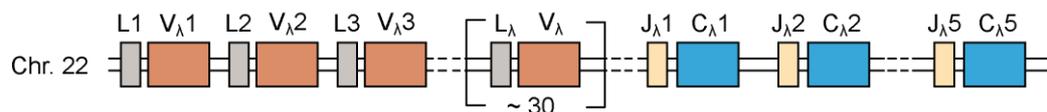
Le locus de la chaîne légère κ comprend 23 à 25 domaines V fonctionnels, 5 domaines J et un seul domaine constant (Lefranc, 2001).

Les anticorps étant des protéines sécrétées, les domaines V sont précédés d'une séquence leader (L) permettant la synthèse de la protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique en vue de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire (Figure 20).

Locus chaîne lourde (IGH) :



Locus chaîne légère λ (IG λ) :



Locus chaîne légère κ (IG κ) :

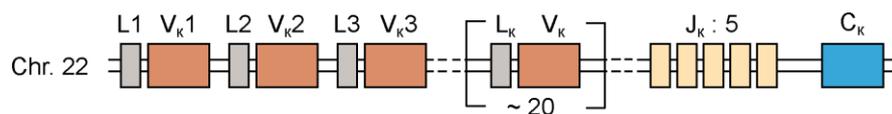


Figure 20 : Les locus IG humains, adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012. Chr : Chromosome ; L : séquence leader ; V : domaine variable ; D : domaine diversity ; J : domaine joining ; C : domaine constant.

4.2.2.1 La recombinaison V(D)J

Le processus de réarrangement génique est appelé recombinaison V(D)J. Cette recombinaison fait appel aux protéines RAG (Recombination-Activating Gene) 1 et 2, spécifiques aux lymphocytes, ainsi que des protéines impliquées dans la réparation des CDBs par NHEJ (Schatz and Swanson, 2011).

Les domaines V, D et J sont flanqués de séquences signal de recombinaison (RSS) qui sont reconnus par les protéines RAG-1 et 2. Ces RSS se composent d'une séquence de 7 nucléotides (heptamère) suivi d'un spacer de 12 ou 23 nucléotides et d'une séquence de 9 nucléotides (nonamère). Un RSS possédant un spacer de 12 nucléotides ne peut être associé qu'avec un RSS possédant un spacer de 23 nucléotides (règle 12/23) (Figure 21).

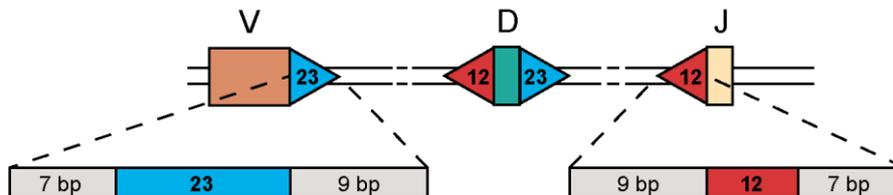


Figure 21 : Structure des séquences signal de recombinaison (RSS) de 12 et 23 nucléotides dans le cas de la recombinaison VDJ d'une chaîne lourde. Adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012.

Ceci permet l'association spécifique des segments V, D et J pour un domaine VH ou des segments V et J pour un domaine VL. Les protéines RAG vont reconnaître et rapprocher les segments à joindre. Les RSS vont ensuite être clivées et une structure en épingle à cheveux (hairpin) va être formée à l'extrémité du segment codant. Le segment codant va ensuite être pris en charge par les protéines de la NHEJ (Ku70-80, DNA-PK et Artemis). Ces protéines vont cliver l'hairpin et digérer des nucléotides qui seront remplacés de façon aléatoire par l'enzyme Terminal deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) ce qui ajoute encore de la variabilité dans la séquence du domaine variable (Figure 22).

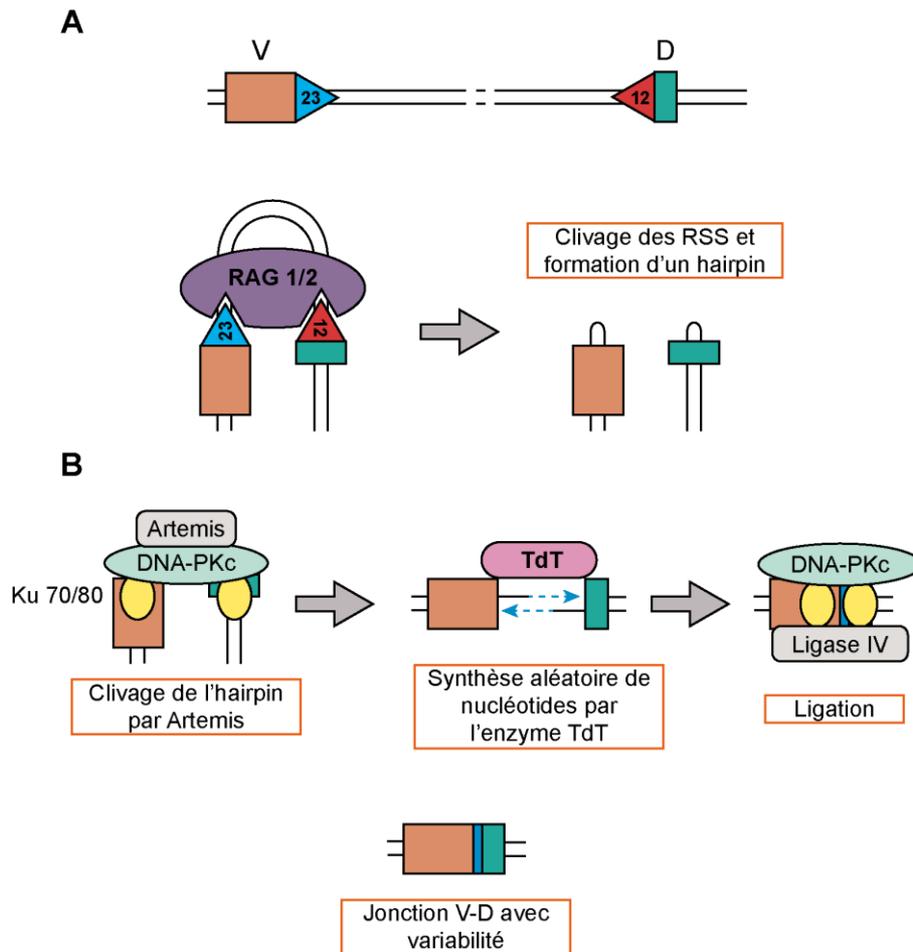


Figure 22 : Principales étapes de la recombinaison V(D)J. (A) Reconnaissance et clivages des RSS par les enzymes RAG 1&2. (B) Reconnaissance et assemblage des domaines clivés par les enzymes de la NHEJ. Adapté de Janeway's Immunobiology 8th Edition, Garland Science, 2012.

Les domaines V codent pour les séquences CDR1 et 2 ainsi que les séquences FR 1 à 3. La séquence du CDR3 est déterminée par la jonction des domaines V, D et J (V et J pour les chaînes légères), ce qui explique que la plus grande variabilité se retrouve au niveau du CDR3. L'ensemble de ces mécanismes ainsi que l'association aléatoire d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère κ ou λ aboutit à la création d'un répertoire pré-immun, constitué de cellules B encore non activées, dont la variabilité peut aller jusqu'à 10^{10} anticorps différents (Schroeder and Cavacini, 2010).

4.2.2.1 La maturation d'affinité

La variabilité et la spécificité de ce répertoire pré-immun sont encore augmentées au cours de la réponse immunitaire lors de la maturation d'affinité. Ce processus prend place au sein

des centres germinaux présent dans les organes lymphoïdes secondaires avec des cellules B qui ont été activées par l'antigène. Ces cellules activées expriment l'enzyme AID (Activation Induced cytidine Deaminase) responsable de la transformation de déoxycytidine en déoxyuridine au niveau du ssDNA généré lors de la transcription des domaines V réarrangés. Cette erreur dans la séquence d'ADN va être prise en charge par les mécanismes de réparation par excision de base ou réparation de mésappariement ce qui introduit des mutations et crée de la variabilité dans la séquence variable, ce processus de mutagenèse est appelé hypermutation somatique. Ce processus génère une majorité d'anticorps non-fonctionnels ou présentant une affinité pour l'antigène diminuée. Au cours de la maturation d'affinité, les cellules B capable de lier l'antigène présenté par une cellule T_{FH} (Follicular Helper) reçoivent de cette dernière un signal de prolifération leur permettant de survivre. A contrario, les cellules ayant perdu la capacité à lier l'antigène ou présentant une affinité moindre pour ce dernier ne peuvent recevoir de signal de prolifération des cellules T_{FH} et meurent par apoptose. Ainsi, l'organisme ne retient que les cellules B codant pour les anticorps présentant les plus fortes affinités pour leur antigène (Di Noia and Neuberger, 2007).

4.1.2.3 Les domaines constants

Dans le cas de la chaîne lourde, chaque domaine V réarrangé peut-être associé avec les domaines C correspondant aux différents isotypes. Les domaines C (CH1 à CH3/4) sont codés par différents exons regroupés en cluster pour chaque isotype. Lors de la transcription de ces gènes, les introns sont excisés et l'ARN messager ne contient alors que les exons codants pour la chaîne lourde. Les cellules B une fois activées sont capables de réarranger le locus de la chaîne lourde pour exprimer un isotype particulier. Ce mécanisme s'appelle la commutation de classe et repose sur la présence de l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase). La sélection de l'isotype dépend des cytokines auxquelles sont exposées les cellules B. En amont des gènes codant pour les domaines CH se trouve une région switch et l'ensemble de cette séquence est sous contrôle d'un promoteur activé par certaines cytokines. La recombinaison de classe suppose l'activation du promoteur en amont de la zone switch des IgM (S_μ) ainsi que celle en amont de l'isotype considéré. L'activation de la transcription sépare le double-brin d'ADN ce qui conduit à la formation d'une CDB suite à l'activité d'AID et des enzymes associées. Les 2 CDBs induites dans les régions switch sont réparées par NHEJ ce qui

conduit à la ligation des gènes de l'isotype considéré en aval de la séquence du domaine VH (Stavnezer and Schrader, 2014; Stavnezer et al., 2008).

4.1.3 Les anticorps dans la réponse immunitaire

Les anticorps sont impliqués dans de nombreux processus de la réponse immunitaire, leur très forte affinité pour leur antigène leur permettant de reconnaître très spécifiquement les pathogènes. Les anticorps sont notamment impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau de l'antigène auquel ils se sont liés. En effet les anticorps, par leur fragment Fc interagissent avec les récepteurs membranaires au fragment Fc (FcR). Il existe un type de récepteur Fc pour différents isotypes d'anticorps : Fc α R, Fc α / μ R, Fc γ RI-III, Fc ϵ RI-II et ces récepteurs peuvent avoir une fonction activatrice ou inhibitrice. Le fragment Fc de l'anticorps représente donc son domaine effecteur.

Les IgG1 peuvent par exemple recruter des cellules NK, en effet ces dernières possèdent un récepteur Fc γ RIII capable de reconnaître le Fc des IgG1. Lorsqu'une cellule NK reconnaît des IgG1 fixées à leur antigène sur la membrane d'une cellule, ceci permet le déclenchement de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Ravetch and Bolland, 2001). Les anticorps sont également capables de neutraliser des toxines bactériennes, d'opsoniser des pathogènes (faciliter la phagocytose de pathogènes grâce à la reconnaissance du domaine Fc par les macrophages), d'activer le système du complément, de provoquer la dégranulation des mastocytes (Weiner et al., 2010).

4.1.4 Les anticorps en recherche et en thérapeutique

Les anticorps sont des outils précieux en recherche du fait de leur haute spécificité d'interaction avec leur antigène. De plus les anticorps sont, à l'heure actuelle, les seuls outils capables de reconnaître une MPT sur une protéine.

4.1.4.1 Les anticorps en recherche

En recherche, les anticorps sont couramment utilisés comme outils de détection. Plusieurs méthodologies utilisent les anticorps pour révéler des protéines ou des PTMs comme l'immunofluorescence et l'immunohistochimie, les tests ELISA, le Western-Blot. Les anticorps sont également utilisés pour réaliser des immunoprécipitations à partir d'extraits cellulaires et

comme chaperonnes pour les études de cristallographie. La grande taille des anticorps ainsi que la variété de résidus qu'ils exposent à leur surface permet de les coupler à des protéines ou molécules rapportrices (fluorochrome, peroxydase, radionucléide, ...). Enfin la vectorisation des anticorps dans les cellules vivantes peut leur permettre d'interférer avec certaines protéines permettant ainsi d'étudier des mécanismes biologiques *in cellulo*.

4.4.1.1 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Les anticorps utilisés en recherche peuvent être polyclonaux, il s'agit dans ce cas d'une population de plusieurs anticorps différents issus du sérum d'un animal (lapin, chèvre, ...) immunisé avec l'antigène d'intérêt. La mise au point dans les années 70 de la technique des hybridomes qui consiste à immortaliser une cellule B sécrétant un anticorps particulier en la fusionnant avec une cellule de myélome, a permis de générer des anticorps monoclonaux (Köhler and Milstein, 1975). Un anticorps monoclonal à l'avantage de pouvoir être davantage caractérisé et une fois l'hybridome obtenu, le même anticorps peut être potentiellement produit indéfiniment. A l'inverse un anticorps polyclonal peut présenter une meilleure spécificité mais la capacité à le produire dépend de la durée de vie de l'animal duquel provient le sérum (Chiarella and Fazio, 2008; Lipman et al., 2005).

4.4.1.1 Le ciblage intracellulaire avec des anticorps

Les anticorps sont des protéines circulantes ayant besoin de ponts disulfures pour être stables et fonctionnels. Ces ponts disulfures ne peuvent se former dans l'environnement réducteur du milieu intracellulaire. Ainsi, ils ne peuvent pas être utilisés avec une approche de transfection de leur séquence codante pour cibler des protéines intracellulaires après expression dans les cellules vivantes. (Pérez-Martínez et al., 2010).

4.1.4.1.1 Le format ScFv (Single-chain variable fragment)

Pour contourner ces difficultés le format ScFv qui consiste en l'association de domaines VL et VH reliés par un linker flexible peut être utilisé. Les ScFvs peuvent être exprimés en système procaryote où ils peuvent être stables et fonctionnels après leur expression périplasmique permettant la formation des ponts disulfures. Quelques ScFvs peuvent être stables lors de leur expression dans le milieu intracellulaire, permettant ainsi leur utilisation par transfection de leur séquence codante dans les cellules vivantes. De tels ScFvs solubles et transfectables ont

été développés et ils sont appelés intracorps (Desplancq et al., 2011; Rinaldi et al., 2013; Sibling et al., 2005).

4.1.4.1.2 La vectorisation

Une autre méthode permettant d'utiliser les anticorps *in cellulo* est leur vectorisation dans le cytoplasme des cellules vivantes. Diverses techniques existent pour parvenir à transduire des anticorps, notamment l'électroporation dont une technique a été mise au point dans notre laboratoire et a permis de cibler des protéines intracellulaires tels que PCNA, la protéine E6 du papillomavirus humain ou l'ADN polymérase α (Desplancq et al., 2016; Freund et al., 2013).

4.1.4.2 Les anticorps en thérapeutique

Le développement de la technique des hybridomes et la possibilité de produire en grande quantité des anticorps spécifiques ont permis de développer l'utilisation des anticorps en thérapeutique. Les anticorps de souris étant potentiellement immunogènes chez l'humain, ceux-ci sont souvent transformés en anticorps chimériques (régions variables de souris associées aux régions constantes humaines), humanisés (boucles CDRs de souris greffées sur des anticorps humains), ou humains (Singh et al., 2018). Les anticorps thérapeutiques sont soit utilisés seuls, soit conjugués à un agent génotoxique (radio-isotope, molécule) ce qui permet de cibler cet agent sur la tumeur. L'utilisation d'anticorps, notamment dans le cas du traitement des cancers, permet de déclencher différents mécanismes propres aux anticorps : promotion de l'ADCC, blocage de la fonction d'une protéine (exemple : Cetuximab bloquant le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR)), promotion de la phagocytose, activation du système du complément, neutralisation d'une cytokine immunosuppressive comme le facteur de croissance tumoral β (TGF β) (Liu, 2014; Singh et al., 2018; Weiner et al., 2010). Les anticorps couplés à des agents génotoxiques sont appelés ADC (Antibody Drug Conjugates). Cette approche permet d'adresser des molécules génotoxiques directement aux cellules cancéreuses, par exemple par le ciblage d'un récepteur surexprimé par ces cellules. L'internalisation de ce récepteur associé à l'ADC permet la libération de la molécule génotoxique dans le milieu intracellulaire de la cellule cancéreuse (Chiu et al., 2019). Plus récemment, différentes techniques permettant d'obtenir des anticorps bispécifiques ont été développées comme le Fab-Arm-Exchange (Labrijn et al., 2013). Ces techniques permettent d'obtenir des anticorps fonctionnels capables de cibler 2 antigènes. Ceci permet

d'augmenter l'efficacité et la spécificité de ces anticorps et a été testé par exemple avec des combinaisons ciblant l'EGFR et le récepteur c-Met (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes) (Grugan et al., 2017; Sellmann et al., 2016).

4.2 Les nanobodies

En 1993 a été publiée une étude rapportant la présence d'anticorps dépourvus de chaînes légères dans le sérum des dromadaires. Cette étude a montré que ces animaux possédaient, en plus des anticorps conventionnels, une population d'IgGs d'un poids moléculaire de 90 kDa constituées uniquement de chaînes lourdes du fait de l'absence d'un domaine CH1, ces anticorps ont été appelés anticorps à chaînes lourdes (HcAbs) (Hamers-Casterman et al., 1993). Il a par la suite été montré que ces anticorps étaient présent dans le sérum de l'ensemble des camélidés et qu'une autre forme d'anticorps à simple chaîne existait chez les requins (New Antigen Receptor, IgNAR) (Goldman et al., 2017). Le domaine de reconnaissance de ces anticorps à chaînes lourdes (constitué d'un seul domaine immunoglobuline) est appelé VHH ou sous la dénomination commerciale de Nanobody (Dmitriev et al., 2016).

4.2.1 Les spécificités des anticorps à chaîne lourde

Les anticorps à simple chaîne appartiennent aux isotypes des IgG2 et 3 chez les camélidés et la proportion d'HcAbs par rapport à la population totale d'anticorps dans le sérum varie selon l'espèce considérée (jusqu'à 75% chez les dromadaires et de 30 à 50% chez les alpagas) (Arbabi-Ghahroudi, 2017). En fonction de l'isotype, on distingue 2 populations de HcAbs : des HcAbs à hinge longue appartenant à l'isotype IgG2 et des HcAbs à hinge courte appartenant à l'isotype IgG3 (Muyldermans, 2013)(Figure 23).

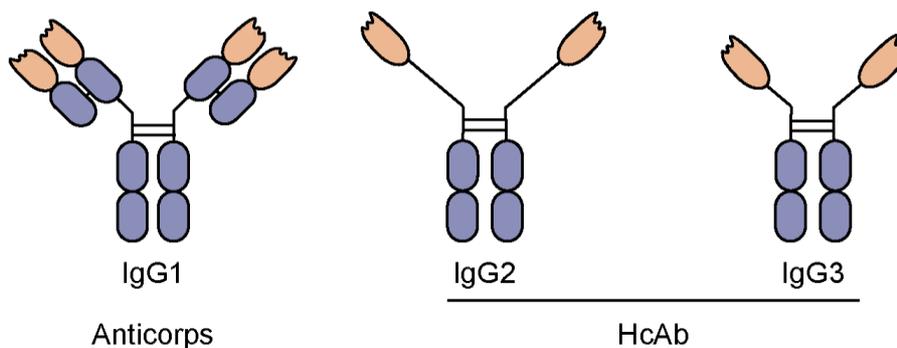


Figure 23 : Structure des anticorps et HcAbs présents dans le sérum des camélidés

Les domaines VHHs des anticorps à chaîne lourde présentent plusieurs caractéristiques particulières, schématisées en Figure 24 et expliquées ci-après.

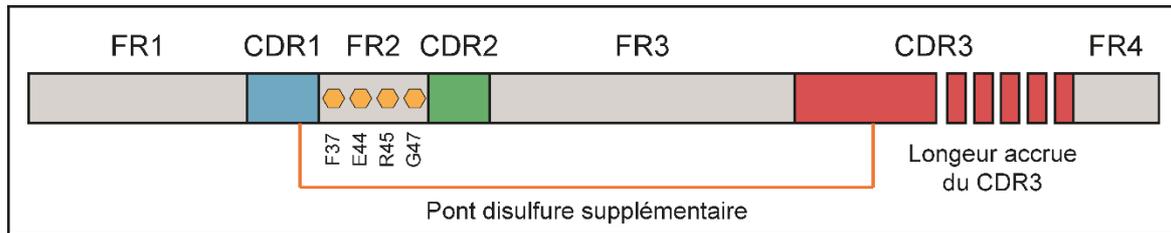


Figure 24 : Représentation schématique d'un domaine VHH et de ses caractéristiques propres. Adapté de Muyldermans, 2013

4.2.1.1 Les résidus hydrophiles de la région FR2

Du fait de l'absence d'association de la chaîne lourde avec une chaîne légère, les résidus situés au niveau de la région FR2 du VHH, habituellement hydrophobes car en interaction avec la chaîne légère, sont remplacés par des résidus hydrophiles permettant d'assurer la solubilité de ce domaine. Ainsi les résidus en position 37, 44, 45 et 47 (numérotation Kabat), respectivement des résidus valine, glycine, leucine et tryptophane se voient remplacés par des résidus phénylalanine, acide glutamique, arginine et glycine respectivement (Mitchell and Colwell, 2018; Vu et al., 1997).

4.2.1.2 Les CDRs

Étant restreint à un seul domaine de reconnaissance, les HcAbs ne dispose que de 3 CDRs pour reconnaître leur antigène. Ceci peut s'accompagner d'une perte de diversité en comparaison avec les 6 CDRs issus de l'appariement entre les domaines VH et VL d'un anticorps conventionnel. Les CDR3 des VHHs peuvent ainsi être plus longs (de 8 à 15 acides aminés pour un domaine VH ou VL, de 3 à 28 acides aminés pour un domaine VHH).

La longueur accrue de la boucle CDR3 permet au VHH de disposer d'un paratope plat ou convexe capable de reconnaître des épitopes plats ou concaves, tandis que le paratope généralement plat ou concave d'un anticorps conventionnel est davantage adapté aux épitopes convexes ou linéaires (Sundberg, 2009). La longueur accrue de la boucle CDR3 permet également de compenser la diminution de taille du paratope, due à l'absence des CDRs du domaine VL. Les nanobodies bénéficient ainsi d'un paratope d'une surface comprise

entre 600 et 800 Å² (contre 700 à 1150 Å² pour l'association VH-VL d'un anticorps). (Bannas et al., 2017; Mitchell and Colwell, 2018; Nguyen et al., 2000).

4.2.1.3 Le pont disulfure intra-chaîne supplémentaire

En plus de posséder un CDR3 pouvant être plus long, les domaines VHH peuvent présenter un pont disulfure supplémentaire reliant le CDR3 au CDR1 ou à la région FR2. Ce pont disulfure supplémentaire est plus fréquemment retrouvés sur les VHHs issus de dromadaires (Braun et al., 2016; Iezzi et al., 2018).

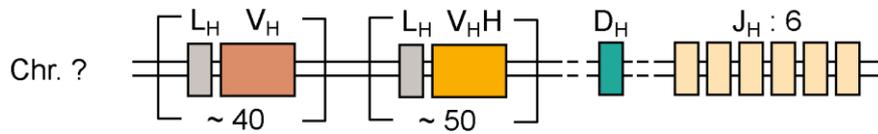
4.2.2 Le locus H des camélidés

La découverte des anticorps à chaînes lourdes chez l'ensemble des camélidés a poussé la communauté scientifique à analyser l'organisation du locus contenant les gènes codant pour la chaîne lourde des anticorps afin de comprendre comment étaient organisés ces gènes permettant la synthèse des 2 types d'anticorps.

Leurs travaux ont montré que les gènes codants pour les HcAbs sont également situés sur le locus H. Les gènes codants pour les domaines variables VHHs peuvent être différenciés des domaines VHs grâce aux substitutions des résidus situés dans la région FR2 en acides aminés hydrophiles. Ainsi les études ont montré que les dromadaires (*Camelus dromedarius*) possèdent environ 40 gènes codant pour les domaines VHs et 50 pour les domaines VHHs ainsi qu'un gène codant pour le domaine D et 6 gènes codants pour les domaines J (Nguyen et al., 2000).

Chez les alpagas (*Lama pacos*), on retrouve 71 gènes codants pour les domaines VHs et 17 codants pour les VHHs ainsi que 7 gènes codants pour les domaines D et 7 gènes codants pour les domaines J (Achour et al., 2008) (Figure 25).

Camelus dromedarius :



Lama pacos :

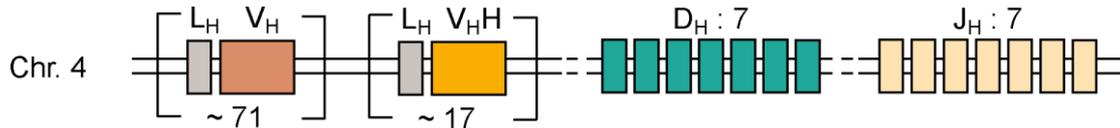


Figure 25 : Représentation du nombre de domaines V, D et J au sein du locus IGH chez le dromadaire et l'alpaga.

Parmi les gènes codants pour les IGHG (domaines constants des IgGs), certains sont dédiés aux HcAbs : il s'agit des gènes C γ 2a, C γ 2b, C γ 2c et C γ 3 codants pour les isotypes IgG2a, IgG2b, IgG2c et IgG3 respectivement.

L'absence d'association d'une chaîne lourde avec une chaîne légère chez les HcAbs est due à la perte du domaine CH1. La séquence codant pour ce domaine est présente dans les gènes C γ 2a, C γ 2b, C γ 2c et C γ 3 mais une mutation G en A provoque la perte d'un site d'épissage sur l'ARN messager ce qui conduit à l'excision du domaine CH1 (Nguyen et al., 1999).

La perte de l'association avec une chaîne légère pose la question du développement des cellules B codants pour les HcAbs. En effet une fois qu'un domaine VH ou VHH a été sélectionné, la cellule B doit en principe exprimer en premier lieu ce domaine avec une chaîne lourde d'isotype IgM en association avec une chaîne légère de substitution (surrogate light chain). Il semblerait néanmoins que dans le cas des cellules B exprimant des domaines VHHs, celles-ci passent par un stade IgM au cours du développement avant que la commutation de classe en IgG2 ou IgG3 n'ait lieu lors de la rencontre avec un antigène (Achour et al., 2008).

4.2.3 Intérêt des VHHs

Depuis leur découverte, les VHHs ont suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique. En effet ces ligands présentent de nombreux avantages qui ont pu être exploités pour la recherche ainsi que pour des applications cliniques.

Par exemple, l'étude des MPTs ne peut se faire à l'heure actuelle que par l'utilisation d'un anticorps et les VHHs peuvent constituer une alternative à ces outils (Helma et al., 2015)

Le nanobody est une protéine de petite taille (2 x 4 nm) comparé à un anticorps (10-15 nm) et de ce fait ils représentent une excellente alternative à ces derniers pour la microscopie à haute résolution. En effet la détection d'un antigène par un anticorps primaire révélé par un anticorps secondaire provoque un déplacement du signal à une vingtaine de nanomètres de l'antigène (*linkage error*), ce qui peut être évité en révélant l'antigène à l'aide d'un VHH conjugué à un fluorochrome (Massa et al., 2014; Traenkle and Rothbauer, 2017).

Un autre avantage est leur utilisation possible en transfection, en effet il a été montré que les VHHs peuvent être fonctionnel en absence de pont disulfure intra-chaîne. De nombreux VHHs peuvent ainsi être solubles après leur expression dans le cytoplasme cellulaire, grâce notamment aux résidus hydrophiles présents dans la région FR2. Ces caractéristiques font qu'ils peuvent être utilisés beaucoup plus facilement que des ScFvs pour le ciblage des protéines intracellulaires dans des cellules vivantes (Beghein and Gettemans, 2017). Leur petite taille leur permet de diffuser passivement dans le noyau lorsqu'ils sont exprimés dans le milieu intracellulaire.

La méthodologie de génération des nanobodies donne accès à leur séquence ADN. Ceci permet de très facilement ingénierer ces protéines par clonage moléculaire. Ainsi leur fusion à d'autres protéines, l'ajout de séquences tags ou de résidus modifiables chimiquement, la création de nanobodies multivalents ou bispécifiques sont très facilement réalisables (Kolkman and Law, 2010; Prole and Taylor, 2019; Schumacher et al., 2018).

Les nanobodies sont généralement stable après une exposition à de hautes températures du fait de la capacité d'un grand nombre d'entre eux à se replier stablement à l'issue d'une dénaturation par la chaleur (Kunz et al., 2019)

Pour les approches *in vivo*, les VHH possèdent plusieurs avantages. Leur petite taille, permet à ces protéines de bénéficier d'une meilleure pénétration des tissus comparé aux anticorps (Perruchini et al., 2009). Cette propriété leur confère un avantage pour certaines approches thérapeutiques ainsi que pour les expériences d'immunohistochimie. Enfin étant restreint à un domaine variable dont il existe une grande diversité chez l'homme et envers lesquels le système immunitaire est tolérant et du fait d'une grande identité de séquence avec les domaines variables de type 3 humains, les VHHs sont des protéines relativement peu immunogènes (Bannas et al., 2017). Il a été montré que certains VHHs ayant un p*H*i basique étaient capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre des antigènes localisés dans le système nerveux central (Li et al., 2016). Cette propriété permet d'envisager

l'utilisation des VHHs pour le développement de thérapies ciblées dans le cadre de pathologies du système nerveux central.

4.3 Développement de VHHs contre une nouvelle cible

4.3.1 Création d'une banque de phages

Le processus de génération d'un nouveau VHH peut reposer sur l'immunisation d'un animal ou la création de ce VHH à partir d'une banque dite naïve. Les procédures d'immunisation décrites dans la littérature consistent en une primo-injection de l'antigène (protéine ou peptide) associé à des adjuvants dans un camélidé suivie de boosts avec le même mélange pour augmenter la réponse immunitaire contre l'antigène. Cette étape prend 2 à 6 mois (Rothbauer, 2018). Suite à l'immunisation, une ponction sanguine suivie d'une séparation sur gradient Ficoll permet d'isoler les cellules B circulantes présentes dans le sérum. L'extraction de l'ARN messager présent dans ces cellules suivie de la rétro-transcription de cet ARN messager en ADN codant à l'aide d'oligonucléotides ciblant le domaine variable permet de disposer des séquences codant pour les VHHs (Maass et al., 2007). Ces séquences peuvent ensuite être clonées dans des phagémides, des vecteurs permettant l'expression en système procaryote du VHH fusionné à une protéine de la membrane des phages. Ces phagémides permettent la production de phages portant à leur surface les différents VHHs. Une illustration des différentes étapes nécessaire à la création d'une banque de phages est présentée en Figure 26.

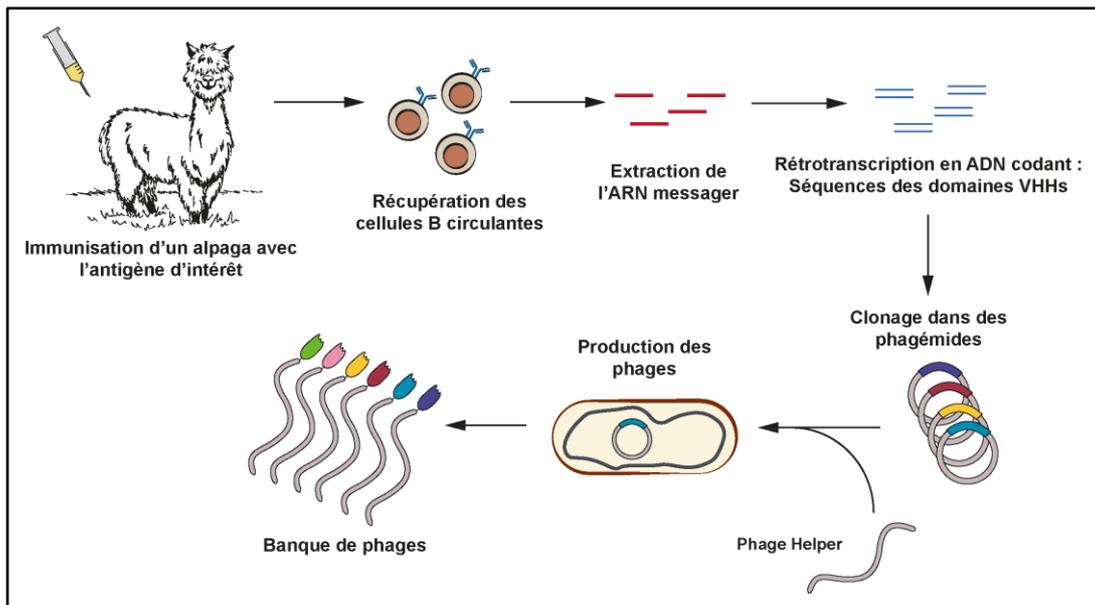


Figure 26 : Vue d'ensemble des différentes étapes de la création d'une banque de phages après immunisation d'un animal

4.3.2 La sélection par phage-display

Les phages, regroupés en une banque de phages, peuvent ensuite être criblés par la méthodologie dite du phage-display (Smith, 1985). Cette technique consiste à placer ces phages en contact avec l'antigène et de ne conserver que les phages portant un VHH capable de s'y lier. A l'issue d'un tour de sélection, les phages obtenus sont amplifiés et peuvent être soumis à un nouveau criblage (Figure 27).

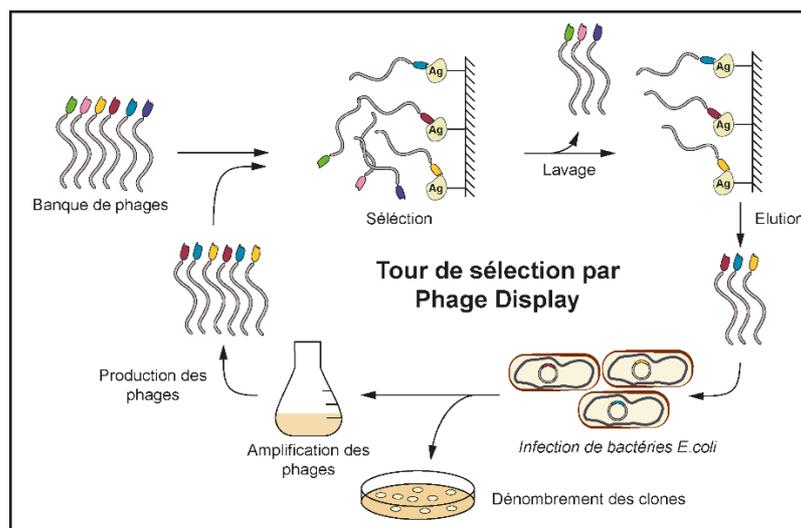


Figure 27 : Représentation schématique d'un tour de sélection par la méthodologie du phage display. Ag = antigène

Cette technique permet d'enrichir la banque de phages en phages spécifiques au fil des différents tours de sélection. Les phages enrichis peuvent être rapidement caractérisés par des tests ELISA, et l'accès à leur séquence ADN contenue dans le phagémide permet de les cloner dans un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote (Pardon et al., 2014). Le phage-display est très largement utilisé pour isoler les VHHs reconnaissant l'antigène d'intérêt mais d'autres techniques ont également été développées notamment le « yeast-display » qui se base sur l'expression du VHH en fusion avec une protéine de membrane de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.3 La production des VHHs

Les VHHs sont classiquement produits par expression périplasmique chez *E. coli* mais pouvant être stables même en l'absence de pont disulfures, ils peuvent également être produit par expression cytoplasmique (Pleiner et al., 2015). L'ajout d'une répétition de 6 histidines (Tag 6His) à une des extrémités du VHH permet leur purification par passage sur une colonne de purification par chromatographie d'affinité suivie le cas échéant d'une chromatographie par exclusion de taille permettant de séparer les VHHs d'éventuelles protéines résiduelles.

4.3.4 Application des VHHs en recherche

4.3.4.1 Les chromobodies

La technologie permettant l'obtention de VHHs dirigés contre divers antigènes cellulaires à très vite rendu possible l'étude de protéines dans leur contexte intracellulaire. La transfection de la séquence codante de VHHs fusionnés à une protéine fluorescente (chromobodies) est ainsi devenue une approche standard. Ainsi, un VHH dirigé contre la GFP (Green Fluorescent Protein) transfecté dans différentes lignées cellulaires exprimant des protéines endogènes de différents compartiments intracellulaires fusionnées à la GFP a permis d'établir une preuve de concept du fonctionnement des chromobodies dans les cellules. Cette étude a démontré que les chromobodies colocalisaient avec les protéines nucléaires ou cytoplasmiques fusionnées à la GFP (Rothbauer et al., 2006). Cette technique peut permettre de localiser une protéine d'intérêt à l'intérieur de la cellule sans recourir à la génération d'une lignée cellulaire exprimant cette protéine d'intérêt fusionnée à une protéine fluorescente. En effet, la fusion d'une protéine fluorescente à une des extrémités d'une protéine peut altérer la structure

et/ou la fonction de cette dernière et entraîner un biais dans les résultats obtenus (Traenkle and Rothbauer, 2017).

Cependant, une des limitations à l'utilisation des VHHs pour le ciblage intracellulaire est le faible contrôle sur leurs niveaux d'expression ce qui peut entraîner la production d'une quantité de VHHs très supérieure à la quantité d'antigène. Dans ces conditions il est difficile d'isoler le signal des VHHs liés spécifiquement au sein de l'ensemble du signal obtenu. De fait, les chromobodies disponibles commercialement sont pour la plupart dirigés contre des protéines cellulaires exprimées en forte quantité, comme les protéines du cytosquelette. Un VHH dirigé contre la vimentine a ainsi pu être utilisé pour déterminer l'organisation spatiale de cette protéine au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse en utilisant de la microscopie en temps réel (Maier et al., 2015). Différentes approches ont été étudiées pour supprimer le signal lié aux chromobodies non liés à l'intérieur des cellules, notamment la dégradation des chromobodies non liés suite à leur ubiquitination. Cette technique a rendu possible l'étude de la variation des niveaux d'expression d'une protéine cible au sein d'une cellule (Keller et al., 2018). La liaison des VHHs transfectés à leur antigène dans le contexte intracellulaire permet également une nouvelle approche dans le domaine de la protéomique, la liaison du VHH pouvant bloquer certaines interactions protéiques ou bien les VHHs peuvent permettre l'immunoprécipitation de complexes protéiques formés *in cellulo* (Helma et al., 2015).

4.3.4.2 L'utilisation des VHHs pour la cristallographie

La capacité des nanobodies à reconnaître des épitopes concaves, par exemple des sites actifs ou des creux situés dans des récepteurs membranaires a suscité un fort intérêt pour les études de cristallographie dans lesquelles de nombreux VHHs ont été utilisés comme chaperonnes de cristallisation, permettant notamment la stabilisation de récepteurs dans différentes conformations (Pardon et al., 2014).

4.3.5 Application des VHHs en clinique

En plus de leur application en recherche, la technologie des nanobodies est également employée les domaines du diagnostic et de la thérapeutique.

4.3.5.1 Imagerie *in vivo*

La facilité de la conjugaison d'un nanobody avec des radionucléides a permis leur utilisation en imagerie. Ainsi des études ont testé l'efficacité de VHHs dirigés contre un marqueur tumoral pour localiser des tumeurs au sein d'un organisme. Les anticorps classiquement utilisés présentent le désavantage d'avoir un temps de demi-vie longue dans le sang, ce qui expose l'organisme aux rayonnements des radionucléides sur une période prolongée. En comparaison, les VHHs sont capables de très vite s'accumuler au niveau de la tumeur et d'être éliminés rapidement. Malheureusement, leur élimination rapide est due à leur taille réduite, en dessous du seuil de rétention glomérulaire, et ceci entraîne leur accumulation au niveau des reins. Cette accumulation rénale pose le problème des rayonnements auxquels sont soumis les reins et d'un bruit de fond important rendant difficile l'imagerie des organes alentours (Vaneycken et al., 2011). Le temps de rétention sanguin court des nanobodies constitue un obstacle à leur utilisation en thérapeutique. Pour contourner cette difficulté, la multimérisation des VHHs et/ou leur association avec un VHH reconnaissant l'albumine a permis de se rapprocher du temps de résidence d'un anticorps dans le sang, ce qui rend possible leur utilisation en thérapeutique (Tijink et al., 2008).

4.3.5.2 Stratégies thérapeutiques

Différents VHHs ont été générés contre des antigènes tumoraux afin d'étudier leur efficacité. Ainsi des VHHs ciblant le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ou le récepteur DR5 (Death Receptor 5) impliqué dans l'apoptose ont montré une efficacité lors d'études préliminaires (associée à une hépatotoxicité dans le cas du nanobodies anti-DR5) (Jamnani et al., 2012; Papadopoulos et al., 2015).

La possibilité d'ingénierer facilement les VHHs a conduit à l'expérimentation d'immunothérapies basés sur ces protéines. Différentes stratégies de ciblage d'agents cytotoxiques à des tumeurs ont ainsi été expérimentées comme le couplage d'un VHH dirigé contre le VEGFR2 (Vasculaire Epidermal Growth Factor Receptor 2) à l'exotoxine-A de *Pseudomonas aeruginosa* (Behdani et al., 2013), le couplage d'un radionucléide à un VHH anti-HER2 (D'Huyvetter et al., 2014) ou encore la génération de nanoparticules d'albumine couplées à des VHHs anti-EGFR et des inhibiteurs de kinases (Altintas et al., 2013).

Des stratégies préventives utilisant des VHHs sont également en cours d'étude. La possibilité de produire les VHHs en système procaryote a permis d'imaginer une stratégie de prévention localisée de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il serait en effet possible d'implanter des bactéries de l'espèce *Lactobacillus*, naturellement présentes dans les voies génitales, transformées pour exprimer des VHHs capables de neutraliser le VIH (Weiss and Verrips, 2019). Cette approche pourrait permettre d'envisager de nouveaux modes de prévention des infections jusqu'alors impossible avec des anticorps conventionnels.

Dans le traitement des cancers, l'utilisation de lymphocytes T possédant un récepteur à antigène chimérique (CAR) reconnaissant un antigène tumoral permet d'adresser ces cellules directement au niveau de la tumeur où elles peuvent exercer leur effet cytotoxique. Initialement, ces récepteurs chimériques ont été développés à partir de fragments ScFv d'anticorps conventionnels. Des études ont utilisé des VHHs pour générer de tels récepteurs et les résultats obtenus, par exemple lors du ciblage de l'antigène PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), un ligand immunosuppresseur et de l'antigène de la matrice extracellulaire EIIIB, permettent d'imaginer l'utilisation de VHHs pour ce type de thérapie (Xie et al., 2019).

4.3.5.3 Études cliniques et nanobodies commercialisés

A l'heure actuelle, un seul VHH a été approuvé pour une utilisation en thérapeutique. Il s'agit d'un VHH ciblant le facteur de Van Willebrand, le *Caplacizumab*, commercialisé par la société Ablynx et utilisé pour le traitement de la thrombose (Duggan, 2018). Ce VHH a été autorisé en Europe en 2018 et a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration en 2019.

A l'heure actuelle, plusieurs essais cliniques ont été ou sont réalisés pour évaluer le potentiel thérapeutique des VHHs dans différentes pathologies (cancer, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux systémique, ...) (Jovčevska and Muyldermans, 2020). Une recherche sur le site (<https://clinicaltrials.gov>) avec les termes « Nanobody », « VHH » et « Ablynx » fourni une liste de 40 études cliniques, indiquant l'intérêt suscité par les VHHs pour leur utilisation en clinique et permet d'envisager de futures autorisations de mises sur le marché pour de nouveaux VHHs.

Objectifs de la thèse

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation de γ -H2AX et plus particulièrement du marquage pan-nucléaire de γ -H2AX comme indicateur du stress répliatif létal. γ -H2AX est un marqueur traditionnellement utilisé pour la détection des CDBs mais de récentes études décrivent que la phosphorylation de H2AX apparaît également en réponse à la détection de ssDNA suite au blocage des fourches de répliation lors du stress répliatif (Jones and Petermann, 2012). A l'heure actuelle il n'existe pas de marqueur pour évaluer le niveau de stress répliatif auquel est soumise une cellule et notamment pour déterminer son caractère létal, un tel marqueur pouvant s'avérer très utile pour la recherche de nouvelles thérapeutiques (Zhang et al., 2016). Nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de H2AX en réponse au stress répliatif induit par des inhibiteurs de la RnR et nos travaux ont permis de mettre en évidence un lien entre le marquage γ -H2AX pan-nucléaire et la létalité du stress répliatif et ont fait l'objet d'une publication présentée ci-après (Moeglin et al., 2019, article n°1)

En parallèle des observations réalisées dans cette première partie de mon travail, nous avons voulu étudier la cinétique de γ -H2AX en réponse au stress répliatif sur des cellules vivantes. L'observation en temps réel de la phosphorylation de H2AX peut en effet renseigner sur les cinétiques d'apparition des foci et de leur évolution en marquage pan-nucléaire après l'exposition de cellules cancéreuses à des agents génotoxiques. La détermination de ces cinétiques peut constituer un paramètre important pour évaluer l'intensité du stress répliatif. Un second volet de mon travail de thèse a donc été de développer un outil adapté au suivi de la dynamique de la phosphorylation de H2AX dans les cellules vivantes à partir d'un VHH. Pour suivre avec précision γ -H2AX dans les cellules vivantes, nous avons imaginé et développé, dans le cadre d'une collaboration, un système optogénétique permettant la relocalisation des VHHs non liés au cytoplasme. L'ensemble des résultats obtenus ont été rassemblés dans un manuscrit qui sera soumis à publication prochainement (Moeglin et al., 2020, article n°2)

Enfin, à partir des conclusions de l'article n°1, j'ai travaillé au développement d'une méthodologie adaptée au criblage haut-débit de molécules génotoxiques utilisant le VHH développé pour l'observation temps réel afin d'évaluer si ce dernier est également utilisable

dans le cadre d'un criblage. J'ai ainsi pu mettre au point un protocole d'immunofluorescence en une étape permettant une détection rapide de γ -H2AX à l'aide d'un réactif recombinant. Ce criblage a permis de confirmer les observations faites lors du travail sur l'article n°1 et d'explorer si γ -H2AX peut permettre de détecter la létalité des dommages à l'ADN induits par différentes classes de molécules génotoxiques.

Matériels et Méthodes

1 Clonage moléculaire

1.1 Vecteurs d'expression utilisés

Les plasmides utilisés dans notre laboratoire pour l'expression des différents VHHs sont :

- Le plasmide pETOM pour l'expression en système procaryote (Desplancq et al., 2011).
- Le plasmide p β -Actin pour l'expression en système eucaryote (Rinaldi et al., 2013).

1.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

L'ensemble des PCRs ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur dont le programme est décrit en Table 2. Le milieu réactionnel de la PCR est composé des polymérases et du tampon réactionnel du kit Expand High Fidelity (Roche), de 2 μ l des différents oligonucléotides à une concentration de 10 μ M, de 4 μ l de dNTPs à une concentration de 2,5 mM, de 50 ng d'ADN et d'eau bidistillée pour un volume final de 50 μ l.

	Phase	Température	Durée
	Pré-dénaturation	94°C	5'
Cycle x25	Dénaturation	94°C	30''
	Hybridation	65°C (Sauf spécification contraire)	30''
	Elongation	72°C	1'
	Post-élongation	72°C	10'

Table 2 : Cycle de PCR

A l'issue des PCRs, les fragments obtenus ont été purifiés soit à l'aide du kit QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN ou à l'aide d'un gel d'agarose SeaKem 1% permettant d'isoler des fragments d'ADN de taille déterminée. Dans ce cas, les fragments ont été découpés du gel puis traités avec un kit Monarch DNA Gel Extraction Kit de New England Biolabs (NEB) selon les recommandations du fabricant.

1.3 Digestion et ligation :

La digestion des vecteurs et fragments d'ADN a été réalisée avec les enzymes de restriction NEB et les tampons réactionnels associés. Dans le cas des digestions impliquant 2 enzymes de

restriction, la compatibilité du tampon réactionnel a été contrôlée à l'aide de la documentation fournie par le fabricant. Les digestions ont été réalisées dans un volume de 50 µl avec 5 µg d'ADN et un nombre d'unités enzymatiques égal pour chaque enzyme utilisée. Les réactions ont été incubées 2 h à 37°C. Lors de la digestion de plasmides, ces derniers ont ensuite été déphosphorylés par l'ajout de 1 µl de phosphatase intestinale de veau (CIP, NEB) suivi d'une incubation de 30 min à 37°C. Les fragments d'ADN digérés ont été purifiés à l'aide d'un gel d'agarose SeaKem 1% permettant un contrôle de la digestion ainsi que de la taille des fragments obtenus. La ligation des fragments d'ADN a été réalisée avec l'enzyme T4 DNA ligase de NEB dans un volume réactionnel de 20 µl. Différents ratio Vecteur : Insert ont été utilisés lors de chaque réaction ainsi qu'une condition Vecteur sans Insert comme contrôle négatif.

1.4 Transformation des bactéries :

Les bactéries utilisés pour la production des différents plasmides sont des *Escherichia coli* (*E.coli*) XL-1 Blue compétentes pour une transfection au chlorure de calcium et choc thermique dans le cas du plasmide pETOM ou électro-compétentes dans le cas des plasmides d'expression eucaryote.

1.4.1 Transformation CaCl₂ et choc thermique :

Pour cette méthode de transformation, des XL-1 Blue conservées à -80°C dans une solution comprenant 0,1 M de CaCl₂ et 10% de glycérol sont mises en contact avec l'ADN. Après 30 min d'incubation sur glace, les bactéries sont soumises à une incubation à 42°C pendant 1 min 30 secondes suivie d'une incubation de 2 min sur glace avant d'être placée 2 h à 37°C en présence de milieu LB. A l'issue de cette incubation 100 µl des bactéries transformées sont étalées sur une boîte LB Agar contenant l'antibiotique approprié et incubées sur la nuit (O/N) à 37°C.

1.4.2 Electroporation :

Pour cette méthode de transfection, des XL-1 Blue conservées à -80°C dans une solution comprenant 1 mM de tampon HEPES et 10% de glycérol sont mises en contact avec l'ADN. Après transfert dans une cuve d'électroporation, ce mélange est soumis à un choc électrique (2,5 kV, 200Ω, 25 µF) suivi d'une incubation de 2 h à 37°C en présence de milieu LB. A l'issue

de cette incubation 100 µl des bactéries transformées sont étalées sur une boîte LB Agar contenant l'antibiotique approprié et incubées (O/N) à 37°C.

1.4.3 Antibiotiques :

Afin de sélectionner les bactéries transformées avec les différents plasmides, celles-ci ont été incubées dans du milieu LB contenant l'antibiotique dont le plasmide possède le gène de résistance. La liste des différents antibiotiques, les concentrations utilisées ainsi que les plasmides codant pour le gène de résistance à cet antibiotique sont listé en Table 3.

Antibiotique	Concentration	Plasmides
Ampicilline	100 µg/ml	pETOM
Zéocine	25 µg/ml	pβ-Actin
Kanamycine	50 µg/ml	pEGFP-C1 (Cb), pcDNA 3.1 (LEXY)
Chloramphénicol	50 µg/ml	pLysS (BL-21)

Table 3 : Liste des antibiotiques utilisés pour la culture bactérienne

1.5 Préparations ADN

1.5.1 Minipréparations

Les minipréparations d'ADN ont été réalisées à partir de cultures de 4,5 ml de bactéries transformées dans du LB contenant l'antibiotique approprié. Après une incubation O/N à 37°C, les bactéries ont été centrifugées et traitées à l'aide du kit PureYield® Plasmid Miniprep System de Promega selon les recommandations du fabricant.

1.5.2 Midipréparations

Les midipréparations d'ADN ont été réalisées à partir de cultures de 100 ml de bactéries transformées dans du LB contenant l'antibiotique approprié. Après une incubation O/N à 37°C, les bactéries ont été centrifugées. Pour les plasmides pETOM utilisés pour l'expression en système procaryote, les culots bactériens ont été traités à l'aide du kit NucleoBond® Extra Midi de Macherey-Nagel selon les recommandations du fabricant. Pour les plasmides utilisés pour l'expression en système eucaryote, les culots bactériens ont été traités à l'aide du kit

Plasmid Plus Midi de QIAGEN selon les recommandations du fabricant. Ce kit a été utilisé car il permet le retrait des endotoxines bactériennes de la préparation d'ADN.

1.6 Présentations des différents clonages réalisés

1.6.1 Insertion du Tag E6 dans le plasmide p β -Actin-VHHC6 -eGFP

Initialement, les vecteurs d'expression p β -Actin n'étaient pas pourvu d'un tag permettant la reconnaissance des VHHs par un anticorps. Pour y remédier, un tag issu de la séquence N-terminale de la protéine E6 du virus HPV-16 (Courtête et al., 2007), l'E6-Tag, contre lequel un anticorps a été développé dans notre laboratoire a été introduite dans le vecteur p β -Actin codant pour le VHH C6. Des oligonucléotides sens et antisens (E6T-Spe-HindIII For et E6T-Spe-HindIII Rev) codants pour l'E6-Tag et possédant un site de restriction HindIII ainsi que des extrémités cohésives du site de restriction SpeI ont été créés. Ces oligonucléotides ont été phosphorylés grâce à un traitement à l'enzyme T4 Polynucléotide Kinase (PNK, NEB) selon les instructions du fabricant. Les oligonucléotides phosphorylés ont ensuite été hybridés par chauffage à 100°C suivi d'un refroidissement jusqu'à atteindre la température ambiante (RT). Le fragment E6-Tag ainsi créé a été inséré dans le vecteur p β -Actin-VHHC6-eGFP digéré avec l'enzyme de restriction SpeI (Figure 28).

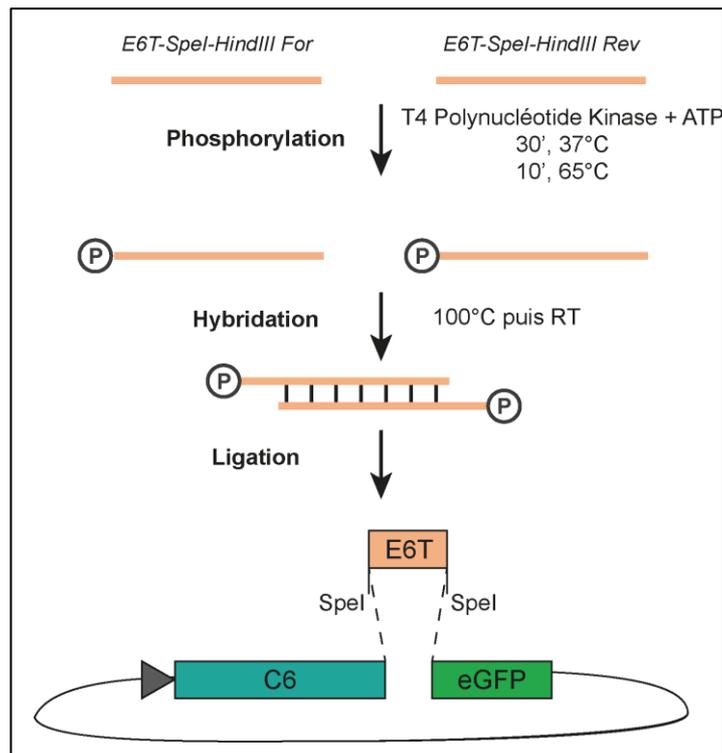


Figure 28 : Insertion de l'E6-Tag dans les vecteurs $p\beta$ -Actin-VHHC6-eGFP

1.6.2 Création du C6 bivalent (C6B) :

Afin de créer une version bivalente du VHH C6, la stratégie retenue a été d'intégrer un second VHH C6 précédé d'un linker flexible (G4S)₃ constitué de 3 répétitions du motif 4 glycines-1 sérine au sein des plasmides d'expression eucaryotes et procaryotes contenant le VHH C6 monovalent. Ce clonage a été réalisé par PCR recombinante (Figure 29). La première PCR (PCR1) a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour le VHH C6 suivi du linker (G4S)₃ en utilisant les oligonucléotides $p\beta$ -Actin For et C6-G4S Rev et le plasmide $p\beta$ -Actin-VHHC6-E6T-eGFP comme matrice ADN. La seconde PCR (PCR2) a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour le linker (G4S)₃ suivi du VHH C6 en utilisant les oligonucléotides G4S-C6 For et E6T Rev et le plasmide $p\beta$ -Actin-VHHC6-E6T-eGFP comme matrice ADN. La PCR2 a été réalisée avec une température d'hybridation de 55°C. La PCR recombinante a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour les 2 VHHs C6 séparés par le linker (G4S)₃. Lors de cette PCR, les fragments C6-(G4S)₃ et (G4S)₃-C6 créés précédemment se sont hybridés au niveau de la séquence du linker et la phase d'élongation a permis la synthèse de la séquence complémentaire. L'utilisation des oligonucléotides $p\beta$ -Actin For et E6T Rev a permis l'amplification de ce fragment. La PCR recombinante a été réalisée avec une température

d'hybridation de 62°C. Afin d'insérer ce fragment au sein des vecteurs d'expression, nous avons utilisé le site de restriction NcoI présent au niveau de la région CDR1 du VHH C6. Ce site de restriction a permis l'ouverture des vecteurs p β -Actin-VHHC6-E6T-eGFP et pETOM-VHHC6-E6T-6His et l'insertion du fragment codant pour le second VHH C6 et le linker (G4S)3. Le contrôle de l'orientation a été réalisé par séquençage des clones obtenus.

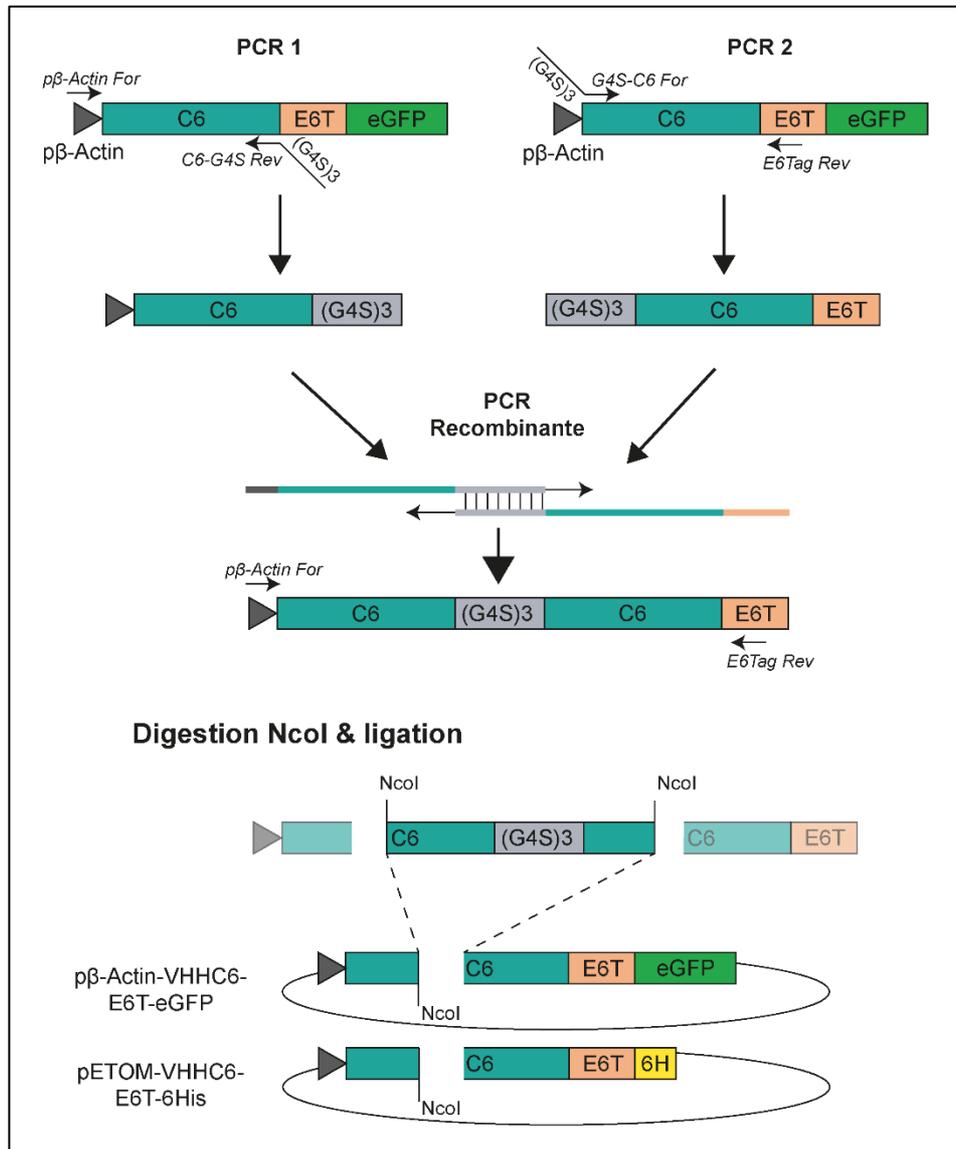


Figure 29 : Création du VHH C6 bivalent par PCR recombinante

1.6.3 Remplacement de l'eGFP par la mCherry

L'eGFP a été remplacée par la mCherry dans les plasmides p β -Actin. La fragment codant pour la mCherry a été synthétisé par PCR en utilisant les oligonucléotides mCherry-p β For et mCherry-p β Rev sur le plasmide pCEP4 fourni par le docteur Marc Vigneron (Dietsch et al.,

2017) comme matrice d'ADN. Ce fragment a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction HindIII et EcoRI et inséré en remplacement de l'eGFP dans les plasmides p β -Actin digérés avec les mêmes enzymes de restriction (Figure 30).

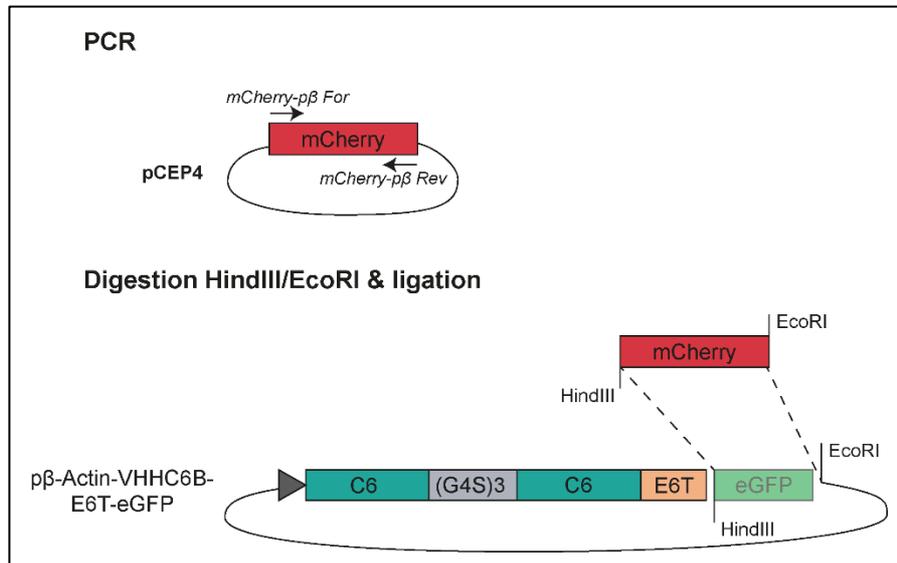


Figure 30 : Remplacement de l'eGFP par la mCherry

1.6.4 Chromatibody bivalent et bispécifique :

Une version bivalente du chromatibody (Cb) ainsi qu'une version hybride associant le VHH C6 et le Cb ont été créées et intégrées dans les plasmides pCMV-CB-HA-eGFP sous contrôle du promoteur CMV. Dans ces constructions, les VHHs sont séparés par un linker (G4S)3.

1.6.4.1 Chromatibody bivalent :

La version bivalente du Chromatibody a été réalisée par PCR en utilisant les oligonucléotides CB-NheI For et CB-G4S-XhoI Rev et le plasmide pCMV-CB-HA-eGFP comme matrice ADN. Cette PCR a été réalisée avec une température d'hybridation de 65,4°C. Le fragment d'ADN codant pour le Cb suivi du linker (G4S)3 a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction NheI et XhoI et a été intégré en aval du chromatibody dans le plasmide pCMV-CB-HA-eGFP digéré avec les mêmes enzymes de restriction (Figure 31).

1.6.5 Le chromatibody bispécifique : Hybride Chromatibody/C6 :

La version bispécifique du Cb précédé d'un VHH C6 a été réalisée par PCR en utilisant les oligonucléotides C6-NheI For et C6-G4S-XhoI Rev et le plasmide p β -Actin-VHHC6-E6T-eGFP comme matrice ADN. Cette PCR a été réalisée avec une température d'hybridation de 60,3°C. Le fragment d'ADN codant pour le VHH C6 suivi du linker (G4S)₃ a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction NheI et XhoI et a été intégré en aval du Cb dans le plasmide pCMV-CB-HA-eGFP digéré avec les mêmes enzymes de restriction (Figure 31).

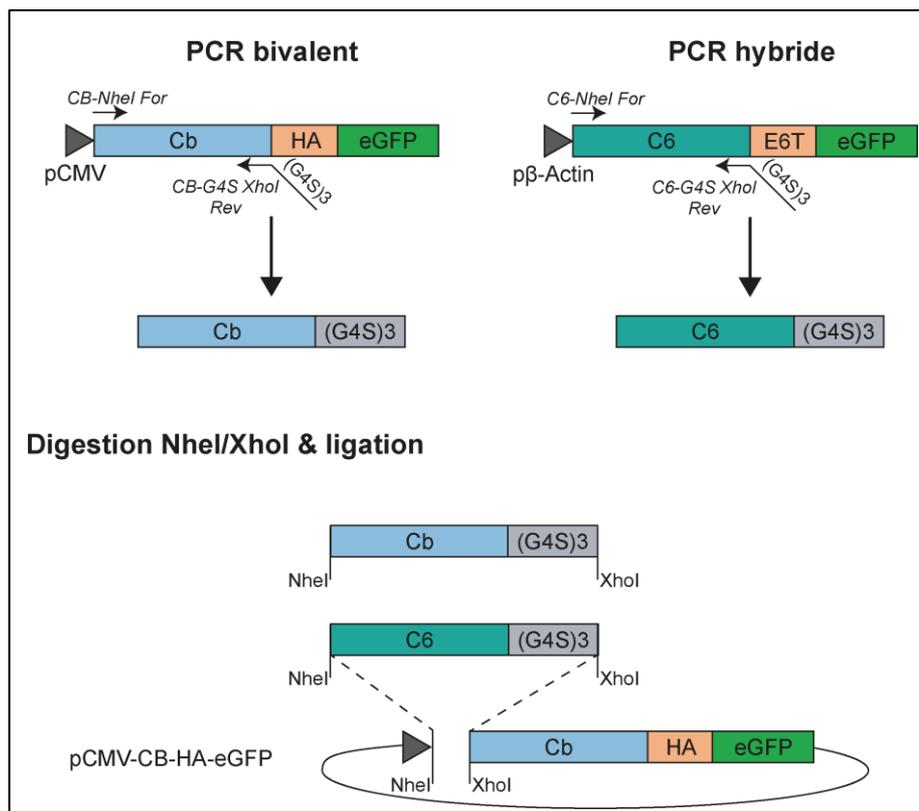


Figure 31 : Création des Chromatibody bivalent et hybride par PCR

1.6.6 Intégration des séquences NES et NLS

1.6.6.1 Intégration des séquences NES

Les séquences NES ont été intégrées dans les plasmides codants pour les VHH C6 et C6B en utilisant le site de restriction HindIII et dans le plasmide codant pour le Cb en utilisant le site BamHI. Les oligonucléotides sens et antisens (NES-HindIII/BamHI For et NES-HindIII/BamHI Rev) codants pour les séquences NES et possédant des extrémités cohésives des sites de restriction HindIII ou BamHI ont été créés. Ces oligonucléotides ont été phosphorylés grâce à

un traitement à l'enzyme T4 PNK selon les instructions du fabricant. Les oligonucléotides phosphorylés ont ensuite été hybridés par chauffage à 100°C suivi d'un refroidissement jusqu'à atteindre RT. Les différentes séquences NES ainsi générées ont pu être intégrées dans les plasmides p β -Actin codant pour les VHH C6 et C6B en utilisant le site de restriction HindIII et dans le plasmide pCMV codant pour le Cb en utilisant le site de restriction BamHI (Figure 32). Le contrôle de l'orientation a été réalisé par séquençage des clones obtenus.

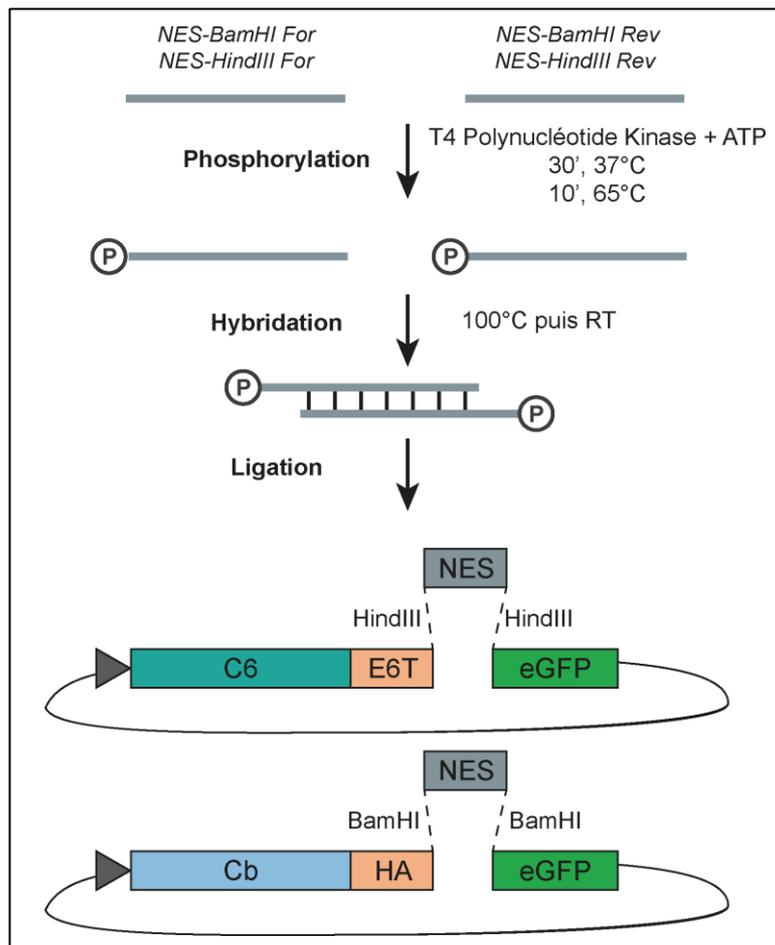


Figure 32 : Clonage des séquences NES dans les vecteurs p β -Actin-C6/C6B et pCMV-Chromatibody

1.6.6.2 Intégration d'une séquence NLS dans la construction C6B NES

Les séquences NLS de la protéine SV40 ou de la protéine cMyc ont été intégrées en C-terminal de la séquence codante du C6B possédant le NES PKI α par PCR. Un fragment E6Tag-NES-eGFP-NLS a été généré par PCR en utilisant les oligonucléotides E6Tag-BamHI For et EGFP-NLS Rev et le plasmide p β -Actin-VHHC6B-E6T-NESPKI α -eGFP comme matrice ADN. Le fragment d'ADN E6Tag-NES-eGFP-NLS a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et EcoRI et a

été intégré en remplacement de la séquence E6Tag-NES-eGFP dans le plasmide p β -Actin-VHHC6B-E6T-NESPKI α -eGFP digéré avec les mêmes enzymes de restriction (Figure 33).

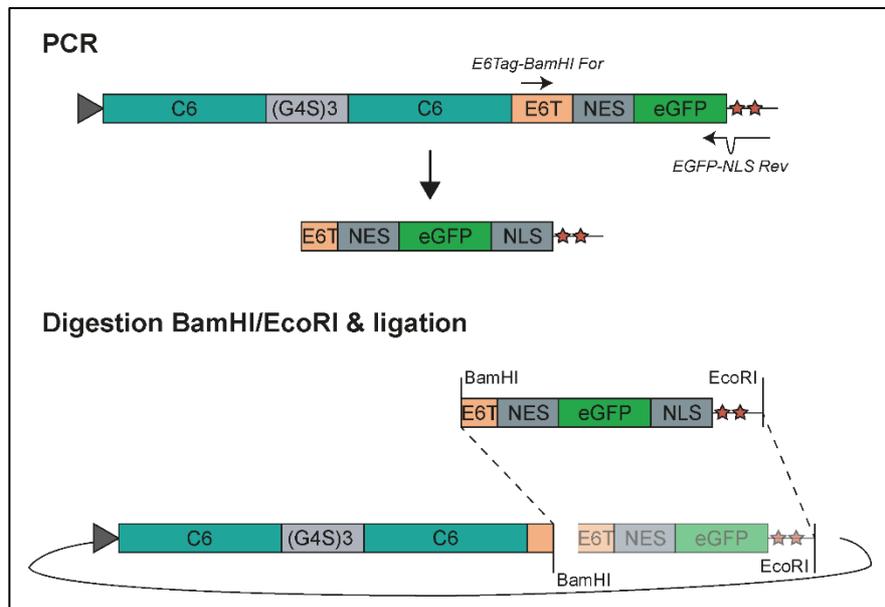


Figure 33 : Clonage des séquences NLS dans le vecteur p β -Actin-VHHC6B-E6T-NESPKI α -eGFP

1.6.7 Mutation des résidus du CDR3 du VHH C6

La version du VHH C6 présentant des mutations dans la région CDR3 a été créée par PCR recombinante (Figure 34).

Les oligonucléotides codant pour ces mutations et utilisés pour réaliser les PCRs sont dénommés C6-Mut. La première PCR (PCR1) a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour la partie N terminale du VHH C6 jusqu'au CDR3 en utilisant les oligonucléotides p β -Actin For et C6-Mut Rev (1 ou 2) et le plasmide p β -Actin-VHHC6-E6T-eGFP comme matrice ADN. La PCR1 a été réalisée avec une température d'hybridation de 60°C. La seconde PCR (PCR2) a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour le VHH C6 à partir du CDR3 suivi de l'E6-Tag et l'eGFP en utilisant les oligonucléotides C6-Mut For (1 ou 2) et eGFP-EcoRI Rev et le plasmide p β -Actin-VHHC6-E6T-eGFP comme matrice ADN. La PCR2 a été réalisée avec une température d'hybridation de 60°C. La PCR recombinante a permis la création d'un fragment d'ADN codant pour le VHH C6 muté suivi de l'E6-Tag et l'eGFP. Lors de cette PCR, les fragments issus des PCR1 et 2 se sont hybridés au niveau de la séquence du CDR3 et la phase d'élongation a permis la synthèse de la séquence complémentaire. L'utilisation des

oligonucléotides β -Actin For et eGFP-EcoRI Rev a permis l'amplification de ce fragment. La PCR recombinante a été réalisée avec une température d'hybridation de 60°C. Afin d'insérer ce fragment au sein des vecteurs d'expression, nous avons utilisé le site de restriction NcoI présent au niveau de la région CDR1 du VHH C6 et le site de restriction NotI présent en 3' de la séquence du VHH. Ces sites de restriction ont permis le remplacement de la séquence du VHH non muté au sein des vecteurs β -Actin-VHHC6-E6T-eGFP et pETOM-VHHC6-E6T-6His par le fragment codant pour les versions mutées du VHH C6. Les versions bivalentes des mutants du VHH C6 ont été créées comme décrit précédemment (Figure 29).

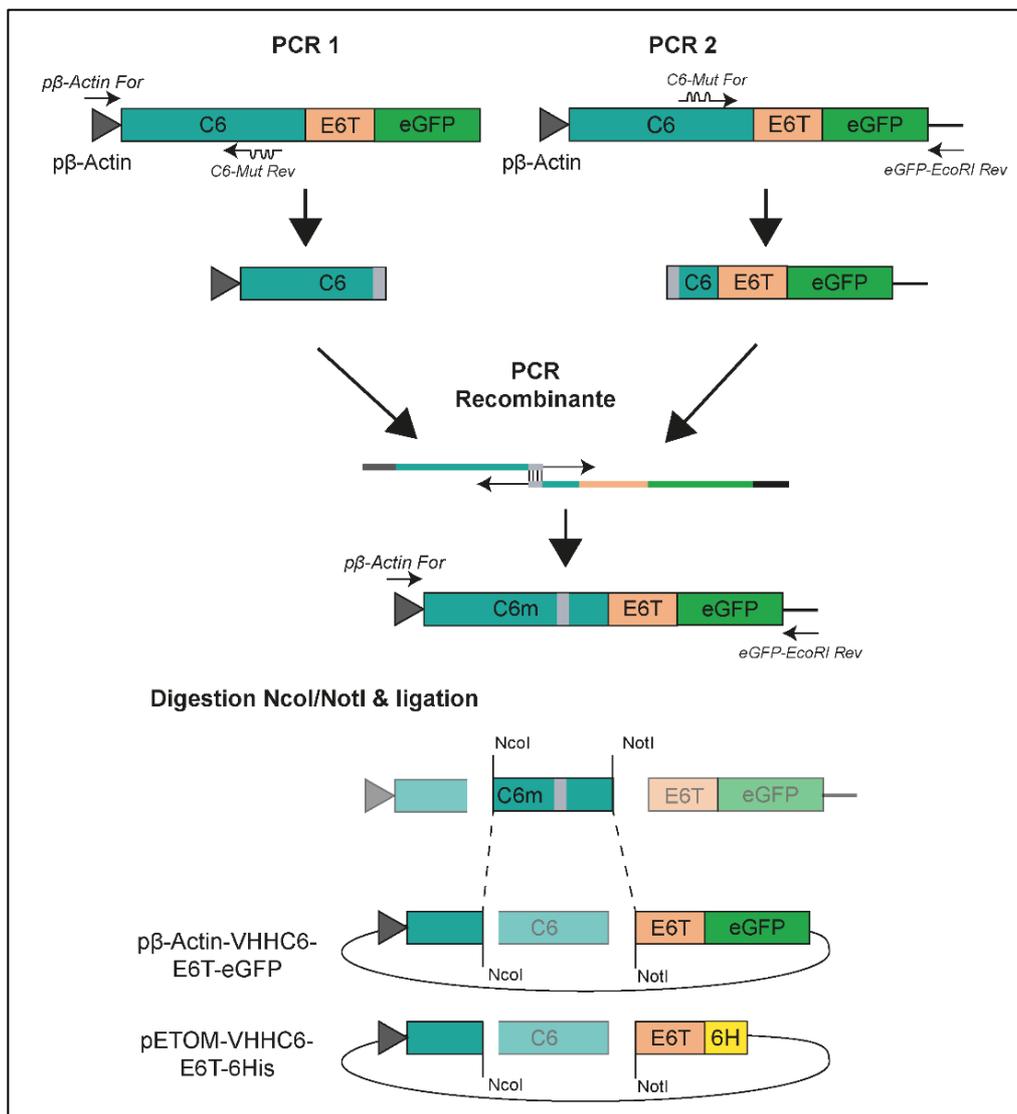


Figure 34 : Création des versions du VHH C6 mutées dans la région CDR3 par PCR recombinante

1.6.8 Intégration de cystéines dans la séquence du VHH C6

Dans le but de pouvoir conjuguer le VHH C6 avec des fluorochromes activés avec un groupement maléimide, une version du VHH C6 pourvu de résidus cystéines a été créé. La position des cystéines a été choisie d'après une étude qui a montré que l'ajout de cystéines en position N-terminale, C-terminale et en remplacement de la sérine en position 7 par une cystéine permettait d'obtenir un marquage efficace (Pleiner et al., 2015). Sur le VHH C6 les cystéines ont été ajoutées en position 3, en remplacement de la sérine en position 7 ainsi qu'en C-terminal. L'intégration de ces cystéines a été réalisée par PCR en utilisant les oligonucléotides C6-3Cys For et C6-3Cys Rev et le plasmide pETOM-VHHC6-E6T-6His comme matrice ADN. Le fragment d'ADN codant pour le VHH C6 avec 3 cystéines (C63C) a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction BspHI et NotI et a été intégré en remplacement d'un ScFv dans le plasmide pETOM-ScFvP26-E6T-6His digéré avec les enzymes de restriction NcoI et NotI (Figure 35).

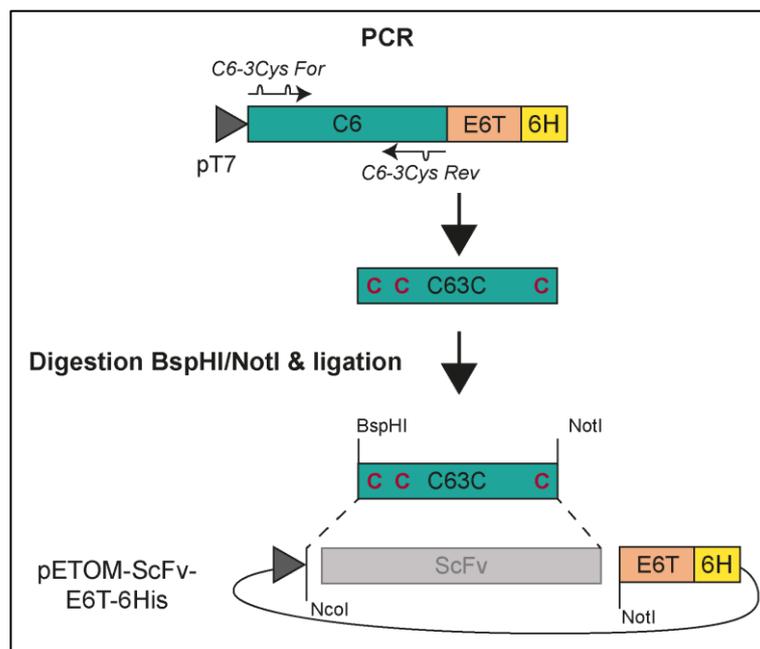


Figure 35 : Création du VHH C63C par PCR

Des versions du VHH C6 comportant 2 cystéines en position N-terminale (C62C) ou 1 cystéine en position C-terminale (C61C) ont également été créées en utilisant les oligonucléotides C6-3Cys (Figure 36) et en appliquant le même protocole que pour le VHH C63C.

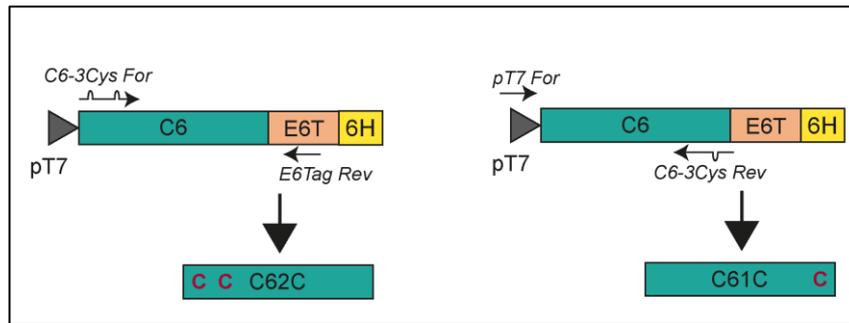


Figure 36 : Création des VHH C62C et C61C par PCR

L'ensemble de VHHs modifiés pour intégrer des cystéines ont été dimérisés comme décrit précédemment, permettant la création des VHHs C6B3C, C6B2C et C6B1C (Figure 37).

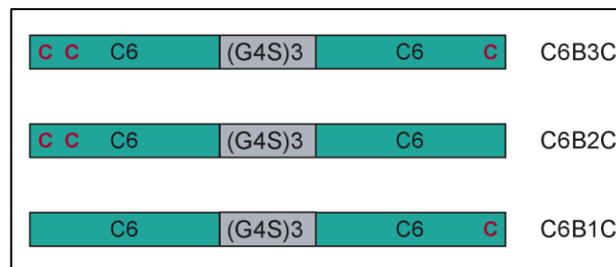


Figure 37 : VHHs C6B3C, C6B2C et C6B1C

2 Test ELISA

Les expériences d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ont été réalisées en plaques 96 puits Maxisorb de Nunc. Pour mesurer la réactivité des VHHs envers H2AX, des peptides C-terminaux de H2AX, de séquence CKATQASQEY non phosphorylés, avec une phosphosérine en position 139 ou avec une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 ont été utilisés. Avant la réalisation de l'ELISA, les plaques ont été incubées O/N à 4°C en présence de 100 µl des peptides cibles dilués à 1 µg/ml dans du PBS. A l'issue de cette incubation, les plaques ont été lavées 3 fois au PBS puis les puits ont été saturés avec 200 µl de PBS contenant 5% de lait pendant 1 h à RT. Après 3 lavages au PBS, l'anticorps primaire ou le VHH dilués dans du PBS contenant 0,2% de lait ont été incubés pendant 2 h à RT. A l'issue des incubations en présence d'anticorps, les plaques ont été lavées 3 fois avec du PBS contenant 0,1% de NP-40 puis 3 fois au PBS. Dans le cas des VHHs, cette incubation a été suivie d'une incubation avec l'anticorps 4C6 (dirigé contre le tag E6). Puis les anticorps ont été incubés avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP). La présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP a été révélée grâce à une réaction chromogénique en

utilisant 100 µl de substrat (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) 0,42 mM, acétate de sodium 0,1 M pH6, H₂O₂ 0,007% (m/m)) et la réaction enzymatique a été stoppée avec 50 µl de H₂SO₄ 1 M. L'intensité de la réaction chromogénique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre par lecture de la densité optique (DO) à 450 nm soustraite de la DO à 650 nm.

2.1 Test ELISA par compétition

Pour les expériences d'ELISA par compétition Les anticorps primaires ou les VHHs testés ont été incubés avec des concentrations croissantes des peptides cibles préalablement à leur incubation en présence des peptides adsorbés sur le support. Les autres étapes de ces expériences ont été réalisées comme décrites pour l'ELISA standard.

3 Production des VHHs

Pour la production de VHHs, des bactéries *Escherichia coli* BL-21 (DE3) pLysS ont été transformés avec les plasmides pETOM codant pour les différents VHHs. Après induction, les bactéries ont été lysées et les VHHs purifiés par chromatographie d'affinité suivi d'une chromatographie par exclusion de taille. L'ensemble des tampons et solutions utilisés pour la purification sont dégazés et filtrés à 0,2 µm. Les colonnes de purification ont été utilisées avec un Aktä Purifier

3.1 Transformation des bactérie *E.coli* BL-21 et induction de l'expression

Les bactéries BL-21 compétentes pour une transfection au chlorure de calcium et choc thermique ont été transformées avec les plasmides pETOM suivant le même protocole que les bactéries XL-1 Blue. 100 µl de bactéries transformées ont été étalées sur boîte LB contenant du chloramphénicol et de l'ampicilline et incubées O/N à 37°C. Une préculture de 4,5 ml a été réalisée à partir d'une des colonies obtenues et cette préculture a été utilisée pour réaliser une culture de 500 ml. Lorsque cette culture a atteint une densité optique à 600nm (DO_{600nm}) égale à 0,5, de l'IPTG à 1 mM final a été ajouté à la culture pour induire l'expression des protéines. Un aliquot de 1 ml a été prélevé au préalable afin de contrôler l'induction. Après une incubation O/N, la culture a été centrifugée et pouvait être stockée à -80°C en vue d'une purification ultérieure. L'induction de l'expression des protéines a été

contrôlée par SDS-PAGE (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes).

3.2 Lyse des bactéries

Afin d'extraire les protéines produites par les bactéries BL-21, ces dernières ont été lysées par sonication. Pour ce faire, les culots stockés à -80°C ont été resuspendus dans un tampon de lyse (HEPES 20 mM pH 7,2 ; NaCl 0,5 M ; 0,2 mM PMSF ; 1 mM EDTA) complété avec un inhibiteur de protéase Complete EDTA Free (Roche), 200 µg de DNase I et 200 µg de RNase A. Les bactéries resuspendues ont ensuite été soniquées 5 fois pendant 1 min (20% Amplitude ; 1'' pulse ; 0,5'' repos). Un aliquot de l'extrait total obtenu a été conservé pour analyse. L'extrait total a ensuite été soumis à une ultracentrifugation (36.000 rpm, 8°C) pendant 30 min. La phase soluble a été récupérée pour la purification et le culot (phase insoluble) a été resuspendu dans de l'urée 8M pour une analyse ultérieure. La phase soluble a été filtrée avec un filtre 0,2 µm et purifiée par chromatographie d'affinité.

3.3 Chromatographie d'affinité

Pour la chromatographie d'affinité, une colonne Nickel HisTrap Excel 1 ml (GE Healthcare) équilibré avec un tampon HEPES (HEPES 20 mM pH 7,2 ; NaCl 0,5 M) a été utilisée. La phase soluble a été chargée sur la colonne. Après la phase de chargement, une phase de lavage avec un tampon HEPES complété avec 50 mM d'imidazole a été réalisée sur 20 volumes de colonne et collectée en fractions de 1 ml. Enfin une phase d'élution avec un tampon HEPES complété avec 500 mM d'imidazole a été réalisée sur 10 volumes de colonne et collectée en fractions de 1 ml. L'analyse du chromatogramme a permis de sélectionner les fractions qui ont été purifiées par chromatographie d'exclusion de taille. A l'issue de la chromatographie d'affinité, une première analyse de l'extrait total, des phases soluble et insoluble, de l'effluent, d'une fraction de lavage et des fractions d'élution a été réalisée par SDS-PAGE.

3.4 Chromatographie d'exclusion de taille

Pour la chromatographie d'affinité, des colonnes Superdex 75 10/300 ou HiLoad Superdex 75 16/600 (GE Healthcare) équilibrées avec un tampon phosphate (PBS) ont été utilisées. Des injections de 500 µl maximum (Superdex 75) ou de 5 ml maximum (HiLoad Superdex 75) des

fractions obtenues lors de la phase d'élution de la chromatographie d'affinité ont été réalisées. Des fractions de 500 µl ont été collectées et l'analyse du chromatogramme a permis d'isoler les fractions contenant la protéine d'intérêt. Les fractions sélectionnées ont été contrôlées par SDS-PAGE.

3.5 Concentration et stockage

A l'issue du contrôle par SDS-PAGE, les fractions retenues ont été rassemblées et concentrées à l'aide de filtres Amicon Ultra avec une taille d'exclusion (MWCO) adaptée. A l'issue de la phase de concentration, la concentration protéique a été mesurée grâce à un Nanodrop 2000 (ThermoFisher) en mesurant l'absorbance à 280 nm et en renseignant le coefficient d'extinction (ϵ) et la masse moléculaire de la protéine. La solution protéique a ensuite été aliquotée et stockée à -80°C avec 10% de glycérol

4 Conjugaison des VHHs avec des fluorochromes

4.1 Fluorochromes activés avec un groupement NHS

Pour le marquage des VHHs à l'aide de fluorochromes (Alexa) activés par un groupement N-Hydroxysuccinimide (NHS), les VHHs purifiés ont été placés dans du tampon PBS, 0,1 M de NaHCO₃. Différents ratio Alexa : VHHs ont été testés, en ajoutant différents volumes d'Alexa-NHS en solution dans du DMSO en vortexant. Après 1 h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'excès de fluorochrome a été retiré en utilisant le système Fluorescent Dye Removal Column de ThermoFisher selon les recommandations du fabricant. Les échantillons ainsi récupérés ont été analysés par SDS-PAGE.

4.2 Fluorochromes activés avec un groupement Maléimide

Les expériences de marquage des VHHs par des fluorochromes activés avec un groupement maléimide ont été réalisés sur les VHHs intégrant des cystéines supplémentaires.

4.2.1 Production

Afin d'éviter la multimérisation des VHHs intégrant des cystéines supplémentaires, la purification de ces VHHs a été réalisée en ajoutant de l'EDTA à 1 mM final et du TCEP à 2 mM

final aux tampons utilisés lors de la purification (tampon HEPES et PBS) et les VHHs ont été stockés à -80°C dans du PBS EDTA 1 mM TCEP 2 mM et 10% de glycérol.

4.2.2 Marquage

Pour la réaction de conjugaison, les fluorochromes activés avec un groupement maléimide ont été ajoutés aux VHHs purifiés en vortexant. La réaction a été incubée pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. A l'issue de cette incubation, du N-éthylmaléimide (N-EM) a été ajouté avec un excès de 10x pour neutraliser les éventuelles cystéines ne s'étant pas couplées à un fluorochrome. Après 1 h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'excès de fluorochrome et de N-EM a été retiré en utilisant le système Fluorescent Dye Removal Column de ThermoFisher selon les recommandations du fabricant. Les échantillons ainsi récupérés ont été analysés par SDS-PAGE. Certains marquages ont été réalisés en remplaçant au préalable le PBS, EDTA 1 mM, TCEP 2 mM, 10% glycérol par du tampon de marquage maléimide (Maleimide Labeling Buffer, MLB : 100 mM KH_2PO_4 pH 6,4 ; 150 mM NaCl, 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA) en utilisant des colonne Zeba Spin Desalting (Thermofisher) avec un MWCO de 7 kDa selon les recommandations du fabricant. Lorsque que le tampon MLB a été utilisé, le pH a été ajusté à 7,5 juste après l'ajout du fluorochrome en ajoutant du K_2HPO_4 à hauteur de 23,2% du volume réactionnel.

4.3 Analyse du degré de marquage (Degree of Labeling, D.O.L.)

A l'issue des marquages, le nombre moyen de fluorochromes par VHH a été évalué par mesure de l'absorbance et 280 nm (A_{280}) et de l'absorbance maximale du fluorochrome (A_{max}) grâce à un Nanodrop 2000 (Thermofisher). Ces mesures ont permis d'estimer la concentration en protéine ($C_{protéine}$) marqué ainsi que le D.O.L. grâce aux formules suivantes :

$$C_{protéine} = \frac{A_{280nm} - (A_{max} \times CF)}{\epsilon_{protéine}}$$

$$D.O.L. = \frac{A_{max}}{\epsilon_{dye} \times C_{protéine}}$$

Avec CF = Facteur de Correction ; $\epsilon_{\text{protéine}}$ = coefficient d'extinction molaire de la protéine et ϵ_{dye} = coefficient d'extinction molaire du fluorochrome. Les valeurs du CF, de l' A_{max} et de l' ϵ_{dye} pour les fluorochromes utilisés sont renseignés en Table 4.

Fluorochrome	A_{max}	ϵ_{dye}	CF
Alexa 488	496	70.000	0,147
Alexa 568	578	91.000	0,46
Sulfo-Cy3	548	162.000	0,06

Table 4 : Valeurs de l' A_{max} , du coefficient d'extinction (ϵ_{dye}) et du facteur de correction (CF) des différents fluorochromes utilisés.

5 Culture cellulaire

5.1 Généralités

Les cellules HeLa (adénocarcinome), U2-OS (ostéosarcome), H1299 (carcinome) et HFF-1 (fibroblastes) ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% de FCS décomplémenté, 10 mM de tampon HEPES, 2 mM de L-Glutamine et 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicine. Les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5% de CO_2 . Les cellules ont été conservées pendant 10 passages à l'issue desquels de nouvelles cellules ont été décongelées. Les cellules ont été testées pour la présence de mycoplasmes par une analyse en microscopie après marquage au DAPI.

5.2 Traitements

L'ensemble des molécules génotoxiques utilisées pour le traitement des cellules ainsi que leur concentration et le solvant dans lequel elles sont solubilisées sont indiqués en Table 5.

Produit	Concentration	Solvant
Hydroxyurée (HU)	2 mM	H ₂ O
Gemcitabine (G)	0,1 µM	H ₂ O
Clofarabine (C)	0,3 µM	DMSO
Triapine (T)	2 µM	DMSO
Camptothécine (CPT)	1 µM	DMSO
Epirubicine (EPI)	0,5 µM	DMSO
Etoposide (ETO)	10 µM	DMSO
Cisplatine (CIS)	10 µM	DMF
Oxaliplatine (OXA)	10 µM	DMSO
AZD-7762 (A)	0,1 µM	DMSO
VE-821 (V)	1 µM	DMSO

Table 5 : Liste des produits génotoxiques et des concentrations utilisées

5.2.1 L'induction de γ -H2AX

Dans les différentes expériences de caractérisation des VHHs, ces derniers ont été utilisés sur des cellules dans lesquelles γ -H2AX a été induit ou non. Les conditions utilisées pour induire différents niveaux de stress réplicatif et donc de phosphorylation de H2AX ont été mises au point durant le travail sur l'article n°1. Les VHHs ont ainsi pu être testées dans des cellules soumises à un stress réplicatif modéré, provoquant une induction faible de γ -H2AX avec un marquage en foci majoritaire ou dans des cellules soumises à un stress réplicatif fort, provoquant une induction forte de γ -H2AX (marquage pan-nucléaire majoritaire). Ces différentes conditions sont illustrées en Figure 38.

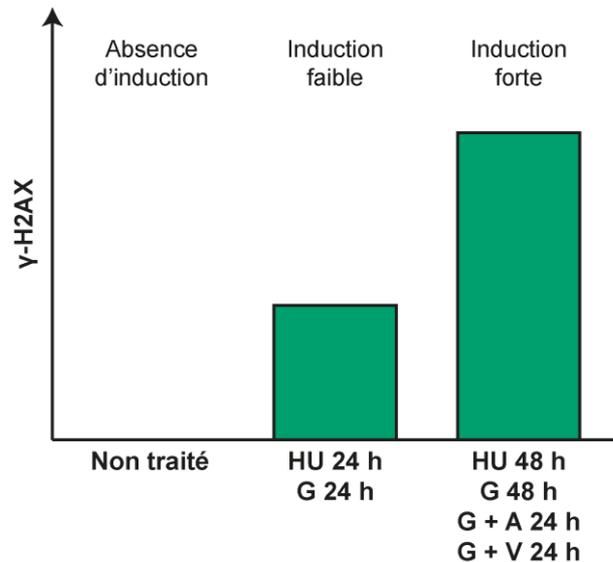


Figure 38 : Les différentes conditions d'induction de γ -H2AX

5.3 Transfection

Les cellules ont été transfectées avec les réactifs JetPrime ou JetOptimus de Polyplus Transfection selon les recommandations du fabricant avec un ratio quantité d'ADN (μg) : volume de réactif (μl) de 1:2 pour le JetPrime et de 1:1 pour le JetOptimus. Après 4 ou 24 h d'incubation en présence du mix de transfection, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais contenant ou non les produits génotoxiques testés.

5.4 Transduction

La vectorisation de protéines dans les cellules vivantes par électroporation a été réalisée avec un dispositif de transfection Néon (Life Technologies) selon la méthode mise au point au sein de notre laboratoire (Freund et al., 2013). 10^5 cellules par condition de transfection ont été utilisées. Après trypsination et lavage au PBS des cellules, celles-ci ont été mises en solution dans du PBS avec la protéine à transduire. Ce mélange a été soumis à un choc électrique (1550 V, 10 ms, 3 pulses) et les cellules ont été incubées en tubes Eppendorf contenant du milieu de culture sans antibiotique à 37 °C pendant 1 h. A l'issue de cette incubation, le milieu de culture a été remplacé et les cellules ont étéensemencées en plaque 12 ou 24 puits. Après une incubation O/N en milieu sans antibiotique, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais contenant ou non les produits génotoxiques testés.

5.5 Évaluation de la survie cellulaire

5.5.1 Mesure de la densité cellulaire

Dans certaines expériences, la survie cellulaire a été évaluée par la mesure de la densité de la population cellulaire. Pour ce faire, des cellules à une concentration de 5×10^4 cellules/ml ont étéensemencées en plaque 12 ou 24 puits. Les cellules ont été traitées puis incubées en absence de traitement pour les durées spécifiées dans chaque expérience. A l'issue des incubations, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% puis colorés au Cristal Violet. Après rinçage et séchage, le Cristal Violet a été solubilisé avec 10% d'acide acétique. La densité optique à 595 nm de la solution de Cristal Violet solubilisée a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

5.5.2 Tests clonogéniques

Les tests clonogéniques ont été réalisées comme décrits dans la littérature (Franken et al., 2006). 2×10^5 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 6 puits. Les cellules ont été traitées avec les produits génotoxiques. A l'issue du traitement, les cellules ont été récupérées et des nombres définis de cellules ont étéensemencé dans plusieurs boîte de Pétri de 60 mm par condition. Les cellules ont été incubées jusqu'à ce que des colonies de 50 cellules ou plus soient observables dans la condition non traitée. Après cette incubation, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% pendant 45 min puis colorées au Cristal Violet. Des images des boites ont été acquises grâce à un Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) en utilisant la méthode de fluorescence Cy5 (Laser 635 nm, filtre LPR) et une résolution de 100 μm . Les images obtenues ont été traitées avec le logiciel Fiji en traçant une région d'intérêt (ROI) conservée pour l'ensemble des boîtes. A l'intérieur de chaque ROI, un flou gaussien a été appliqué et l'option « Find Maxima » avec un seuil approprié a permis de dénombrer les colonies. Le nombre de colonies dénombrées a permis de calculer les paramètres d'efficacité de mise en culture (Plating efficiency, PE) et le de fraction survivante (Surviving fraction, SF) La PE est calculée à partir des cellules non traitées avec la formule (nb = nombre) :

$$PE = \left(\frac{\text{nb colonies formées}}{\text{nb cellulesensemencées}} \right) * 100\%$$

La SF est ensuite calculée pour chacune des conditions avec la formule :

$$SF = \left(\frac{\text{nb colonies formées après traitement}}{\text{nb cellulesensemencées} * PE} \right)$$

6 Microscopie

6.1 Généralités

Les observations en microscopie en épifluorescence ont été réalisées à l'aide d'un microscope Leica DM5500 B équipé d'une caméra Leica DFC 650 FX, d'un objectif 20x, d'un objectif 40x, d'un objectif 63x à immersion et des blocs filtres Leica A4, L5 et Y3. Les images ont été acquises grâce au logiciel LAS AF.

6.2 Immunofluorescence

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cellules cultivées sur des lamelles en verre. A l'issue des différents traitements, les cellules ont été fixées avec du PFA 4% pendant 45 min. Après une étape de perméabilisation avec du Triton X-100 à 0,2% pendant 5 min, les cellules ont été incubées avec les anticorps ou VHHs dilués dans du PBS contenant 2% de BSA (Bovine Serum Albumine) pendant 1 h, étape suivie le cas échéant d'une incubation avec un anticorps secondaire marqué avec les fluorochromes-Alexa 488 ou Alexa-568 dilués dans du PBS contenant 0,2% de BSA pendant 1 h. A l'issue des incubations avec les différents anticorps, les lamelles ont été monté sur des lames de microscopie à l'aide de Fluoromount G contenant du 4',6'-diamino-2phényl-indole (DAPI). La liste des anticorps utilisés en immunofluorescence est présentée en Table 6.

Anticorps/VHH	Cible	Révélation	Fournisseur
A4 (VHH)	γ -H2AX	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
A9 (VHH)	γ -H2AX	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6 (VHH)	γ -H2AX	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6B (VHH)	γ -H2AX	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6M1 (VHH)	N/A	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6M2 (VHH)	N/A	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6BM1 (VHH)	N/A	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6BM2 (VHH)	N/A	4C6 + Goat@Mouse	Laboratoire
C6-568 (VHH)	γ -H2AX	Directe	Laboratoire
C6B-568 (VHH)	γ -H2AX	Directe	Laboratoire
3F4 (mouse mAb)	γ -H2AX	Goat@Mouse	Laboratoire
4C6 (mouse mAb)	Tag-E6	Goat@Mouse	Laboratoire
Anti-53BP1 (rabbit pAb)		Goat@Rabbit	Sigma-Aldrich
Anti-phospho-RPA (S4/S8) (rabbit pAb)		Goat@Rabbit	Bethyl Laboratories
Goat@Mouse-488 (Goat pAb)	Mouse m/pAb	Directe	Life Technologies
Goat@Mouse-568 (Goat pAb)	Mouse m/pAb	Directe	Life Technologies

Table 6 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence

6.3 Evaluation des interaction VHH-antigène avec le tampon CSK

6.3.1 Principe :

Le tampon CSK est un tampon permettant de perméabiliser des membranes et d'évacuer les protéines solubles ou faiblement liées présentes à l'intérieur de la cellule (Sawasdichai et al., 2010). Les antigènes reconnus par les différents VHHs utilisés dans cette étude sont des antigènes nucléaires résistant à l'extraction par le tampon CSK (Hétérodimère H2A-H2B et γ -H2AX). Ceci a rendu possible l'utilisation de ce tampon pour évaluer l'interaction des différents VHHs avec leur antigène. Nous avons donc utilisé ce tampon pour évaluer la force de l'interaction des différents chromobodies avec leur antigène, la persistance d'un signal

fluorescent après un tel traitement indiquant ainsi une interaction forte entre le VHH et son antigène car capable de résister à l'extraction par le tampon CSK (Figure 39).

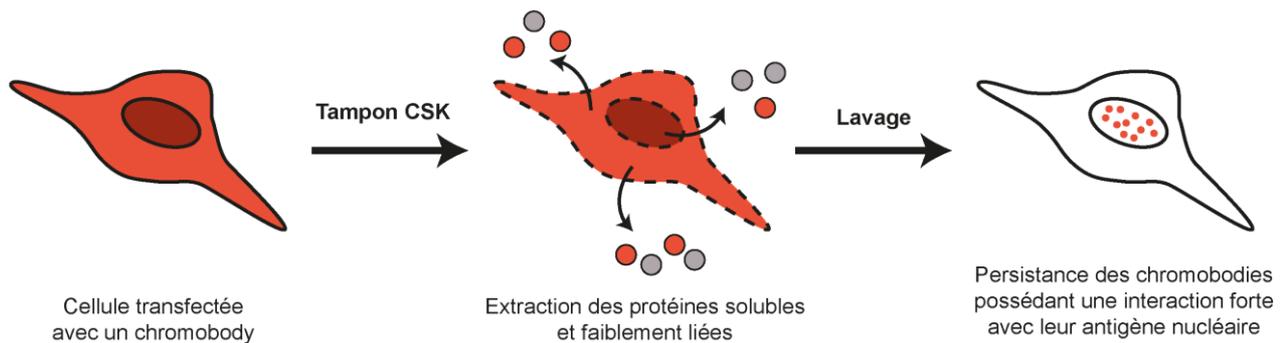


Figure 39 : Principe du test au tampon CSK

6.3.2 Composition du tampon CSK

Le tampon CSK utilisé dans cette étude possède la composition suivante : Sucrose 300 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM, Triton X-100 0,2 % ; NaCl 100 mM complété avec du PBS et un inhibiteur de protéase Complete EDTA Free (Roche).

6.3.3 Protocole

Les expériences de solubilisation au tampon CSK ont été réalisées sur des cellulesensemencées sur des lamelles de verre, transfectées et incubées en présence ou non de produits génotoxiques. A l'issue de l'incubation et après 2 lavages au PBS, le tampon CSK a été appliqué pendant 5 min. Cette incubation a ensuite été suivie de 3 lavages puis d'une fixation avec du PFA 4% pendant 45 min. La détermination du nombre de cellules présentant un signal positif a été réalisée par microscopie. Plusieurs champs de cellules ont été acquis avec l'objectif 20x en utilisant le marquage nucléaire au DAPI pour sélectionner les cellules sans être influencé par le signal fluorescent. Les images acquises ont été analysés avec le logiciel Fiji. Le marquage au DAPI a permis de définir les noyaux comme régions d'intérêt (ROI) et le signal fluorescent moyen au sein de ces ROI a ensuite été mesuré. Les données ont ensuite été analysés avec le logiciel R. L'intensité de fluorescence nucléaire de cellules non transfectées a permis d'établir un seuil au-delà duquel les cellules ont été considérées comme positives pour le signal fluorescent. La proportion de cellules positives par condition

représente le nombre de cellules analysées comme positives sur le nombre total de cellules analysées.

6.4 Quantification de l'intensité nucléaire

Les quantifications des intensités nucléaires ont été réalisées à partir des immunofluorescences des cellules traitées. Les images ont été acquises en microscopie en utilisant l'objectif 20x et les cellules ont été sélectionnées en utilisant le marquage au DAPI. Les images acquises dans les différentes conditions ont été traitées dans le logiciel Fiji. Comme pour les expériences avec le tampon CSK, le marquage DAPI a servi à déterminer les noyaux comme ROI et l'intensité moyenne de chaque noyau a été mesurée. Les données ainsi obtenues ont été traitées dans le logiciel R et représentées sous forme de « boxplots ». Dans certaines expériences, le rapport Signal/Bruit de fond a été calculé à partir de la moyenne du signal obtenu dans chaque condition et du signal observé dans les cellules non traitées (bruit de fond).

Etude de la relation entre le stress répliatif et la formation de γ -H2AX

1 Introduction

La première partie de mon projet de thèse a été l'étude de la relation pouvant exister entre γ -H2AX et le stress réplicatif, cette étude a débuté lors de mon stage de Master II. Cette thématique scientifique a été abordée par l'équipe après qu'il ait été observé que le blocage de la protéine PCNA dans les cellules vivantes par vectorisation d'anticorps provoque l'apparition d'un marquage γ -H2AX particulier. En effet, le blocage de PCNA est à l'origine d'un stress réplicatif létal et ce phénomène est accompagné d'un marquage γ -H2AX intense et étendu à l'ensemble du noyau, le marquage pan-nucléaire (Desplancq et al., 2016).

Le stress réplicatif est une caractéristique inhérente aux cellules cancéreuses et les traitements génotoxiques utilisés en clinique ont pour but d'augmenter ce stress réplicatif jusqu'à un niveau létal. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'indicateur permettant d'évaluer la létalité du stress réplicatif (Zhang et al., 2016) et notre équipe a voulu étudier si ce marquage γ -H2AX pan-nucléaire pouvait être un indicateur de la létalité du stress réplicatif.

Les observations initiales réalisées au laboratoire ont été confirmées par la publication dans la littérature scientifique d'un article décrivant également l'apparition d'un marquage γ -H2AX pan-nucléaire lorsque des cellules sont soumises à un stress réplicatif intense consécutif de l'inactivation des protéines ATR et Chk1 par des inhibiteurs spécifiques (Sanjiv et al., 2016).

Dans le cadre de cette étude, un nouvel anticorps monoclonal dirigé contre γ -H2AX a été développé. Cet anticorps a été développé et caractérisé en utilisant l'expertise et le savoir-faire de notre équipe dans la mise au point d'anticorps et ce travail a été réalisé en collaboration avec la plateforme des anticorps monoclonaux de l'IGBMC.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Cancers* en 2019 (Moeglin et al., 2019) qui est présentée ci-après.

2 Article n°1

Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress.

Eric Moeglin^{1, †}, Dominique Desplancq^{1, †}, Sascha Conic^{2,3,4,5}, Mustapha Oulad-Abdelghani^{2,3,4,5}, Audrey Stoessel¹, Manuela Chiper¹, Marc Vigneron¹, Pascal Didier⁶, Laszlo Tora^{2,3,4,5}, Etienne Weiss¹

¹ Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, Boulevard S. Brant, 67412 Illkirch, France

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67404 Illkirch, France

³ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, 67404 Illkirch, France

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France

⁵ Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

⁶ Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7213, CNRS/Université de Strasbourg, Route du Rhin, 67401 Illkirch, France

[†] Contribution égale des auteurs

Article

Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress

Eric Moeglin ^{1,†}, Dominique Desplancq ^{1,†}, Sascha Conic ^{2,3,4,5},
Mustapha Oulad-Abdelghani ^{2,3,4,5} , Audrey Stoessel ¹, Manuela Chiper ¹ ,
Marc Vigneron ¹, Pascal Didier ⁶, Laszlo Tora ^{2,3,4,5}  and Etienne Weiss ^{1,*} 

¹ Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, Boulevard S. Brant, 67412 Illkirch, France; eric.moeglin@unistra.fr (E.M.); desplanc@unistra.fr (D.D.); audrey.stoessel@unistra.fr (A.S.); chiper@unistra.fr (M.C.); marc.vigneron@unistra.fr (M.V.)

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67404 Illkirch, France; conic@igbmc.fr (S.C.); oulad@igbmc.fr (M.O.-A.); laszlo@igbmc.fr (L.T.)

³ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, 67404 Illkirch, France

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France

⁵ Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

⁶ Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR 7213, CNRS/Université de Strasbourg, Route du Rhin, 67401 Illkirch, France; pascal.didier@unistra.fr

* Correspondence: etienne.weiss@unistra.fr; Tel.: +33-0-3-68-85-47-67

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 January 2019; Accepted: 8 March 2019; Published: 13 March 2019



Abstract: Phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX), a central player in the DNA damage response (DDR), serves as a biomarker of DNA double-strand break repair. Although DNA damage is generally visualized by the formation of γ -H2AX foci in injured nuclei, it is unclear whether the widespread uniform nuclear γ -H2AX (called pan-nuclear) pattern occurring upon intense replication stress (RS) is linked to DDR. Using a novel monoclonal antibody that binds exclusively to the phosphorylated C-terminus of H2AX, we demonstrate that H2AX phosphorylation is systematically pan-nuclear in cancer cells stressed with RS-inducing drugs just before they die. The pan-nuclear γ -H2AX pattern is abolished by inhibition of the DNA-PK kinase. Cell death induction of cancer cells treated with increasing combinations of replication and kinase (ATR and Chk1) inhibitory drugs was proportional to the appearance of pan-nuclear γ -H2AX pattern. Delivery of labeled anti- γ -H2AX Fabs in stressed cells demonstrated at a single cell level that pan-nuclear γ -H2AX formation precedes irreversible cell death. Moreover, we show that H2AX is not required for RS-induced cell death in HeLa cells. Thus, the nuclear-wide formation of γ -H2AX is an incident of RS-induced cell death and, thus, the pan nuclear H2AX pattern should be regarded as an indicator of lethal RS-inducing drug efficacy.

Keywords: histone variant; H2AX phosphorylation; γ -H2AX; pan-nuclear pattern; monoclonal antibody; cancer cells; cell death; replication stress; chemotherapy; H2AFX gene; knock-out

1. Introduction

The nucleosome contains two copies of each core histone proteins (H2A, H2B, H3, and H4) and 146 base pairs of superhelical DNA wrapped around this histone octamer. Histone H2AX is a variant of the core histone H2A family and is present in 2–25% of the mammalian nucleosomes deposited on the chromatinized genome, depending on the organism and cell type [1]. Core histone proteins contain N-terminal and C-terminal tails that are sites for post-translational modifications. In contrast to the

canonical H2A, H2AX contains a unique Ser-Gln (SQ) motif in its C-terminal tail. The serine residue (S139) located four residues from the C-terminus of H2AX is rapidly phosphorylated upon DNA breakage. This phosphorylated form of H2AX is called gamma-H2AX (γ -H2AX). Phosphorylation of H2AX is one of the earliest events upon DNA double-strand break (DSB) induction, a severe form of DNA damage that leads to apoptosis if unrepaired [2].

The enzymes responsible for the phosphorylation of Ser139 of the H2AX are members of the PI3 kinase family, including ataxia telangiectasia mutated (ATM), AT and Rad-3 related (ATR), and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) proteins [3,4]. Upon DSB induction, one of these kinases phosphorylates H2AX molecules present in the chromatin regions that surround the lesion. The dynamic spreading of H2AX phosphorylation over mega base pairs of chromosomal DNA is a complex process and depends on the interaction of several other actors including MDC1, which binds directly to γ -H2AX for sensing the DSB [5]. In general, accumulation of γ -H2AX at the DSB sites is monitored with specific antibodies, which reveal nuclear foci under the microscope. Moreover, it is well accepted that the number of such γ -H2AX-labeled foci is directly proportional to the number of DSBs and, thus, gives an estimate of the severity of the DNA damage and/or the cytotoxicity of a given genotoxic agent [6].

Although γ -H2AX is generally considered as a biomarker of DSBs, it is widely accepted that γ -H2AX is also a key regulator of the DNA damage response (DDR) when the progression of the DNA replication forks is inhibited [7]. Replication halting, generally referred to as replication stress (RS), generates single-stranded DNA (ss DNA) that is prone to endonuclease cleavage, when the RPA protein levels are exhausted [8]. Fortunately, the serine/threonine kinases ATR and Chk1 counteract global replication fork collapse [9] by delaying the progression of the cell cycle and by promoting DNA repair through the activation of downstream actors via phosphorylation of H2AX. These kinases through their signaling via γ -H2AX constitute the main actors of the replication stress response (RSR) and the inhibition of the function of these kinases with drugs can thus lead to replication catastrophe. Cells can then either recover or die depending on the strength of the RS [10]. Importantly, as cancer cells have already an oncogene induced RS [11] they are more sensitive to additional RS (replication halting + inhibition of RSR) than normal cells, numerous approaches of chemotherapy and radiotherapy have been developed to trigger lethal RS in cancer cells [12]. In these studies, following drug administration and/or heavy ion irradiation γ -H2AX is used as a read-out to measure the generated RS. Whilst γ -H2AX foci formation is considered as a genotoxicity endpoint in most studies, a few recent reports described that a γ -H2AX pattern that suggested widespread uniform phosphorylation of H2AX in the nucleus upon genotoxic treatment. Such widespread and uniform nuclear γ -H2AX phosphorylation (hereafter called pan-nuclear signal) seems to be proportional to the intensity of the induced RS [13–15]. In addition, this pan-nuclear γ -H2AX pattern is observed under several RS induction conditions [16–18].

Previously, we have shown that in vivo inhibition of the functions of either PCNA or DNA polymerase alpha (which are key components of the replisome) by antibodies, strongly induced RS and the consequent phosphorylation of H2AX in cancer cells [19]. Interestingly, in our study, γ -H2AX showed a clear pan-nuclear pattern in a prominent fraction of the treated cells and these cells died upon prolonged incubation. Thus, our previous study opened the possibility that the specific inhibition of DNA replication can lead to widespread nuclear accumulation of γ -H2AX, which in turn could induce cell death. To better understand the relationship between the widespread pan-nuclear γ -H2AX pattern and cell death following replication stress, first we have generated a specific monoclonal antibody (mAb) against γ -H2AX that recognizes specifically the phosphorylated form of H2AX, but does not cross-react at all with the nonphosphorylated C-terminal tail of H2AX. Next, we have used this new mAb to investigate the fate of cancer cells following treatments with a series of RS-inducing drug combinations. Here, we show that widespread uniform pan-nuclear γ -H2AX phosphorylation pattern represents an ultimate degree of H2AX phosphorylation in the genome that precedes irreversible cell

death. In conclusion, our study demonstrates that pan-nuclear γ -H2AX phosphorylation pattern can be used as indicator of drug efficacy for RS-dependent cell death in clinical applications.

2. Results

2.1. Analysis of the Dynamics of Phosphorylated H2AX with Newly-Generated Monoclonal Antibodies

Previously, we have described that the delivery of an anti-PCNA blocking antibody induces huge RS that can be monitored with commercially available anti- γ -H2AX antibodies [19]. In this study, we have observed in many cells the appearance of pan-nuclear γ -H2AX phosphorylation pattern in several RS-induced cells. Since it was unclear whether the observed pan- γ -H2AX signal under the used RS-inducing conditions corresponded only to the phosphorylated forms of H2AX, we decided to generate monoclonal antibodies that would only detect the phosphorylated tail of H2AX and would not cross-react with the nonphosphorylated C-terminal end of H2AX. The counterselection of the obtained hybridoma clones with the nonphosphorylated peptide in parallel with the immunizing γ -H2AX phospho-peptide allowed us to isolate two candidate mAbs (1H2 and 3F4). They react specifically in immunofluorescence (IF) assays with γ -H2AX after treatment of the cells with hydroxyurea (HU), a ribonucleotide reductase (RNR) inhibitor that mainly affects the nucleotide pool availability and thus induces RS [20] (Figure 1A). Following IF detection of γ -H2AX, two IF staining patterns were observed after HU treatment: (i) most cells displayed a punctuated staining generally called RS foci, and (ii) a fraction of the cells showed an intense widespread nuclear pan- γ -H2AX staining (Figure 1A,C), as previously observed [19]. To verify whether the newly-generated mAbs bind only to γ -H2AX, we created a HeLa cell line in which the *H2AFX* gene, coding for H2AX protein, has been invalidated using the CRISPR/Cas9 technology (Materials and Methods). As expected, no γ -H2AX signal was detected in this *H2AFX*^{-/-} cell line after HU treatment (Figure 1A), indicating that both mAbs specifically recognize H2AX. Similar results were obtained with the commercial anti- γ -H2AX mAb JBW301 (Supplementary Figure S1A). Next, we analyzed whether the raised mAbs were specific to the phosphorylated form of H2AX. In depth analysis by ELISA showed that, while mAb1H2, mAb3F4 and mAbJBW301 all recognized the phosphorylated H2AX peptide, only mAb3F4 did not cross-react with the nonphosphorylated epitope peptide even at elevated mAb concentrations (i.e., >0.1 μ g/mL) (Figure 1B).

In addition, when full length 1H2 and 3F4 mAbs were introduced by electroporation in the cytoplasm of untreated HeLa cells [21], we observed that 1H2 was translocated into to the nucleus in a piggybacked fashion over time, but mAb3F4 remained in the cytoplasm under these conditions (Supplementary Figure S1B). This demonstrates that mAb1H2 can bind the nonphosphorylated C-terminus of de novo synthesized H2AX with which it gets piggybacked to the nucleus (see also Conic et al. [22]). In contrast, mAb 3F4 was not able to bind to its target in the cytoplasm, as H2AX gets only phosphorylated in the nucleus. Consequently, mAb3F4 was not piggybacked in the nucleus, further demonstrating the exquisite specificity of mAb 3F4 against γ -H2AX. Thus, as the 3F4 antibody turned out to be the most specific antibody recognizing only the phosphorylated form of H2AX in vitro and in cells, it was used in all further experiments.

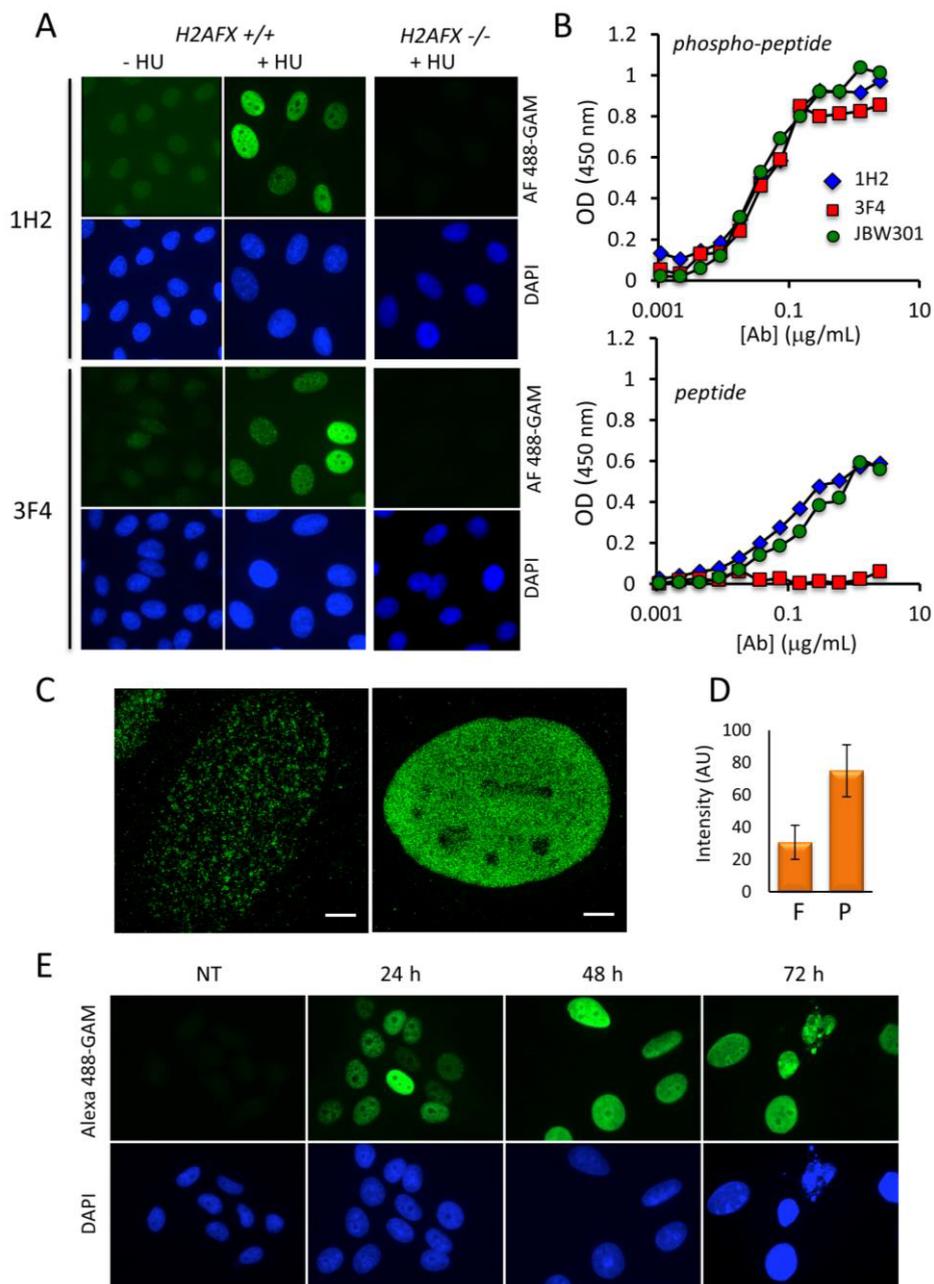


Figure 1. Detection of HU-induced γ -H2AX in HeLa cells with the newly-generated antibodies. (A) After treatment with HU for 24 h, either wild type or H2AFX^{-/-} HeLa cells were subjected to analysis by immunofluorescence with a conventional microscope (Materials and Methods). The binding of mAb 1H2 or mAb 3F4 was revealed with Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse immunoglobulins (green). The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Magnification: 630 \times . (B) Analysis of the binding specificity of mAbs 1H2, 3F4 and JBW301 by ELISA. After incubation in the presence of either the phosphorylated (phospho-peptide) or the nonphosphorylated (peptide) peptides corresponding to the C-terminus of H2AX coated on plate, bound mAbs were revealed with HRP-labeled secondary anti-mouse globulins. The curves summarize the data obtained in 2 independent experiments. The color code is indicated. (C) The HeLa cells stained with mAb 3F4 shown in A were analyzed by 3D-structural illumination super resolution microscopy (3D-SIM). Typical cells with either foci (left) or nuclear-wide γ -H2AX staining (right) are shown. Scale bar: 4 μ m. (D) The average nuclear fluorescence intensity of a minimum of 200 HeLa cells harboring either γ -H2AX foci (F) or pan-nuclear γ -H2AX (P) after staining with mAb 3F4 as in A is represented. (E) HeLa cells were incubated with HU and fixed 24 h, 48 h, and 72 h post-treatment. γ -H2AX levels were analyzed as in (A).

To characterize the precise intranuclear distribution of γ -H2AX we used mAb 3F4 by 3D structural illumination super resolution microscopy (3D-SIM). As described by Natale et al. [23], the foci observed at high resolution correspond to clusters of nanofoci that are present in the majority of the HeLa cells treated with HU for 24 h (Figure 1C). In the pan-nuclear stained nuclei, the nanofoci were almost contiguous suggesting that a very large fraction of the histone H2AX is phosphorylated in the chromatin of these cells. Next, we quantified the intensity of fluorescence of the pan-nuclear stained nuclei versus those displaying only foci (see Figure 1A) and found that γ -H2AX levels in the pan-nuclear cells are increased by a factor of 2 to 3 (Figure 1D). To determine whether this enhancement of H2AX phosphorylation is correlated with the appearance of pan-nuclear stained cells, we performed time course IF experiments and observed that almost all nuclei were intensively stained after a 48 h treatment with HU (Figure 1E and Supplementary Figure S2A). This suggests that pan-nuclear distribution of γ -H2AX corresponds seemingly to saturated levels of H2AX phosphorylation, which are reached when the HeLa cells are continuously incubated with HU. Our FACS analyzes indicated that these cells correspond to S phase-arrested cells (Supplementary Figure S2B), as previously described [20]. Interestingly, the size of the nuclei of the pan-nuclear stained cells was increased when compared to that of untreated cells (Figure 1E). Finally, the number of cells that could be observed at 72 h of incubation with HU was below to that of the seeded cells, suggesting that saturated widespread nuclear γ -H2AX phosphorylation may represent a feature of those cells that will ultimately die. In addition, the increase of γ -H2AX was also detectable by Western blot analysis (Supplementary Figure S2C), indicating that the phosphorylation of H2AX protein accumulates over time upon Chk-1 protein activation by phosphorylation (Supplementary Figure S2C). In conclusion, we have developed a monoclonal antibody (mAb 3F4) that allows the analysis with confidence the dynamic phosphorylation of H2AX that accumulates as widespread γ -H2AX upon sustained RS.

2.2. The Appearance of the Pan-Nuclear γ -H2AX Pattern Is Time and Drug-Dependent

To assess whether the pan-nuclear γ -H2AX pattern can also be observed in other cancer cells upon continuous HU-induced replication stress, we tested the behavior of U2OS (p53-positive) and H1299 (p53-negative) cells, in parallel with nontransformed HFF-1 fibroblasts. As seen in HeLa cells, in both cancer cell types, which were almost completely lacking γ -H2AX staining before the treatment, we observed at the earliest time point (12 h) of HU treatment the appearance of γ -H2AX foci and progressively over time the nuclei of treated cells became pan- γ -H2AX stained (Figure 2A and Supplementary Figure S3A). Interestingly, the pan-nuclear phenotype was clearly detectable at 24 h post-treatment in H1299 cells, whereas only foci were visible in the U2OS cells at this time point. This might be linked to the faster division rate of the H1299 cells. The staining of γ -H2AX in the nontransformed HFF-1 fibroblast cells performed in parallel was much less pronounced and only a few cells became pan γ -H2AX positive at the end of the incubation period, indicating that “normal” cells are much more resistant to HU treatment. The sequential accumulation of γ -H2AX in the nuclei of the different cell types over time was also quantified by fluorescence intensity measurements (Figure 2B) and confirmed by Western blotting (Supplementary Figure S3A). In addition, most of the pan- γ -H2AX stained U2OS and H1299 nuclei were slightly enlarged upon incubation with HU during 48 h. This nuclear enlargement was barely observed with the HFF-1 cells, suggesting that in the tested cancer cells the large number of RS-induced DNA breaks provoke a general chromatin decondensation. Interestingly, a significant part of the H1299 nuclei formed smaller multinucleated pan- γ -H2AX stained structures at the 72 h time point suggesting that these cells may undergo apoptosis following genome-wide chromatin decondensation. To quantify and better characterize the observed phenotypic changes during HU treatment in the cells, we standardized the microscopic assay and converted at each time point the observed major characteristic γ -H2AX patterns into symbols (Figure 3A) to perform statistical analyzes of the recorded nuclei (Figure 3B). This analysis demonstrated that in HeLa cells a 12–24 h HU treatment induces mainly γ -H2AX foci, while 48–72 h HU treatments result mainly in pan-nuclear γ -H2AX patterns, giving rise to fragmented nuclei at the longest treatment (Figure 3B).

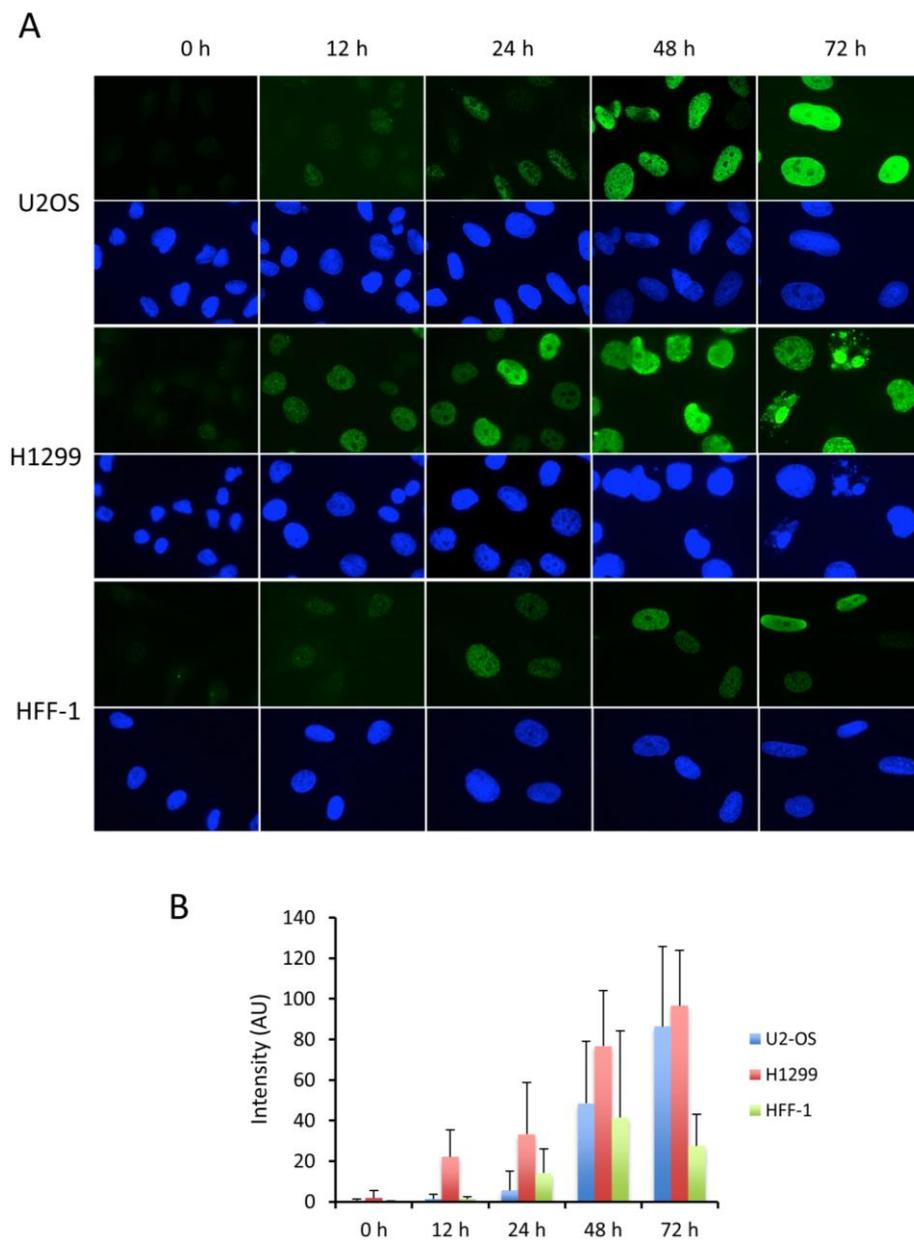


Figure 2. Dynamics of γ -H2AX pattern formation in U2OS, H1299 and HFF-1. The cells shown in (A) were treated with HU as in Figure 1. The accumulation of γ -H2AX overtime was revealed with mAb 3F4 either by immunofluorescence microscopy (A) or by measuring the fluorescence intensity of a minimum of 150 nuclei per condition recorded from three different experiments (B). The pictures shown in (A) correspond to typical fields of the observed cells. Magnification: 630 \times . In (B) are represented the average values of the measured nuclear fluorescence intensities after subtraction of the background mean values recorded at 0 h.

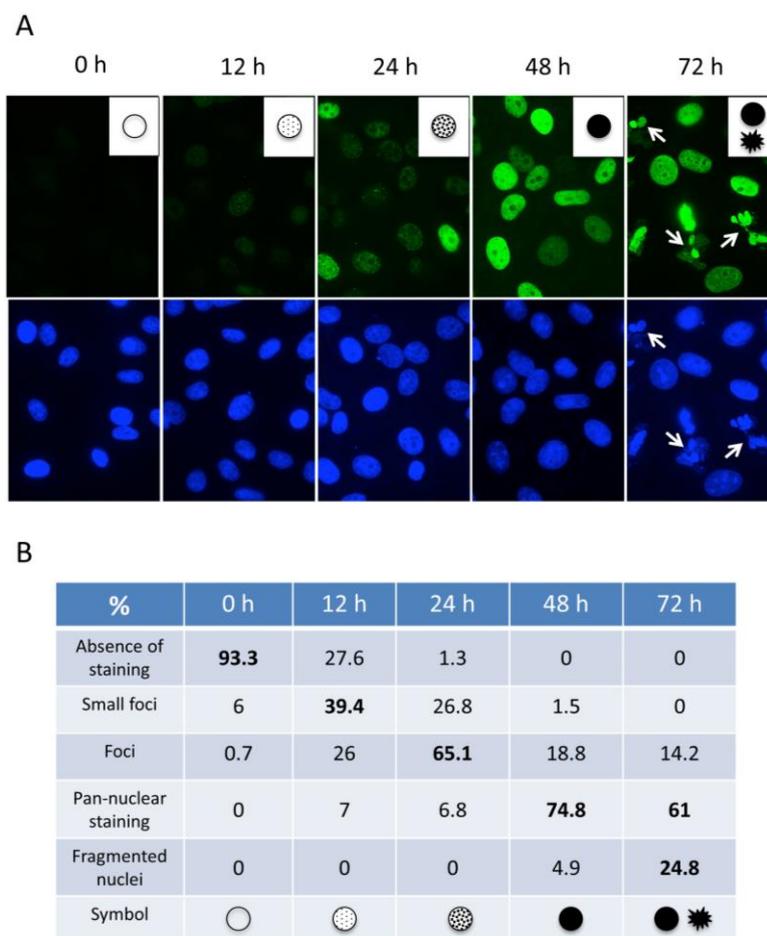


Figure 3. Dynamics of γ -H2AX formation in HeLa cells following treatment with HU. (A) Typical patterns of γ -H2AX staining observed during the analysis with mAb 3F4 by immunofluorescence are shown and represented as symbols (insets). Cells with fragmented nuclei at 72 h post-treatment are indicated (white arrows). Magnification: 630 \times . The assignment of the symbols that correspond to the major characteristic γ -H2AX patterns observed in (A) is shown (B). Up to 160 nuclei recorded from three independent experiments at each time point were analyzed to calculate the percentages.

Next, we asked using this standardized assay whether the saturated widespread pan- γ -H2AX staining obtained after prolonged HU treatment can also be observed with other drugs that induce RS. We analyzed the fate of γ -H2AX upon treatment of U2OS cells with gemcitabine (G), VE-821 (V), and AZD-7762 (A) over a 72 h time period. G targets specifically the RNR (similar to HU), V is a potent inhibitor of the ATR protein and A blocks specifically the Chk1 kinase [24]. Treatment with G alone led to the same result as obtained with HU, i.e., to the appearance of essentially pan-nuclear-stained cells after 48 h of incubation. The use of V alone had almost no effect on H2AX phosphorylation and only of a fraction of the cells incubated with the Chk1 inhibitor (A) was γ -H2AX-positive after the prolonged incubation (Figure 4 and Supplementary Figure S3B). However, when G and V were combined for the treatment, strong staining of γ -H2AX was observed already after 12 h of incubation and the pan-nuclear stained nuclei were easily detectable at the 24 h incubation time (Figure 4A). Remarkably, a fraction of the positive nuclei were fragmented upon 48 h of treatment, as seen with H1229 cells after 72 h HU treatment (Figure 2A). Since it is well known that inhibition of ATR blocks RS-induced DNA damage repair and enhances thereof the RS effect of G [25], our results obtained with G+V suggest that the pan-nuclear staining of γ -H2AX is an indication of excessive RS that cannot be rescued before mitosis and which thus leads to mitotic catastrophe and cell death.

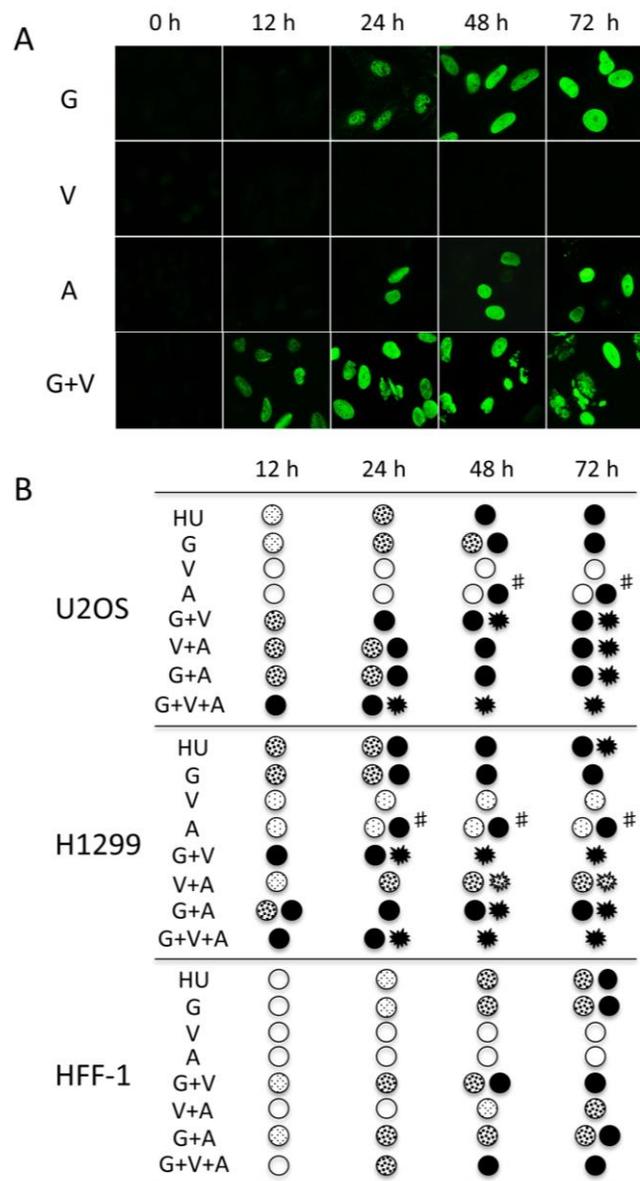


Figure 4. Dynamics of γ -H2AX formation in U2OS, H1299, and HFF-1 cells following treatment with drug combinations. **(A)** Typical patterns of γ -H2AX staining observed during the time point analysis of U2OS cells by immunofluorescence with mAb 3F4 after treatment with either G, V, A, or G+V are shown. The corresponding cells after DAPI staining are shown in Supplementary Figure S3. Magnification: 630 \times . **(B)** U2OS, H1299, and HFF-1 cells were treated with the indicated drugs or drug combinations. At 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-treatment, the nuclei were stained with mAb 3F4 and the γ -H2AX patterns were scored as indicated in the legend of Figure 3. A minimum of 120 cells from three independent experiments were analyzed in each condition. #, only a fraction of the cells within the analyzed population showed the indicated pattern.

Next, we tested the combinations of V and A (V+A [13]), G and A (G+A [26]) and also the three drugs together (G+V+A). As shown in Figure 4B, the treatment with these different combinations triggered nuclear-wide phosphorylation of H2AX after overnight incubation with the cells. The G+V+A was the most potent mixture to reach rapid pan-nuclear accumulation of γ -H2AX. In addition, in this case, only fragmented nuclei with intense γ -H2AX staining remained attached to the culture dish after 48 h of treatment. This suggests the pan-nuclear γ -H2AX phenotype is not a simple signature of RS, but rather a dynamic result of the intensity of the RS that is timely regulated with regard to

the number of different RS-inducing drugs. A similar analysis was also performed with H1299 and HFF-1 cells (Figure 4B). We found that the H1299 cells reacted slightly faster than the U2OS cells to the different drug combinations. For instance, H1299 cells were almost all pan-nuclear positive following the treatment with G+V or G+A following 12 h. However, their treatment with the V+A mixture did not trigger pan-nuclear accumulation of γ -H2AX during the 72 h treatment period. This could be due to the absence of p53 protein expression in this cell line since a similar result was obtained with the HeLa cells that are also p53-deficient (Supplementary Figure S4A). There was a considerable difference in γ -H2AX accumulation between the cancer cells and the nontransformed HFF-1 cells, independently of the drugs or drug combinations used. These results are in good agreement with the observations suggesting that normal cells are less sensitive to RS-inducing drugs than cancer cells [13], likely due to their intrinsic lower levels of endogenous RS.

We also analyzed in U2OS and H1299 cells the effect on γ -H2AX formation of two classical genotoxic drugs, camptothecin (CPT), and epirubicin (EPI), that are daily used in the clinic and which target topoisomerase I and II, respectively. The presence of these drugs in the culture medium led to formation of numerous γ -H2AX foci after 24 h of incubation and upon prolonged treatment, a pan-nuclear staining of γ -H2AX was detected in a large percentage of the treated cells (Supplementary Figure S5). This was particularly evident in H1299 cells similarly to the experiments described above. In conclusion, our results together confirm that the nuclear wide phosphorylation of H2AX is a general mark of intense RS mediated by drugs that inhibit DNA and RNA synthesis.

To test whether human multidrug-resistant promyelocytic HL60R leukemia cells [27] would react to the above tested RS-inducing drugs with a similar pan- γ -H2AX pattern, we used the above-described G, V, and A drugs and their combinations. Although HL60R cells are resistant to daunorubicin or etoposide treatments, two well described drugs that suppress topoisomerase II activity in mammalian cells, they were as sensitive as the H1299 cells to the different mixtures of G, V, and A drugs (Supplementary Figure S4A). However, the fluorescence in the pan-nuclear stained HL60R cells was not as bright as that obtained with the other tested cancer cells, likely due to the fact that their nucleus diameter was increased by a factor of 2–3 after 48 h treatment with G or with all combinations containing G (Supplementary Figure S4B). This particular feature has also been observed in a previous study after intracellular delivery of an anti-PCNA blocking antibody [19]. Overall, our data indicate that the pan-nuclear γ -H2AX phenotype can be observed in a variety of cancer cells following prolonged intense RS induction.

2.3. The Accumulation of the Widespread Pan-Nuclear γ -H2AX Pattern Is a Result of DNA-PK Hyperactivation

It is well established that the C-terminus of H2AX can be phosphorylated by either ATM, ATR or DNA-PK kinases in response to DNA replication fork stalling and/or DNA breakage [9]. The above results show that the inhibition of ATR with the chemical inhibitor V leads to strong nuclear γ -H2AX formation. To examine if either ATM or DNA-PK are activated upon incubation of the cells with G and V, we cotreated U2OS cells for 24 h with the selective chemical inhibitors KU-60019 (K; ATMi) or NU-7441 (N; DNA-PKi), in addition to G or G+V. The distribution and intensity of induced γ -H2AX was monitored under the microscope. Whilst either G or K alone did not trigger any pan-nuclear modification of H2AX as expected, the addition of K to G led to a strong γ -H2AX signal, almost equivalent to that observed with the G+V mixture (Figure 5A). Interestingly however, when G-, G+V-, or G+K-treated cells were coincubated with N, no pan-nuclear γ -H2AX staining was observed and only foci were identified. As N is a DNA-PK inhibitor, these results strongly suggest that DNA-PK is responsible for the spreading of the H2AX phosphorylation over the whole nucleus in the absence of N (Figure 5A, compare -N and +N panels). This result was confirmed by Western blotting (Figure 5B) and by measuring the nuclear fluorescence intensities (Supplementary Figure S6A) after cotreatment of U2OS cells with HU and the different kinase inhibitors mentioned above. Thus, pan-nuclear γ -H2AX observed after intense RS results clearly from DNA-PK activation, as proposed also by Meyer et al. [17].

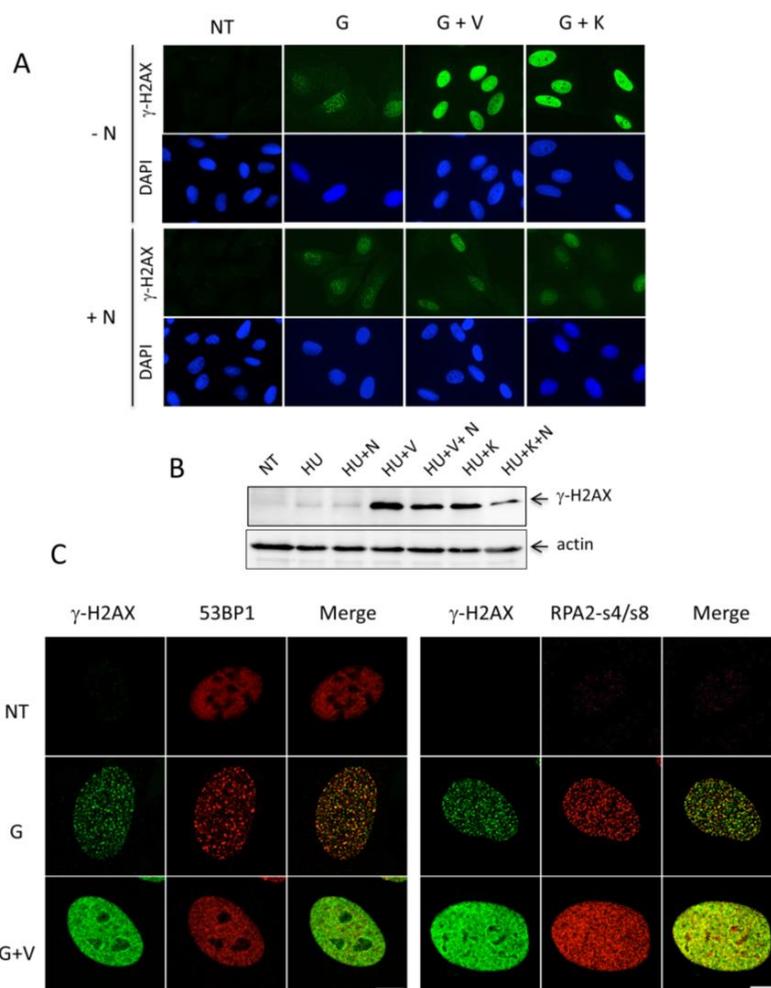


Figure 5. Involvement of DNA-PK in γ -H2AX formation and analysis of 53BP1 and phospho-RPA S4/S8 levels upon induced replication stress. (A) U2OS were treated with G, G+V, or G+K in the presence (+) or the absence (–) of the DNA-PK inhibitor N. 24 h post-treatment, the cells were fixed and analyzed for γ -H2AX formation as described in the legend of Figure 2. The micrographs show typical fields of cells observed by immunofluorescence from three independent experiments. Magnification: 630 \times . NT, nontreated. (B) Analysis of the γ -H2AX levels by Western blotting. After treatment of U2OS cells with the indicated drugs during 24 h, crude cell extracts (30 μ g) were subjected to Western blot analysis. The γ -H2AX polypeptides were revealed with mAb 3F4. β -actin was used as a loading control. NT, nontreated. (C) Analysis of 53BP1 and phospho-RPA S4/S8 levels by confocal immunofluorescence. U2OS cells treated with G or G+V for 24 h were incubated after fixation with anti-53BP1 or anti phospho-RPA (RPA2-s4/s8) polyclonal antibodies (Materials and Methods). The cells were costained with mAb 3F4. Bound antibodies were revealed with fluorescent secondary anti-mouse (green) or anti-rabbit (red) globulins. The pictures show representative nuclei recorded from 120 individual cells observed under the confocal microscope. Scale bar: 10 μ m. NT, nontreated.

Since DNA-PK enables mainly nonhomologous end-joining (NHEJ) repair following DNA double strand breakage (DSBs), we investigated whether the 53BP1 protein, which is actively involved in the DSB repair process [28], would colocalize with the widespread nuclear γ -H2AX pattern under G or G+V treatments. Figure 5C shows typical cells stained with an anti-53BP1 antibody after analysis by confocal microscopy following treatment for 24 h with either G or G+V. The 53BP1 protein, which is present in the whole nucleus of the untreated cells, is detected as bright foci structures after G treatment. Upon G+V treatment, a wealth of smaller 53BP1 foci that are less bright and almost contiguous were observed, in parallel with pan-nuclear γ -H2AX formation. However, the analysis of

the overlays using the Pearson's correlation coefficient [29] shows that ~60% of the γ -H2AX and 53BP1 molecules colocalize under these conditions (Figure 5C, left panel). We also analyzed the distribution of phosphorylated RPA32 Ser4/Ser8, another recently described target of DNA-PK in response to fork stalling [30]. Whereas almost no phosphorylated RPA32 was detected in the nontreated cells, bright individual and nuclear-wide foci were apparent upon G or G+V treatments at 24 h, respectively (Figure 5C, right panel). As observed with 53BP1, the signals of phospho-RPA32 and γ -H2AX did clearly overlap (up to 70% of calculated colocalization), suggesting that pan-nuclear γ -H2AX colocalize with phosphorylated RPA32 Ser4/Ser8 at the stalled forks.

To determine whether these phosphorylation events were accompanied with extensive DNA breakage, we extracted the genomic DNA of G- or G+V-treated cells and performed agarose gel analysis. The DNA extracted from the cells at 24 h post-treatment (incubation time of the cells analyzed by confocal microscopy) migrated at a single band (Supplementary Figure S6B). However, a faint smear was detectable with the G+V sample after 48 h of incubation and numerous cuts were visible at 72 h post-treatment. These results were confirmed by single cell gel electrophoresis experiments and Comet assays (Supplementary Figure S6C). Together, these data suggest that the formation of pan-nuclear γ -H2AX pattern is not a marker of DSBs, but very likely a signature of intense RS with stalled forks that activate the DNA-PK kinase.

2.4. Pan-Nuclear γ -H2AX Staining Is Correlated with the Loss of Cell Viability

The drugs used in this study are toxic for the cells and are used in the clinic for promoting cancer cell death. Numerous studies have shown that the formation of hundreds of γ -H2AX foci could be an indication of RS-induced cell lethality [6], but it remains unclear if pan-nuclear γ -H2AX is directly associated with this loss of cell viability. By counting the U2OS cells remaining alive in the containers after treatment with either G, G+V or G+V+A and by analyzing in parallel the pattern of γ -H2AX, we found that the increased proportion of pan-nuclear stained cells over time (as already shown in Figures 2 and 4) was accompanied with a significant drop of the number of cells remaining attached to the culture dish. This was particularly the case when testing the drug combinations that promote pan-nuclear accumulation of γ -H2AX after 48 h of incubation (Figure 6A). The same effect was observed with the H1299 cells after a similar treatment (Supplementary Figure S7A). Because pan-nuclear γ -H2AX pattern was hardly detectable in HFF-1 cells even after incubation with G+V for 72 h, and as the number of cells remained constant over time, we concluded that cancer cells might acquire a pan-nuclear γ -H2AX accumulation phenotype before cell death. Thus, pan-nuclear γ -H2AX staining could be an indication of cell death initiation.

To test this hypothesis, we performed pulse drug administration experiments and analyzed if a short incubation of the cells with drugs that promote pan-nuclear γ -H2AX staining would be sufficient to kill them. We incubated U2OS cells with either HU or HU+V for 24 h (that lead to foci or pan-nuclear γ -H2AX, respectively) and recorded the γ -H2AX pattern as well as the cell number after drug withdrawal for three days (Figure 6B). The cells treated with HU alone did not show any γ -H2AX staining after the third day of HU release. In addition, the number of cells in the wells was higher at 72 h after drug withdrawal than that calculated at the time of drug withdrawal (Figure 6C), indicating that the cells can recover from focal γ -H2AX formation. In contrast, upon incubation with HU+V for 24 h and subsequent incubation without drug for 72 h, almost all cells that remained alive the third day after drug withdrawal were pan-nuclear γ -H2AX positive and their number was far lower than the initial number of the treated cells. The fact that H2AX phosphorylation can be resolved after mild RS (foci formation) and not be modified following intense RS (pan-nuclear distribution) was confirmed by Western blot analysis (Supplementary Figure S7B). These results together suggest that the widespread pan-nuclear accumulation of γ -H2AX corresponds to a point of no return for the U2OS cells to a normal state, and that cell viability is compromised when the pan-nuclear γ -H2AX pattern is detectable. Loss of cell viability was observed after pulse treatment of both U2OS and H1299 cells with the G+V, V+A, and G+A combinations that promote pan-nuclear γ -H2AX formation (Figure 6D).

Together, these results indicate that detection of pan-nuclear γ -H2AX might be a convenient read-out of the efficacy of RS-inducing drugs to trigger cell death.

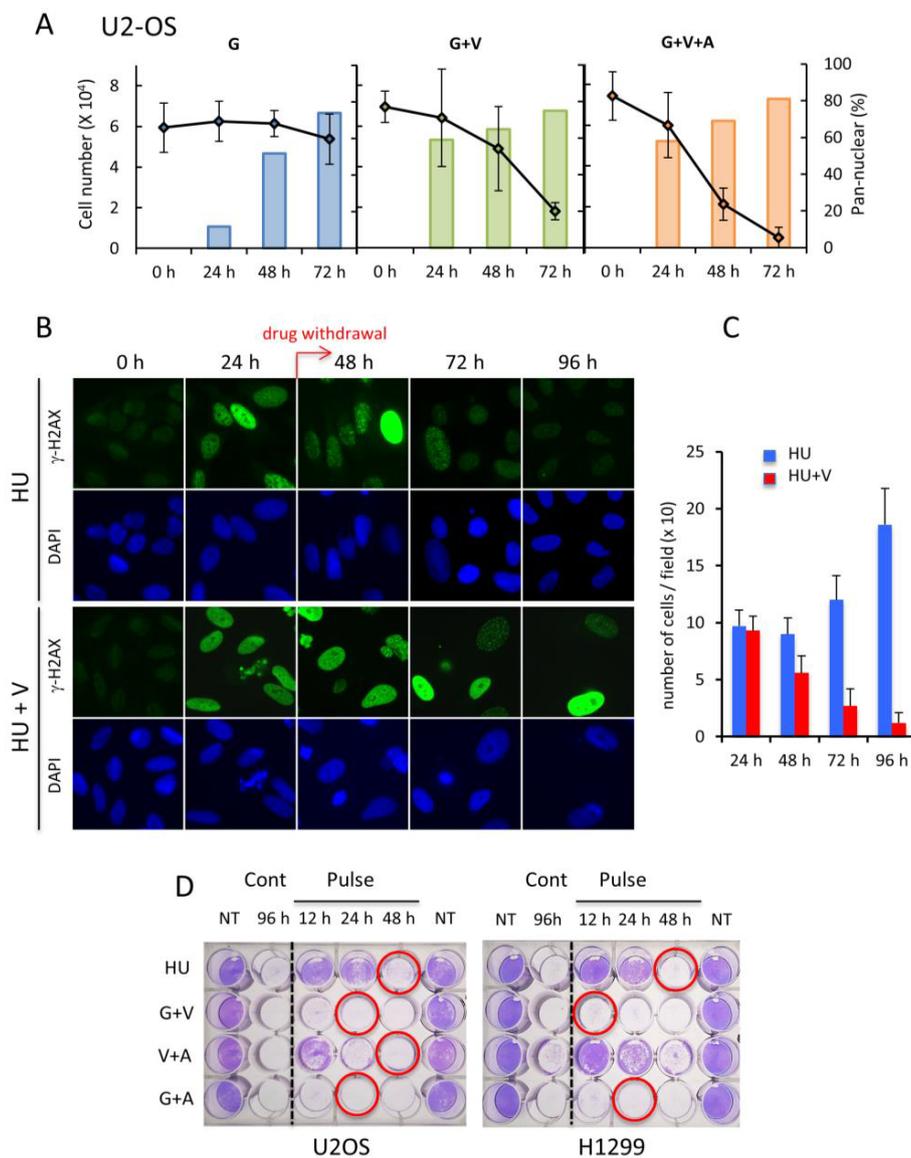


Figure 6. Cell death induction upon formation of widespread pan-nuclear γ -H2AX. (A) Time course analysis of the percentage of pan-nuclear γ -H2AX-stained U2OS cells after treatment with G, G+V, or G+V+A. The graphs correspond to the number of cells that were bound to the support in parallel experiments. A minimum of 150 cells were analyzed in each case. (B) U2OS cells were incubated with either HU or HU+V. Twenty-four hours post-treatment, the drugs were removed by replacing the culture medium with fresh medium (pulse treatment). The pictures show the γ -H2AX levels of representative nuclei monitored by immunofluorescence before (0 h) or after the treatment (24 h) or after 1 (48 h), 2 (72 h), or 3 (96 h) days of drug withdrawal. Magnification: 630 \times . The calculated number of cells remaining attached to the coverslips under these conditions is represented in (C). (D) Viability assays of pulse-treated U2OS or H1299 cells. Equal numbers of seeded cells were either continuously (Cont) or pulse- (Pulse) treated with the indicated drug mixtures. 96 h post-incubation, the cells were fixed and stained with crystal violet (Materials and Methods). The red circles correspond to the time of treatment which triggers in each condition mainly widespread pan-nuclear γ -H2AX staining as shown in Figure 4. NT, nontreated.

Because the saturated pan-nuclear γ -H2AX pattern in heavily RS-injured cells seems to be paralleled with initiation of cell death, we tested whether the accumulation of this phosphorylation is required for the death processing. By comparing the survival rate of the *H2AFX*^{-/-} HeLa cells to that of the wild type HeLa cells after pulse treatment with different drug combinations, we could not see any differences in cytotoxic effect, nor in survival rate (Supplementary Figure S8A). Similar results were obtained when comparable experiments were done with wild type and *H2AFX*^{-/-} HEK293 cells. Moreover, as shown in Supplementary Figure S8B, the number of killed U2OS and H1299 cells did not vary when the treatments were performed in the absence or presence of the DNA-PK inhibitor N (that inhibits the formation of pan-nuclear γ -H2AX; Figure 5A). All together these data indicate that pan-nuclear γ -H2AX formation is not prerequisite for drug-induced cell death, but it may rather correspond to a feature of stressed cells in which DNA repair is overwhelmed and that are subsequently undergoing death [31].

2.5. Pan-Nuclear γ -H2AX Pattern Is a Signature of Induced Cell Death and Thus of Lethal Replication Stress

To demonstrate that the cells with a saturated pan-nuclear γ -H2AX phenotype do not survive, we took advantage of the possibility to deliver labeled antibodies or Fab fragments into living cells [22,32] to follow the fate of those cells with pan-nuclear accumulation of γ -H2AX. Fabs correspond to the antibody arms that encompass the antibody binding capacity. They are obtained by cleavage of the antibody hinge region with papain protease (Materials and Methods). Experiments performed with unlabeled 3F4 Fab fragments, which do not bind to the nonphosphorylated C-terminal H2AX peptide as probed by ELISA (Supplementary Figure S9), showed that they accumulate in the nucleus of U2OS cells upon treatment with HU for 48 h (Figure 7A). We obtained the same results when Alexa Fluor 488-labeled Fabs were used to transduce U2OS cells sensitized with G+V for at least 24 h (Figure 7B). Notably, under these conditions, the fluorescently labeled Fabs were homogeneously distributed in the nuclei as observed above by classical immunofluorescence. We have taken this condition of treatment to follow the fate of individual transduced cells by time-lapse microscopy over a period of 7 h after a treatment with G+V for 34 h. Expectedly, this treatment triggered the formation of pan-nuclear γ -H2AX in most of the cells as visualized with the localization of the labeled Fabs that were present in the nuclei at the beginning of the time-lapse analysis (Figure 7C). Within the population of flat cells that were bound to the culture dish, fragmented nuclei were visible (Figure 7C, lower panel). During the prolonged incubation, about half of the pan-nuclear γ -H2AX-positive cells rounded up and some of them detached from the support during the bright field microscopy analysis (Video S2). This phenomenon corresponds to cell death and is generally observed when cells undergo apoptosis. In contrast, when the G+V treatment was omitted, the fluorescent Fabs were detected both in the nucleus and in the cytoplasm (no re-localization due to the absence of γ -H2AX formation) and they continued to divide (Figure 7C, upper panel and Video S1). Together, these results confirm that the transduced 3F4 Fabs are not cytotoxic by themselves and that they are bound to nuclear-wide γ -H2AX formed in cells that will die. Hence, the widespread nuclear phosphorylation of H2AX is an indication of lethal RS.

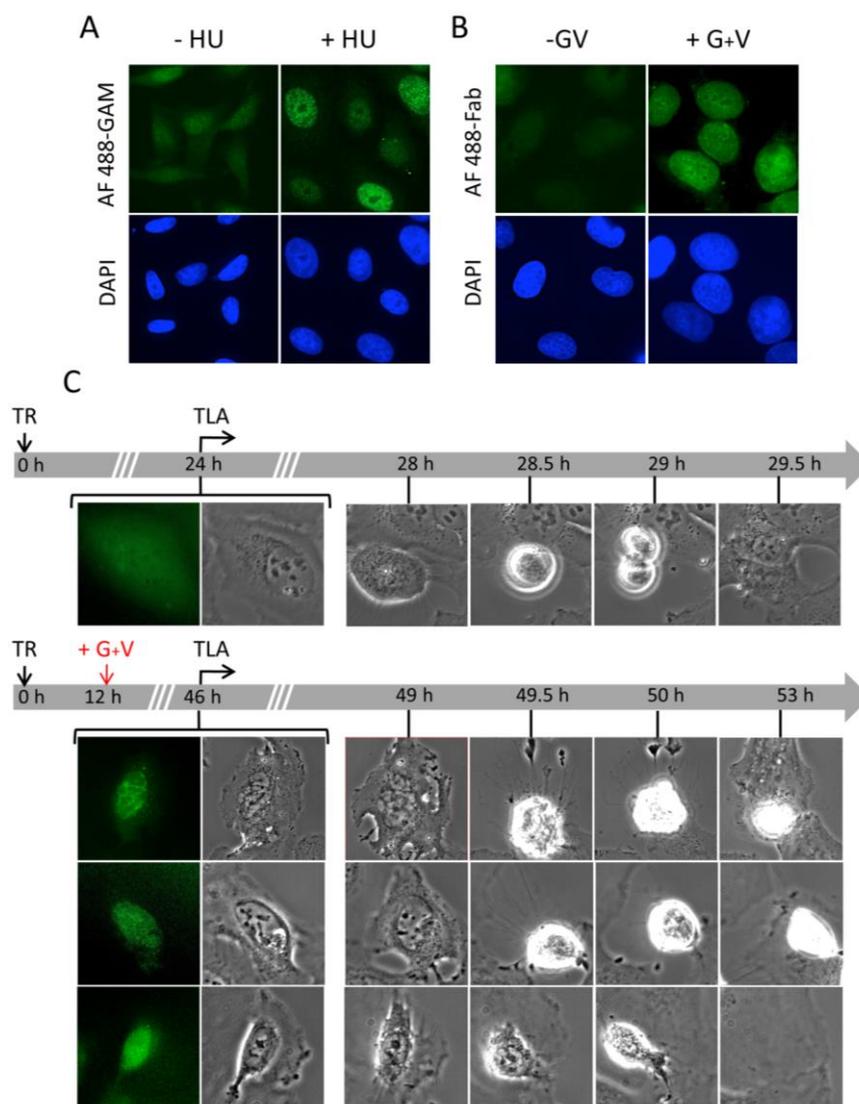


Figure 7. Time-lapse monitoring of γ -H2AX formation in U2OS cells transduced with 3F4 Fabs. Nonlabeled (A) or Alexa Fluor 488-labeled (B) 3F4 Fabs were delivered by electroporation to U2OS cells. 24 h post-transduction, the cells were treated with either HU (A) or G+V (B). After 48 h of HU treatment for 48 h or G+V treatment for 24 h, the cells were fixed and analyzed by immunofluorescence microscopy. The pictures show typical fields of the transduced cells observed under the microscope. The non-labeled Fabs were revealed with Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse immunoglobulin (AF 488-GAM) and the Alexa Fluor 488-labeled Fabs (AF 488-Fab) were visualized without an additional processing. The nuclei were counterstained with DAPI. (C) Analysis of the cell fate by time-lapse microscopy following transduction. After transduction (TR), the U2OS cells were either nontreated (upper panel) or treated with G+V (lower panel) as indicated and subjected to time-lapse monitoring. Phase-contrast images of several fields were taken every 30 min during approximately 8 h. The micrographs show representative individual cells of a minimum of 50 cells from three independent experiments recorded by fluorescence and phase-contrast at the beginning of the time-lapse analysis (TLA) and, subsequently, by phase-contrast. Numerous cell division events within the population of the nontreated transduced cells were visible at approximately 30 h post-transduction (upper panel). In the presence of G+V, the cells did not divide and some rounded up and became floating after approximately 50 h of incubation (lower panel). Magnification: 400 \times .

3. Discussion

This study became possible because we have generated our own mAb, which allowed the specific detection and tracking of the phosphorylation of H2AX. When analyzing the γ -H2AX recognition specificity of the monoclonal antibodies produced by our growing hybridomas, we found that only a few of them were truly γ -H2AX phosphopeptide-specific. Moreover, we have carried out a test that has never been reported before for analyzing the cross-reactivity of full-length antibodies recognizing nuclear phospho-epitopes under physiological conditions (Supplementary Figure S1B). Note that full-length mAbs (150 kDa) enter the nucleus only if they are bound to their neosynthesized targets in the cytoplasm and are piggybacked to the nucleus with their targets [21,22]. The fact that after electroporation full-length mAb 3F4 remained in the cytoplasm, where H2AX is neosynthesized, but is not phosphorylated, clearly indicated that mAb 3F4 did not recognize the nonphosphorylated C-terminus of H2AX. If mAb 3F4 would have recognized the nonphosphorylated H2AX, it would have been piggybacked with de novo synthesized H2AX into the nucleus, but this was not the case (Supplementary Figure S1). This clearly indicates that the variation of γ -H2AX levels detected with 3F4 mAb by IF throughout the study are due to DNA damage. It is conceivable also that commercially available anti- γ -H2AX reagents do cross-react to some extent with nonphosphorylated H2AX [33]. The above described electroporation test could thus be used in the future to which extent these commercial antibodies cross-react with the H2AX. In addition, the observation that electroporated 3F4 Fab (50 kDa), which can freely diffuse to the nucleus, was exclusively relocalized in the nucleus upon drug treatment, indicating that this antibody is a unique tool for monitoring in a high-throughput manner the exquisite kinetics of γ -H2AX in either live or fixed cells exposed to DNA-damaging agents [34,35]. Interestingly, we never observed any effect of the delivered high amount of Fabs on γ -H2AX formation/spreading soon after drug application, nor a delay of formation of γ -H2AX in the transduced cells when compared to nontransduced cells, suggesting that the antibody bound phosphorylated forms of H2AX do not perturb the subsequent recruitment and accumulation of RSR and DNA repair proteins.

Using our newly developed tools, we have investigated the intranuclear kinetics of γ -H2AX accumulation and its relevance for human cell viability. It is widely accepted that γ -H2AX causes an alteration in chromatin structure that facilitates DNA repair upon genotoxic insults. Although several kinases seem to be implicated in H2AX phosphorylation, numerous studies have shown that ATM is mainly responsible for this process and this allows the precise orchestration of the recruitment of many components of the repair machinery to DSBs. Nevertheless, the accumulation of γ -H2AX over megabase domains at the DSB sites is not fully understood, but can microscopically be visualized as discrete foci [36]. This H2AX phosphorylation process is thus considered as a central player in DDR and RSR [37]. Recently, it has been shown that the foci recorded under these conditions correspond to clusters of nanofoci that were suggested to surround the DSB sites [23]. In contrast, less clear is the formation of widespread nuclear γ -H2AX patterns when the cells are continuously challenged with genotoxins and RSR inhibitors. Ewald et al. [25] proposed that the intense pan-nuclear location of γ -H2AX observed after checkpoint abrogation may signal the altered DNA structures throughout the nucleus. More recently, it was suggested that pan-nuclear formation of the γ -H2AX pattern is elicited by diffusion of active kinases from DSBs [17]. In agreement, we have found that DNA-PK, which is involved in NHEJ repair, can mediate the widespread homogenous H2AX phosphorylation. Since no extensive DNA breakage could be evidenced when this event occurs (Supplementary Figure S6), it begs the question of how can the activity of DNA-PK be triggered homogeneously in the nucleus at large distances from the sites of DNA damage. Moreover, we have also observed that pan-nuclear staining of γ -H2AX is accompanied by extensive hyperphosphorylation of RPA located at the ss-DNA structures generated at the stalled forks (Figure 5) [38]. Several reports have found that RPA hyperphosphorylation is mediated by DNA-PK that, in turn, may either facilitate DNA repair [39] or promote the cellular commitment to apoptosis [40,41]. It is conceivable that H2AX in the proximity of stalled forks becomes incidentally phosphorylated together with RPA by

activated DNA-PK, in addition to γ -H2AX foci located in proximity of DSBs. Pan-nuclear H2AX could thus be an indicator of global halted replication and fork collapse in the nucleus. As global fork collapse cannot be rectified, it would activate cell death. Notably, we systematically observed that, soon after treatment with replication inhibitors (and not with RSR inhibitors such as V or A), the nuclei of the treated cells were enlarged suggesting that the accumulation of halted forks could modify the chromatin structure. This was particularly visible with the nonadherent HL60R cell line (Supplementary Figure S4B). In a previous work we have observed a similar nuclear swelling and rise of pan- γ -H2AX pattern in cancer cells transduced with anti-PCNA or anti-DNA polymerase alpha inhibitory Fabs [19]. It is conceivable that the chromatin relaxation that is likely mediated by the action of numerous activated histone-modifying enzymes [42] and/or which reflects excessive DNA replication origin firing [13], would allow preferential access of DNA-PK to H2AX-containing nucleosomes. DNA-PK has been qualified as being hyperactivated under such conditions of RS [16]. Moreover, the fact that the different drugs used in this study induced similar effects in both wild type and *H2AFX*^{-/-} HeLa cells suggests that pan-nuclear γ -H2AX is not required for the response to intense RS generated by global DNA replication arrest [43] and the consequent death of HeLa cells.

It is well known that, when replication is blocked, several cellular checkpoints are activated to provide time for the cell to repair the damage. Interestingly, we found that formation of pan-nuclear γ -H2AX formation was correlated with the strength of the RS-triggering effects of the different drug combinations used. Our observations are in good agreement with previous findings showing that abrogation of Chk1 kinase sensitizes the cells treated with G and causes a significant increase in H2AX phosphorylation and toxicity [25,44,45]. The same effect was also observed when targeting both ATR and Chk1 kinases [13]. We found that the combined treatment of drugs that inhibit replication, ATR and Chk1 at the same time was the most deleterious treatment, but it remains unclear which exact mechanisms govern the decision to die upon such synergistic genotoxic insults. In this context, the latest cellular events preceding cell death are generally termed replication catastrophe [8], mitotic catastrophe [46], or even mitotic disaster [47], when the nuclei appear to be fragmented under the microscope before cell death. Such aberrant mitotic cells, which mirror abrogation of the G2 DNA damage checkpoint, were also observed during our γ -H2AX analyzes (Figures 2, 3 and 6). The disrupted nuclei in such cases were highly γ -H2AX-positive, meaning that they contained pan-nuclear γ -H2AX before being committed to death [47]. Under such lethal RS conditions, it would be of interest to analyze how cell lines containing p53 protein (such as U2OS) would manage the balance between delayed survival and death [2,48]. Overall, it is clear from this study that the stressed cells cannot recover when pan-nuclear γ -H2AX is formed and that, at this state, irreversible cell death is initiated. This is supported by the proposal that in fibroblast cell lines UV-induced pan-nuclear γ -H2AX is a preapoptotic signaling event [49]. Whether high levels of pan-nuclear γ -H2AX are generated in patients [50] or in human tumor samples [1] following administration of cytotoxic doses of chemotherapeutics remains to be established. Thus, similarly to hyperphosphorylated RPA, which is now considered as a marker of ssDNA at the stalled forks [38], we propose that pan-nuclear γ -H2AX represents a surrogate marker of RS-induced cell death.

4. Materials and Methods

4.1. Antibodies

The anti- γ -H2AX monoclonal antibodies were generated as described [19]. Briefly, BALB/c mice were immunized with the synthetic phosphorylated peptide CKATQA(p)SQEY corresponding to the C-terminus of H2AX after covalent cross-linking to ovalbumin. The hybridomas were screened by testing the culture supernatants by ELISA with both immunizing and nonphosphorylated peptides on plate and by cell staining using fixed HeLa cells treated with HU. The selected monoclonal antibodies were purified from hybridoma supernatant on Protein G Sepharose (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) and kept at 4 °C in PBS at a concentration above 5 mg/mL. The Fab

fragments of clone 3F4 were obtained by digesting pure antibody samples with papain (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) as described [51], followed by size-exclusion chromatography on Superdex S200 10/300 (GE Healthcare). They were subsequently concentrated with centrifugal filtration units (Merck Millipore, Molsheim, France) to obtain Fab samples of approximately 5 mg/mL. Labeling of the Fab was performed by incubating purified Fab fragments (2.5 mg/mL) with Alexa FluorTM 488 succinimidyl ester (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a ratio 1:4 during 1 h at room temperature. Unreacted fluorophore molecules were removed using a desalting spin column (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). The labeled Fab molecules in the flow-through fraction were frozen down in the presence of 10% glycerol and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use in the transduction experiments. Anti-phospho-H2AX monoclonal antibody JBW301 was obtained from Merck-Millipore. Anti-53BP1 and anti-actin rabbit polyclonal antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. The anti-phospho-RPA (S4/S8) rabbit polyclonal antibody was obtained from Bethyl Laboratories (Montgomery, OH, USA). The phospho-Chk1 polypeptide was detected with rabbit monoclonal antibody 133D3 (Cell Signaling Technology, St-Quentin-en-Yvelines, France).

4.2. Cell Culture and Assays

The HeLa, U2OS, H1299, and HFF-1 cells (laboratory stocks) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Tissue Culture Medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a humidified 5% CO_2 atmosphere. The HL60R [27] cells were grown in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640; Life Technologies) under similar conditions. Both media were supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 10% heat-inactivated fetal calf serum. Fresh cells were thawed from frozen stocks after 10 passages. Transduction experiments with purified antibodies or Fab by electroporation were performed as previously described [21,32]. Where indicated, the cells were treated with hydroxyurea (HU; 2 mM), gemcitabine (G; 0.1 μM), VE-821 (V; 1 μM), or AZD-7762 (A; 0.1 μM), or combinations of these drugs at the same concentration. For some experiments, we added either KU-60019 (K; 10 μM) or NU-7441 (N; 5 μM) to the drug mixture. Alternatively, the cells were treated with epirubicin (0.5 μM) or camptothecin (1 μM). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich. The number of cells remaining attached to the dish after drug treatment was determined by manual counting after dissociation with trypsin and staining with Trypan blue or by spectrometry with the PrestoBlueTM cell viability kit (Life Technologies) according to manufacturer's protocol. Before staining with 0.1% crystal violet the treated cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Where indicated, the harvested cells were also subjected to genomic DNA extraction. Typically, 10^5 cells in 200 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS, and proteinase K (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA) were incubated for 5 h at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ and, after addition of DNase-free RNaseA (Sigma-Aldrich; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the samples were treated twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). Extracted DNA was concentrated with ethanol and analyzed by agarose gel (0.8%) electrophoresis. Single cell gel electrophoresis assays were performed with the CometAssayTM kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) according to manufacturer's protocol.

4.3. Generation of the H2AFX^{-/-} Cell Lines

The plasmid pCas9-2A-Puro (Addgene, Cambridge, MA, USA) was digested with BpiI restriction enzyme to insert the annealed oligonucleotides 5'-CACCGCGGCCCTCTTAGTACTCC-3' and 5'-AAACGGAGTACTAAGAGGGCCCGC-3'. The resulting construct was transfected in HeLa cells using jetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France). The transfected cells submitted to a puromycin (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) selection for 3 days [52] and further allowed to grow for 2 weeks in the absence of the antibiotic. Single cell clones were isolated and cells of several clones were analyzed by Western blotting using the monoclonal antibodies described in this study to confirm the absence of H2AX expression. The detailed analysis of these cell lines will be published elsewhere.

4.4. Western Blot and ELISA

For the analysis of the U2OS proteins, soluble extracts (60 µg/lane) in RIPA buffer were used. γ -H2AX and actin were revealed with monoclonal antibody 3F4 (0.2 µg/mL) and rabbit polyclonal serum A2066 (Sigma-Aldrich), respectively. Bound secondary HRP-labeled antibodies were revealed with ECL reagent (GE Healthcare) and analyzed with the Image QuantLAS 4000 imager (GE Healthcare). For the ELISA assays, microtiter wells (Thermo Fisher Scientific) were coated with 2 µg/mL of phosphorylated or nonphosphorylated peptide CKATQASQEY in PBS overnight at 4 °C. The tested monoclonal antibodies or Fab fragments were diluted in PBS containing 0.1% NP40 and following incubation at RT for 1 h they were revealed with sheep HRP conjugated anti-mouse IgG (GE Healthcare). After several washes with PBS containing 0.1% NP40 and addition of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich), the optical density was measured at 450 nm in an ELISA reader.

4.5. Immunofluorescence Microscopy

For the analysis by classical immunofluorescence microscopy, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and, after permeabilization with 0.2% Triton X 100 for 5 min, they were incubated with different antibodies diluted in PBS containing 10% fetal calf serum. The primary antibodies were detected with Alexa Fluor 488 or 568 labeled-anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Life Technologies). After incubation, the coverslips were mounted with 4',6'-diamino-2-phenyl-indole (DAPI) Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and imaged with a Leica DM5500 microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with 63× and 100× objectives. The signal was recorded on an EM-CCD camera (Hamamatsu, Massy, France). Live-cell time-lapse experiments were performed with a Leica DMIRE 2 microscope equipped with a control system of 37 °C, 5% CO₂ (Life Imaging Services, Basel, Switzerland), a 40× HXC PLAPO PH3 (1.25 NA) objective. Images were acquired with a Photometrics Prime sCMOS camera piloted by the Metamorph software allowing phase-contrast imaging. Fluorescence images were recorded by using a Xenon-lamp and Leica L5 filter cube. Confocal microscopy and three-dimensional structured illumination microscopy (3D SIM) were performed as previously described [32]. All microscopy images were processed using the Fiji/Image J software [53]. For the calculation of the proportion of pan-nuclear cells, the images of ten microscopy fields acquired with the 40× objective were used. For the measurement of the nuclear fluorescence intensity, the nuclei were set with the DAPI channel acquisition as regions of interest (ROI) and the mean fluorescence intensity in each ROI was measured using the Fiji built-in tool. The mean values and the Pearson's standard deviations were calculated with the Excel software (Microsoft, Issy-les-Moulineaux, France).

5. Conclusions

This study shows that H2AX is increasingly phosphorylated upon sustained treatment with combined drugs that provoke RS and that the levels of γ -H2AX culminate and become easily visible in the whole nucleus before cell death. Moreover, our results show in HeLa cells that H2AX is not required for RS-induced cell death, but can be considered as a consequence of the strength of the RS-induced cell death. In agreement with Parsels et al. [15], our study demonstrates that using a highly specific anti- γ -H2AX mAb allows the detection of the widespread, pan-nuclear γ -H2AX pattern that is proportional to RS-induced cell death. As the pan-nuclear γ -H2AX pattern is easily distinguishable from the focal γ -H2AX pattern, the pan-nuclear γ -H2AX pattern will be extremely useful to determine the efficacy of chemotherapeutic drug combinations to kill tumor cells in translational studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/355/s1>, Figure S1: Binding properties of the anti- γ -H2AX monoclonal antibodies used in this study, Figure S2: Detection of γ -H2AX upon prolonged incubation of HeLa cells with HU, Figure S3: Dynamics of γ -H2AX levels in U2OS and H1299 cells, Figure S4: Dynamics of γ -H2AX formation in HeLa and HL60R cells, Figure S5: Detection of γ -H2AX after treatment with epirubicin and camptothecin, Figure S6: Detection of γ -H2AX following cotreatment

with the DNA-PK inhibitor and analysis of the genomic DNA integrity, Figure S7: Cell death induction upon irreversible formation of widespread nuclear γ -H2AX, Figure S8: Importance of pan-nuclear γ -H2AX formation for cell death, Figure S9: Binding specificity of the 1H2 and 3F4 Fabs as probed by ELISA, Video S1: Time-lapse monitoring of transduced U2OS cells. 24 h post-transduction with Alexa Fluor 488-labeled 3F4 Fabs, the cells were subjected to phase-contrast microscopy and images were taken every 30 min for 8 h. Magnification: 400 \times , Video S2: Time-lapse monitoring of transduced U2OS cells after treatment with G+V. The cells were processed as indicated in the legend of Video S1, except that G+V drugs were added in the medium at 12 h post-transduction. Time-lapse analysis was started at 46 h post-transduction and carried out as indicated in the legend of Video S1, Magnification: 400 \times .

Author Contributions: E.W., D.D., and L.T. conceived the study; E.M., D.D., A.S., S.C., and E.W. performed most of the experiments; M.O.-A. generated the hybridomas; M.V. and M.C. generated and analyzed the KO-cell lines; S.C. and P.D. performed the high-resolution and time-lapse microscopy experiments; E.W. and L.T. wrote the manuscript. All authors discussed results and approved the manuscript.

Funding: This study was supported by the CNRS, the INSERM, the University of Strasbourg, the Ligue Régionale contre le Cancer (Comité CCIRGE-BFC) (to E.W.), the European Research Council (ERC) Advanced grant (ERC-2013-340551, Birtoaction) (to L.T.), and Eucor-The European Campus (to E.W.). E.M. was founded by a MENESR fellowship.

Acknowledgments: We are grateful to A. Loynton-Ferrand (Imaging Core Facility, Biozentrum, University of Basel) for help with the 3D-SIM super-resolution experiments and to J.C. Amé for the Comet data analysis and to G. Zuber for interesting discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Redon, C.E.; Weyemi, U.; Parekh, P.R.; Huang, D.; Burrell, A.S.; Bonner, W.M. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819*, 743–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Roos, W.P.; Thomas, A.D.; Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 20–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Blackford, A.N.; Jackson, S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 801–817. [[CrossRef](#)]
4. Ward, I.M.; Chen, J. Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47759–47762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Savic, V.; Yin, B.; Maas, N.L.; Bredemeyer, A.L.; Carpenter, A.C.; Helmink, B.A.; Yang-Iott, K.S.; Sleckman, B.P.; Bassing, C.H. Formation of Dynamic γ -H2AX Domains along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by ATM and MDC1 and Dependent upon H2AX Densities in Chromatin. *Mol. Cell* **2009**, *34*, 298–310. [[CrossRef](#)]
6. Nikolova, T.; Dvorak, M.; Jung, F.; Adam, I.; Krämer, E.; Gerhold-Ay, A.; Kaina, B. The γ H2AX Assay for Genotoxic and Nongenotoxic Agents: Comparison of H2AX Phosphorylation with Cell Death Response. *Toxicol. Sci.* **2014**, *140*, 103–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kinner, A.; Wu, W.; Staudt, C.; Iliakis, G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5678–5694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Toledo, L.; Neelsen, K.J.; Lukas, J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 735–749. [[CrossRef](#)]
9. Buisson, I.; Le Bouffant, R.; Futel, M.; Riou, J.-F.; Umbhauer, M. Pax8 and Pax2 are specifically required at different steps of Xenopus pronephros development. *Dev. Biol.* **2015**, *397*, 175–190. [[CrossRef](#)]
10. Forment, J.V.; O'Connor, M.J. Targeting the replication stress response in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *188*, 155–167. [[CrossRef](#)]
11. Sarni, D.; Kerem, B. Oncogene-Induced Replication Stress Drives Genome Instability and Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1339. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, J.; Dai, Q.; Park, D.; Deng, X. Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy. *Genes* **2016**, *7*, 51. [[CrossRef](#)]
13. Sanjiv, K.; Hagenkort, A.; Calderón-Montaña, J.M.; Koolmeister, T.; Reaper, P.M.; Mortusewicz, O.; Jacques, S.A.; Kuiper, R.V.; Schultz, N.; Scobie, M.; et al. Cancer-Specific Synthetic Lethality between ATR and CHK1 Kinase Activities. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 3407–3416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Ding, D.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhang, X.; Gao, Y.; Yin, L.; Li, Q.; Li, J.; Chen, H. Induction and inhibition of the pan-nuclear gamma-H2AX response in resting human peripheral blood lymphocytes after X-ray irradiation. *Cell Death Discov.* **2016**, *2*, 16011. [[CrossRef](#)]
15. Parsels, L.A.; Parsels, J.D.; Tanska, D.M.; Maybaum, J.; Lawrence, T.S.; Morgan, M.A. The contribution of DNA replication stress marked by high-intensity, pan-nuclear γ H2AX staining to chemosensitization by CHK1 and WEE1 inhibitors. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 1076–1086. [[CrossRef](#)]
16. Quanz, M.; Chassoux, D.; Berthault, N.; Agrario, C.; Sun, J.-S.; Dutreix, M. Hyperactivation of DNA-PK by Double-Strand Break Mimicking Molecules Disorganizes DNA Damage Response. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6298. [[CrossRef](#)]
17. Meyer, B.; Voss, K.-O.; Tobias, F.; Jakob, B.; Durante, M.; Taucher-Scholz, G. Clustered DNA damage induces pan-nuclear H2AX phosphorylation mediated by ATM and DNA-PK. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6109–6118. [[CrossRef](#)]
18. Horn, S.; Brady, D.; Prise, K. Alpha particles induce pan-nuclear phosphorylation of H2AX in primary human lymphocytes mediated through ATM. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 2199–2206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Desplancq, D.; Freund, G.; Conic, S.; Sibling, A.-P.; Didier, P.; Stoessel, A.; Oulad-Abdelghani, M.; Vigneron, M.; Wagner, J.; Mély, Y.; et al. Targeting the replisome with transduced monoclonal antibodies triggers lethal DNA replication stress in cancer cells. *Exp. Cell Res.* **2016**, *342*, 145–158. [[CrossRef](#)]
20. Singh, A.; Xu, Y.-J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes* **2016**, *7*, 99. [[CrossRef](#)]
21. Freund, G.; Sibling, A.-P.; Desplancq, D.; Oulad-Abdelghani, M.; Vigneron, M.; Gannon, J.; Van Regenmortel, M.H.; Weiss, E. Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *mAbs* **2013**, *5*, 518–522. [[CrossRef](#)]
22. Conic, S.; Desplancq, D.; Tora, L.; Weiss, E. Electroporation of Labeled Antibodies to Visualize Endogenous Proteins and Posttranslational Modifications in Living Metazoan Cell Types. *Bio Protoc.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Natale, F.; Rapp, A.; Yu, W.; Maiser, A.; Harz, H.; Scholl, A.; Grulich, S.; Anton, T.; Hörl, D.; Chen, W.; et al. Identification of the elementary structural units of the DNA damage response. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15760. [[CrossRef](#)]
24. Qiu, Z.; Oleinick, N.L.; Zhang, J. ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother. Oncol.* **2018**, *126*, 450–464. [[CrossRef](#)]
25. Ewald, B.; Sampath, D.; Plunkett, W. H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 1239–1248. [[CrossRef](#)]
26. Isono, M.; Niimi, A.; Oike, T.; Hagiwara, Y.; Sato, H.; Sekine, R.; Yoshida, Y.; Isobe, S.-Y.; Obuse, C.; Nishi, R.; et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 520–532. [[CrossRef](#)]
27. Grimaudo, S.; Tolomeo, M.; Chimirri, A.; Zappala, M.; Gancitano, R.A.; D'Alessandro, N. Selective induction of apoptosis in multidrug resistant HL60R cells by the thiazolobenzoimidazole derivative 1-(2,6-difluorophenyl)-1H,3H-thiazolo [3,4-a] benzimidazole (TBZ). *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1756–1763. [[CrossRef](#)]
28. Fernandez-Vidal, A.; Vignard, J.; Mirey, G. Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2611. [[CrossRef](#)]
29. Manders, E.M.M.; Verbeek, F.J.; Aten, J.A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* **1993**, *169*, 375–382. [[CrossRef](#)]
30. Ashley, A.K.; Shrivastav, M.; Nie, J.; Amerin, C.; Troksa, K.; Glanzer, J.G.; Liu, S.; Opiyo, S.O.; Dimitrova, D.D.; Le, P.; et al. DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. *DNA Repair* **2014**, *21*, 131–139. [[CrossRef](#)]
31. Roos, W.P.; Kaina, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 237–248. [[CrossRef](#)]
32. Conic, S.; Desplancq, D.; Ferrand, A.; Fischer, V.; Heyer, V.; San Martin, B.R.; Pontabry, J.; Oulad-Abdelghani, M.; Wright, G.D.; Molina, N.; et al. Imaging of native transcription factors and histone phosphorylation at high resolution in live cells. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1537–1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Ji, J.; Zhang, Y.; Redon, C.E.; Reinhold, W.C.; Chen, A.P.; Fogli, L.K.; Holbeck, S.L.; Parchment, R.E.; Hollingshead, M.; Tomaszewski, J.E.; et al. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Johansson, P.; Muslimovic, A.; Hultborn, R.; Fernström, E.; Hammarsten, O. In-solution staining and arraying method for the immunofluorescence detection of γ H2AX foci optimized for clinical applications. *BioTechniques* **2011**, *51*, 185–189. [[CrossRef](#)]
35. Fu, S.; Yang, Y.; Tirtha, D.; Yen, Y.; Zhou, B.; Zhou, M.-M.; Ohlmeyer, M.; Ko, E.C.; Cagan, R.; Rosenstein, B.S.; et al. γ -H2AX Kinetics as a Novel Approach to High Content Screening for Small Molecule Radiosensitizers. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38465. [[CrossRef](#)]
36. Rogakou, E.P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 905–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ivashkevich, A.; Redon, C.E.; Nakamura, A.J.; Martin, R.F.; Martin, O.A. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* **2012**, *327*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Maréchal, A.; Zou, L. RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Res.* **2015**, *25*, 9–23. [[CrossRef](#)]
39. Liaw, H.; Lee, D.; Myung, K. DNA-PK-Dependent RPA2 Hyperphosphorylation Facilitates DNA Repair and Suppresses Sister Chromatid Exchange. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mukherjee, B.; Kessinger, C.; Kobayashi, J.; Chen, B.P.C.; Chen, D.J.; Chatterjee, A.; Burma, S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair* **2006**, *5*, 575–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Zuazua-Villar, P.; Ganesh, A.; Phear, G.; Gagou, M.E.; Meuth, M. Extensive RPA2 hyperphosphorylation promotes apoptosis in response to DNA replication stress in CHK1 inhibited cells. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 9776–9787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Fournier, L.-A.; Kumar, A.; Stirling, P. Chromatin as a Platform for Modulating the Replication Stress Response. *Genes* **2018**, *9*, 622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Revet, I.; Feeney, L.; Bruguera, S.; Wilson, W.; Dong, T.K.; Oh, D.H.; Dankort, D.; Cleaver, J.E. Functional relevance of the histone H2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8663–8667. [[CrossRef](#)]
44. Gagou, M.E.; Zuazua-Villar, P.; Meuth, M. Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 739–752. [[CrossRef](#)]
45. Goss, K.L.; Koppenhafer, S.L.; Harmony, K.M.; Terry, W.W.; Gordon, D.J. Inhibition of CHK1 sensitizes Ewing sarcoma cells to the ribonucleotide reductase inhibitor gemcitabine. *Oncotarget* **2017**, *8*, 87016–87032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Imreh, G.; Norberg, H.V.; Imreh, S.; Zhivotovsky, B. Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger γ H2AX-ATM-p53-mediated apoptosis. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Koh, S.-B.; Courtin, A.; Boyce, R.J.; Boyle, R.G.; Richards, F.M.; Jodrell, D.I. CHK1 Inhibition Synergizes with Gemcitabine Initially by Destabilizing the DNA Replication Apparatus. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3583–3595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mirzayans, R.; Andrais, B.; Kumar, P.; Murray, D. Significance of Wild-Type p53 Signaling in Suppressing Apoptosis in Response to Chemical Genotoxic Agents: Impact on Chemotherapy Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 928. [[CrossRef](#)]
49. De Feraudy, S.; Revet, I.; Bezrookove, V.; Feeney, L.; Cleaver, J.E. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of H2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 6870–6875. [[CrossRef](#)]
50. Plappert-Helbig, U.; Libertini, S.; Friauff, W.; Theil, D.; Martus, H.-J. Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity in vivo: Gamma-H2AX Tissue-specific Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **2019**, *60*, 4–16. [[CrossRef](#)]
51. Andrew, S.M.; Titus, J.A. Fragmentation of immunoglobulin G. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2003**, *17*, 16-4. [[CrossRef](#)]

52. Dietsch, F.; Donzeau, M.; Cordonnier, A.M.; Weiss, E.; Chatton, B.; Vigneron, M. A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells. *BioTechniques* **2017**, *62*, 80–82. [[CrossRef](#)]
53. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials

Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress

Eric Moeglin, Dominique Desplancq, Sascha Conic, Mustapha Oulad-Abdelghani, Audrey Stoessel, Manuela Chiper, Marc Vigneron, Pascal Didier, Laszlo Tora and Etienne Weiss

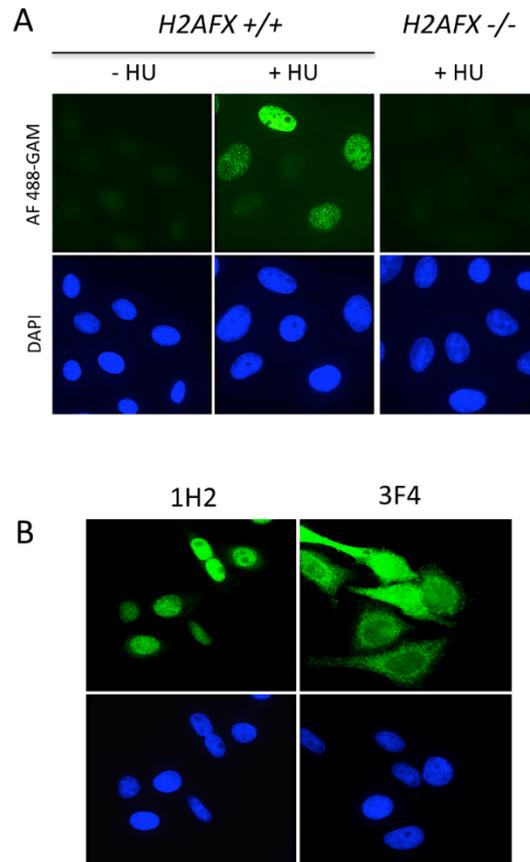


Figure S1. Binding properties of the anti- γ -H2AX monoclonal antibodies used in this study. **(A)** Immunofluorescence detection of γ -H2AX with the commercially available JBW301 antibody in HU-treated wild-type or H2AFX^{-/-} HeLa cells. **(B)** Behavior of mAbs 1H2 and 3F4 in HeLa cells after intracellular delivery by electroporation. The delivered antibodies were revealed with Alexa Fluor 488-labelled anti-mouse globulins 24 h post-transduction. Magnification: 630 \times .

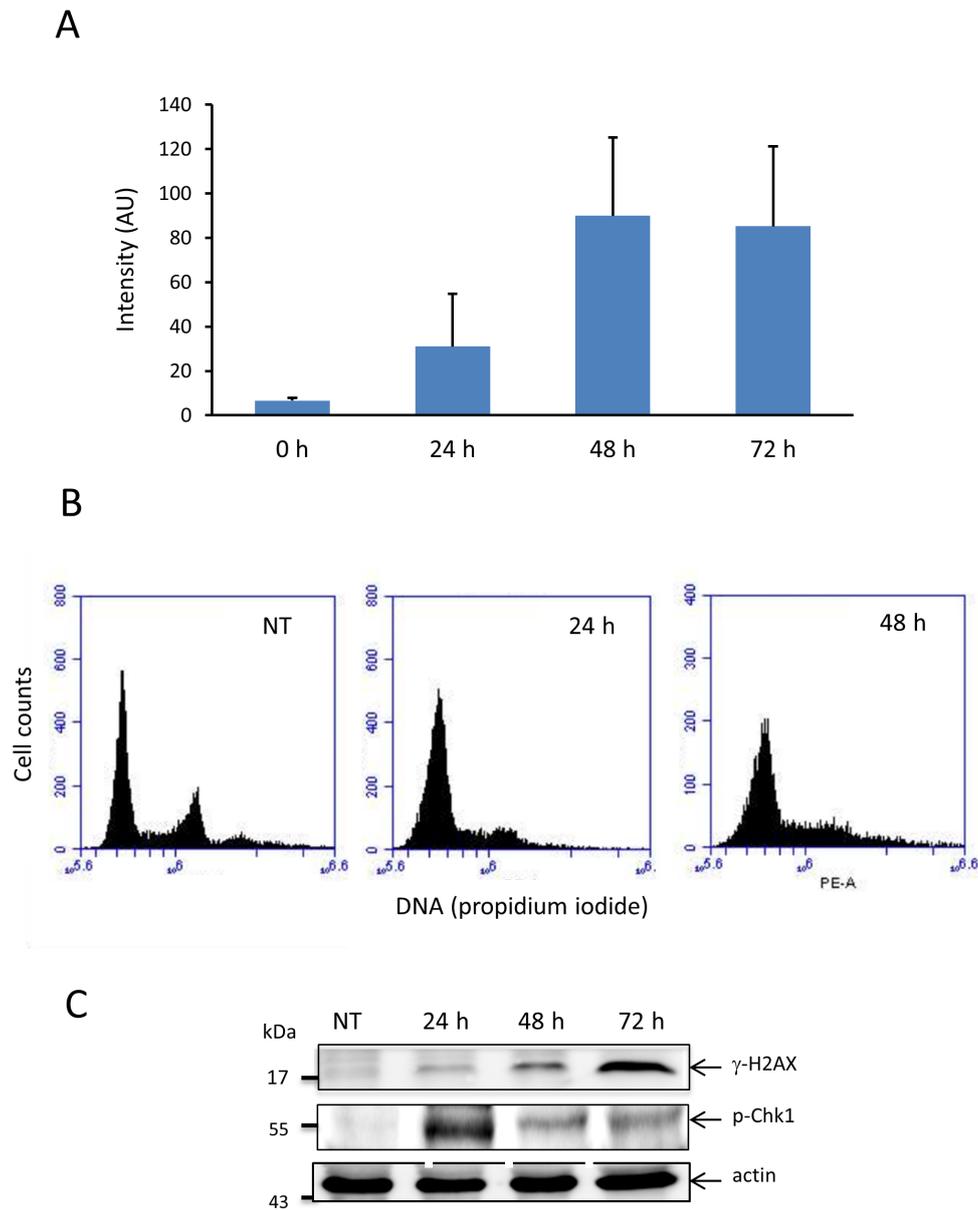


Figure S2. Detection of γ -H2AX upon prolonged incubation of HeLa cells with HU. **(A)** The histogram corresponds to the average nuclear fluorescence intensity of a minimum of 100 nuclei per time point as shown in Figure 1E. **(B)** HU-treated HeLa cells as in A were harvested at the indicated time points and subjected to FACS analysis after propidium iodide staining. Approximately 2×10^4 cells were counted in each case. The panels correspond to the measurement of the DNA content (cell cycle state). **(C)** Binding of mAb 3F4 as assayed by Western blotting. HeLa cells (5×10^4) were incubated with HU and crude extracts (30 μ g) prepared at the indicated time points were subjected to acrylamide gel electrophoresis and blotting. The indicated polypeptides were probed with relevant antibodies. Bound 3F4 antibody and anti-pChk-1 antibodies were revealed with HRP-labelled anti-mouse or anti-rabbit globulins, respectively. Actin was used as a loading control. The migration of molecular weight markers is indicated.

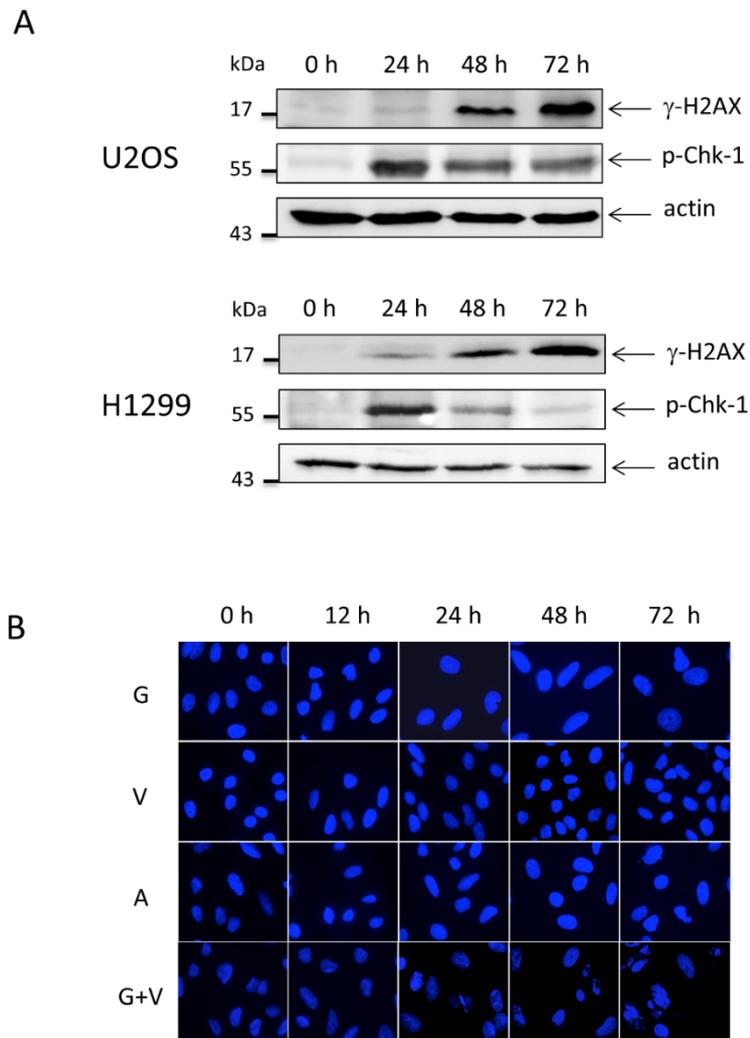


Figure S3. Dynamics of γ -H2AX levels in U2OS and H1299 cells. (A) Analysis of the accumulation of γ -H2AX and phospho-Chk-1 polypeptides upon HU treatment. Crude cell extracts (35 μ g) were prepared at the indicated time points and subjected to Western blotting as described in the legend of Supplementary Figure S2. (B) The pictures correspond to the cells represented in Figure 4A after counterstaining with DAPI. Magnification: 630 \times .

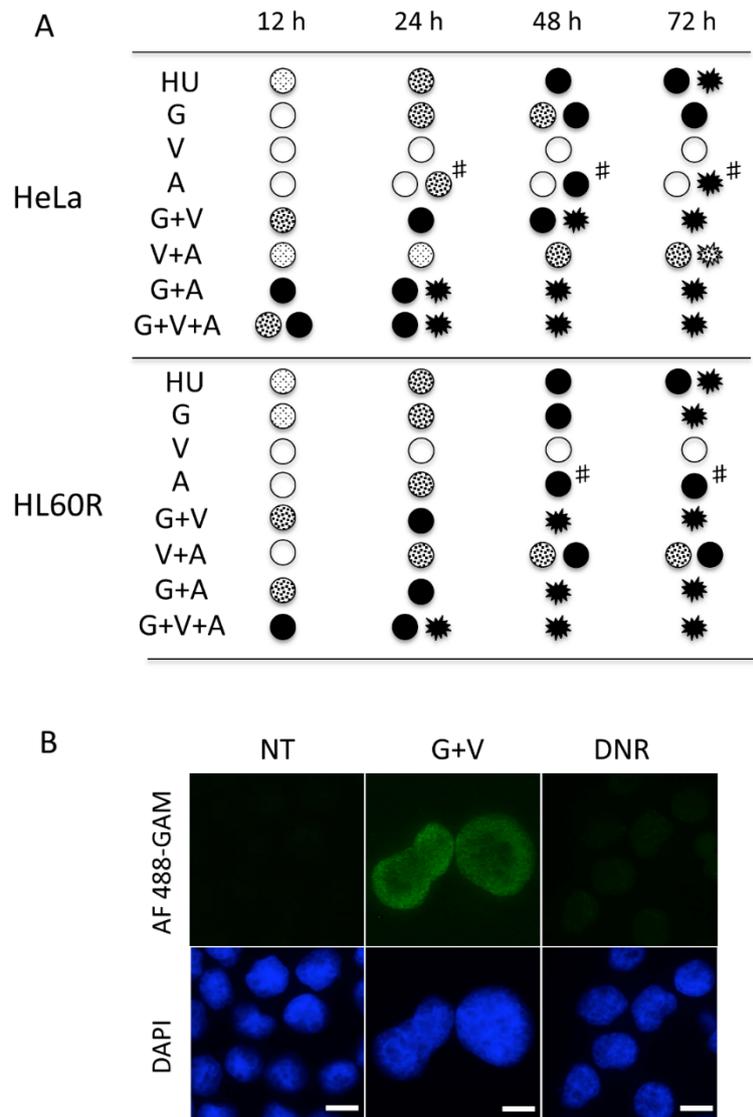


Figure S4. Dynamics of γ -H2AX formation in HeLa and HL60R cells. **(A)** The γ -H2AX levels measured by immunofluorescence after treatment with the indicated drug combinations are represented as symbols, as described in Figure 3. **(B)** Analysis by immunofluorescence of γ -H2AX in HL60R cells after treatment with G+V for 24 h. The staining of γ -H2AX was performed as indicated in the legend of Figure 2. Scale bar: 10 μ m. DNR, daunorubicin.

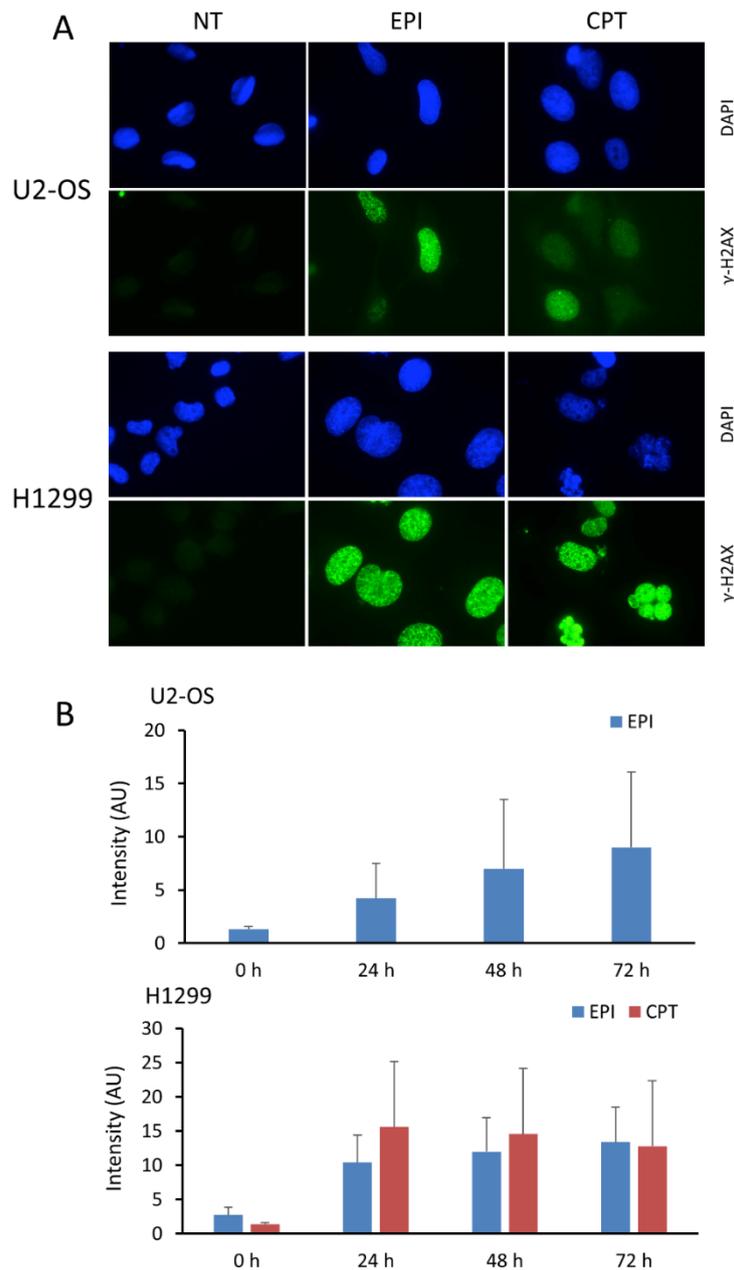


Figure S5. Detection of γ -H2AX after treatment with epirubicin and camptothecin. U2OS and H1299 cells were treated with epirubicin (EPI) or camptothecin (CPT) (Materials and Methods) and the formation of widespread nuclear γ -H2AX was monitored by immunofluorescence with mAb 3F4 24 h, 48 h and 72 h post-treatment. **(A)** The micrographs show typical fields of cells observed under the microscope 72 h post-incubation after counterstaining with DAPI. Magnification: 630 \times . **(B)** The fluorescence intensity of the nuclei of at least 150 cells from two independent experiments after treatment with either EPI or CPT (H1299) or EPI (U2OS) was calculated. The mean values obtained at the indicated time points are represented.

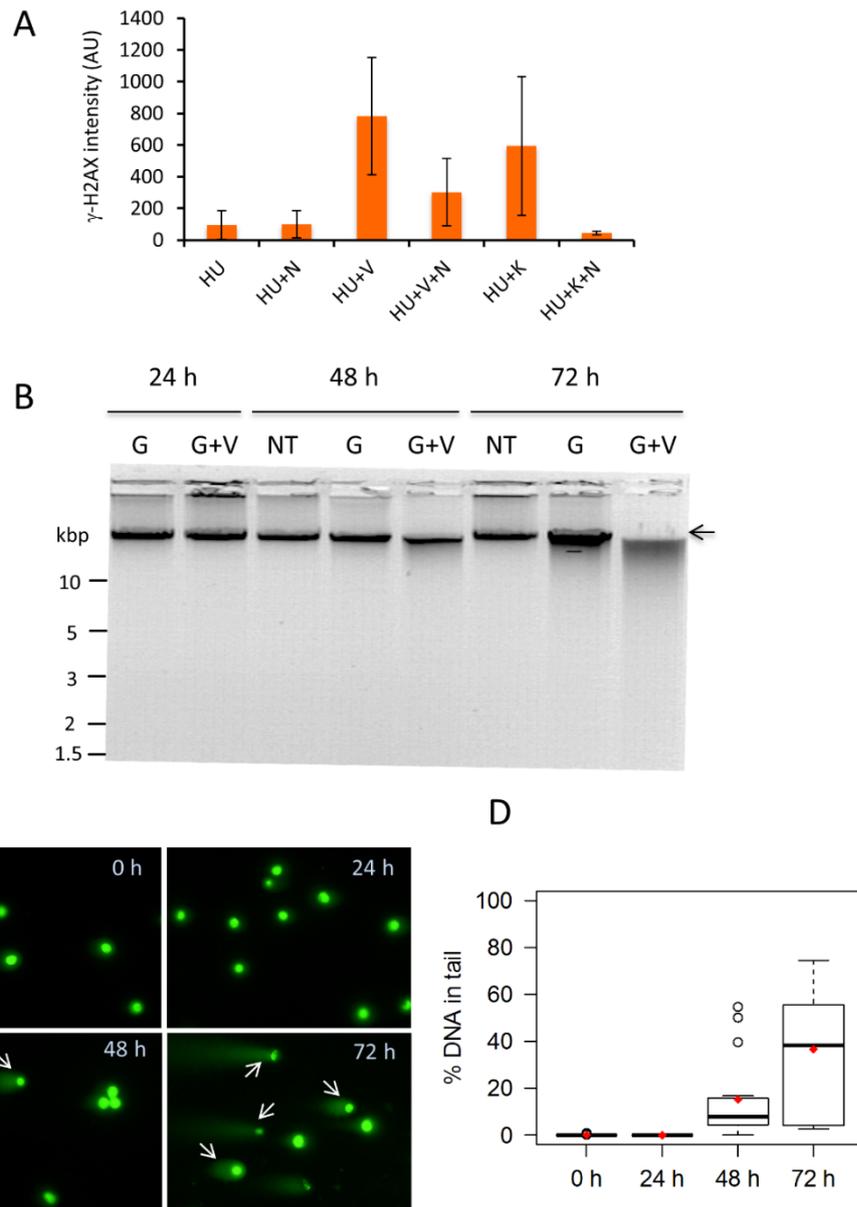


Figure S6. Detection of γ -H2AX following co-treatment with the DNA-PK inhibitor and analysis of the genomic DNA integrity. The graph shown in (A) represents the mean values of the nuclear fluorescence intensity of 125 U2OS cells treated as indicated. (B) U2OS cells were treated as indicated and their genomic was extracted at 24 h, 48 h and 72 h post-treatment. Samples of 5×10^4 cells containing a similar amount of DNA were loaded on agarose gel. The DNA bands were visualized by UV-illumination following staining with ethidium bromide. DNA markers were migrated in parallel. NT, non-treated. (C) U2OS cells treated with G+V for 24 h, 48 h or 72 h were assayed by single cell gel electrophoresis (Comet assay; Materials and Methods) and subsequently analyzed by fluorescence microscopy after staining with SYBR Gold. The micrographs correspond to typical fields observed with a 20 \times objective. The comet tails are indicated (arrows). (D) Quantitative analysis of DNA present in the comet tail of the U2OS cells treated as in C. Up to 50 cells/time point were used for calculating the ratios (expressed in %) between the signal of DNA present in the comet tail and the signal of DNA of the whole cell.

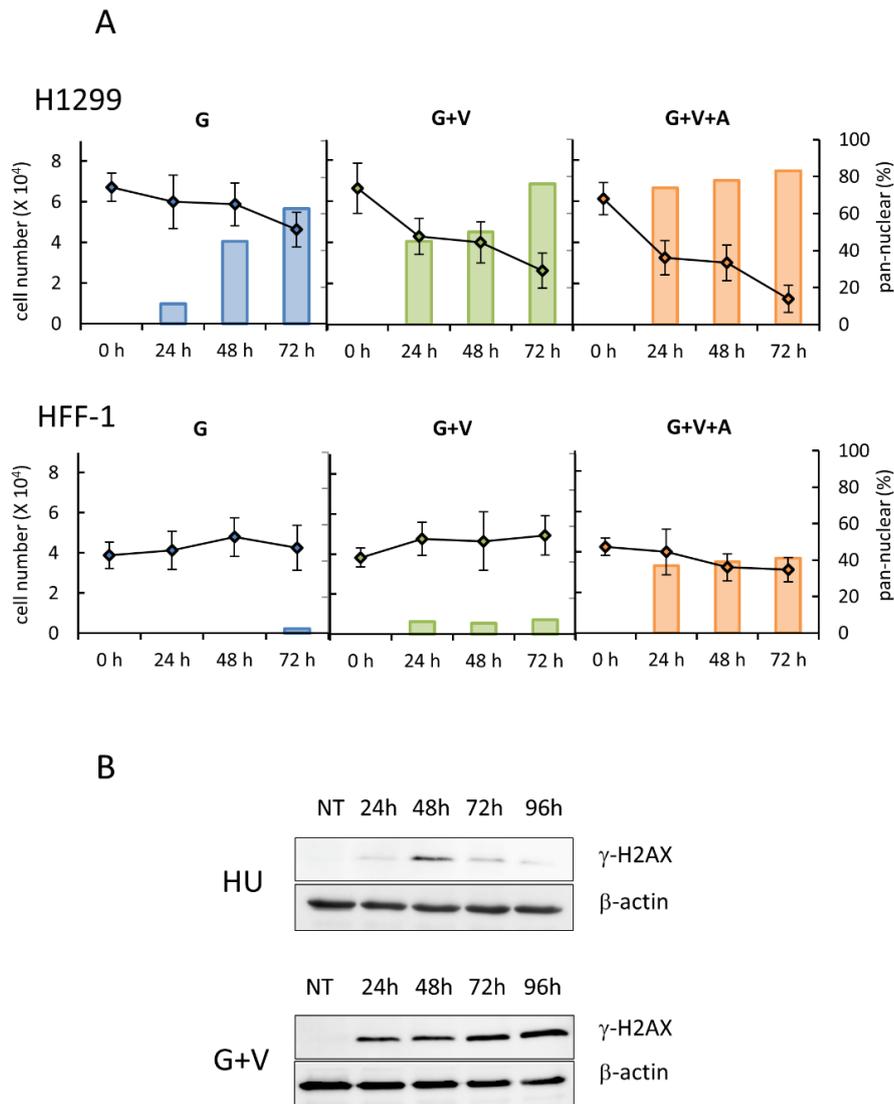


Figure S7. Cell death induction upon irreversible formation of widespread nuclear γ -H2AX. **(A)** Time course analysis of the percentage of pan-nuclear γ -H2AX stained H1299 or HFF-1 cells after treatment with G, G+V or G+V+A. The curves correspond to the number of cells that remained attached to the plastic in experiments done in parallel. A minimum of 150 cells were analysed in each condition. **(B)** Variation of γ -H2AX levels in U2OS cells treated for 24 h (pulse treatment) with the indicated drugs as probed by Western blotting with mAb 3F4. Following treatment, the U2OS cells (5×10^4) were incubated in fresh medium and extracts ($30 \mu\text{g}$) were prepared at the indicated time points, as indicated in the legend of Figure 5B. Actin was used as a loading control.

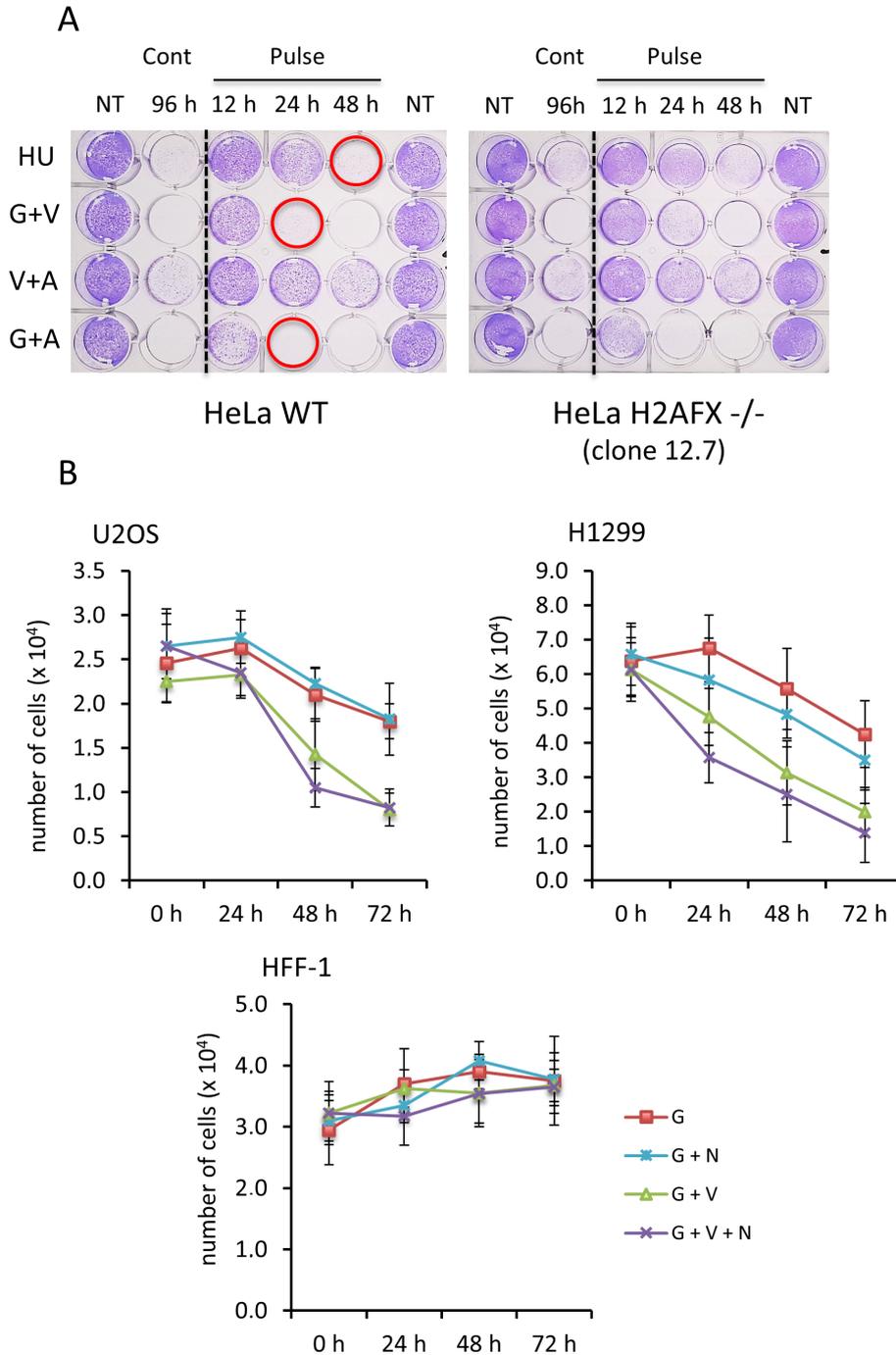


Figure S8. Importance of pan-nuclear γ -H2AX formation for cell death. **(A)** The represented viability assays were performed with either wild-type (WT) or *H2AFX*^{-/-} HeLa cells as described in the legend of Figure 6D. **(B)** U2OS, H1299 and HFF-1 cells were treated with G (red), G+N (blue), G+V (green) and G+V+N (purple) and their survival rate was analysed over a total period of 72 h by counting the cells remaining bound to the plastic. The graphs correspond to the number of viable cells counted at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h post-treatment.

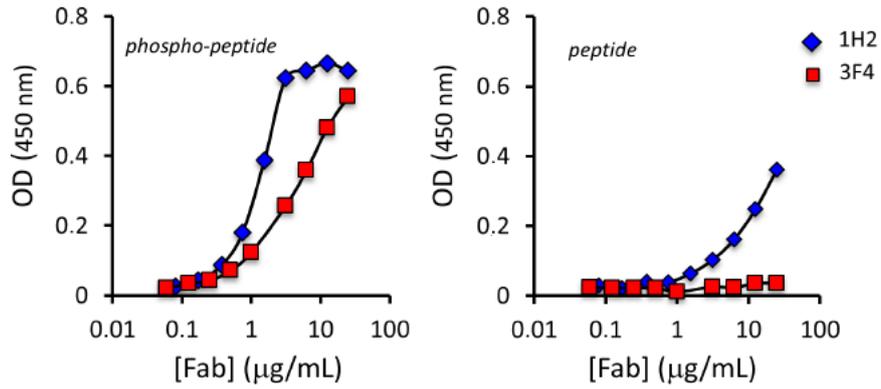


Figure S9. Binding specificity of the 1H2 and 3F4 Fabs as probed by ELISA. Varying amounts of purified Fabs were allowed to react with either the phosphorylated (*phospho peptide*) or the non-phosphorylated (*peptide*) peptides corresponding to the C-terminus of H2AX coated on plate. Bound material was revealed with HRP-labelled secondary anti-mouse globulins. The color code is indicated.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3 Conclusions

Au cours de cette étude, nous avons développé et caractérisé un nouvel anticorps, le mAb 3F4, capable de détecter γ -H2AX *in vitro* et *in cellulo* et ne présentant pas de reconnaissance aspécifique d'un autre antigène, notamment de la forme non phosphorylée de H2AX. Grâce à cet outil, nous avons pu établir les conclusions suivantes :

1. Nous avons identifié que la phosphorylation pan-nucléaire de γ -H2AX devient le phénotype majoritaire suite à un traitement prolongé (48 h) des cellules cancéreuses avec des inhibiteurs de la RnR et que l'inhibition de la RSR par l'ajout d'un inhibiteur d'ATR et/ou de Chk1 provoque une apparition plus rapide de ce phénotype (dès 24 h).
2. En inhibant sélectivement les 3 kinases responsables de la phosphorylation de H2AX, nous avons identifié que DNA-PK est à l'origine de cette phosphorylation pan-nucléaire. De façon intéressante, l'hyperphosphorylation de la protéine RPA sur les sérines 4 et 8, également provoqué par DNA-PK (Liaw et al., 2011) est induite d'une façon similaire à γ -H2AX. Ainsi cette hyperphosphorylation a pu être observée sous la forme de foci après induction d'un stress répliatif modéré et sous forme pan-nucléaire après induction d'un stress répliatif intense.
3. Nous avons établi l'existence d'un lien entre le marquage γ -H2AX pan-nucléaire et une perte de la viabilité cellulaire. Ce marquage indiquant probablement un dépassement des mécanismes de réparation de la cellule et l'induction de dommages à l'ADN irréversibles comme l'illustrent les résultats des observations en microscopie temps réel et de traitements transitoires.
4. Nous avons montré que la protéine H2AX n'est pas essentielle car une lignée de cellules HeLa dans laquelle le gène de H2AX a été inactivé a pu être générée. De plus, la perte de H2AX n'a pas eu d'influence sur la réponse de ces cellules au stress répliatif, indiquant que les mécanismes de réparation dans lesquels intervient H2AX sont toujours fonctionnels en son absence.
5. La phosphorylation pan-nucléaire de H2AX ne semble pas avoir de fonction biologique directe. En effet, les cellules dans lesquelles la kinase DNA-PK a été inhibée n'ont pas montré de différence en termes de survie lorsqu'elles sont soumises à un stress répliatif modéré ou intense.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le marquage γ -H2AX pan-nucléaire est un bon indicateur du caractère létal du stress répliatif induit dans les cellules cancéreuses. Ce résultat a servi de point de départ pour le développement d'une méthodologie de criblage de la létalité de molécules génotoxiques qui sera abordée dans la troisième partie de mes travaux de thèse.

Génération d'un nanobody et
d'une stratégie optogénétique
pour le suivi de γ -H2AX dans les
cellules vivantes

1 Introduction

Le travail de notre laboratoire sur la phosphorylation de H2AX a mis en évidence une relation entre cette phosphorylation et le stress réplicatif. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la phosphorylation pan-nucléaire de H2AX en tant qu'indicateur de la létalité du stress réplicatif auquel sont soumis les cellules cancéreuses.

L'anticorps monoclonal développé au sein de notre laboratoire bien que vectorisable sous forme de fragments Fabs dans les cellules vivantes, ne nous a pas permis d'étudier la dynamique de l'apparition de γ -H2AX. Notre laboratoire a donc travaillé au développement d'un VHH dirigé contre γ -H2AX pouvant être exprimé sous forme de chromobody dans le milieu intracellulaire après transfection de sa séquence codante. Cette caractéristique des VHHs nous a permis d'envisager le développement d'une méthodologie adaptée au suivi en temps réel de la phosphorylation de H2AX. En collaboration avec l'équipe du professeur Pierre Lafaye de l'institut Pasteur à Paris, 3 alpagas ont été immunisés avec le peptide C-terminal de γ -H2AX. La récupération des cellules B circulantes de ces animaux a permis la construction de 3 banques de phages codant pour des VHHs. Ces banques de phages ont été criblées et ont permis d'isoler 4 VHHs reconnaissant γ -H2AX.

La seconde partie de mon projet de thèse a été de caractériser ces VHHs pour évaluer leur possible utilisation pour l'imagerie en temps réel. Parmi les 4 VHHs, le VHH C6 s'est montré le plus adapté et j'ai développé et caractérisé une version bivalente de ce VHH permettant d'augmenter son affinité apparente par la création d'une avidité.

Lors de leur utilisation en transfection dans les cellules vivantes, les VHHs fusionnés à une protéine fluorescente sont généralement solubles et fonctionnels et peuvent donc reconnaître leur antigène. Cependant lorsque ces VHHs sont dirigés contre une cible présente en faible quantité dans la cellule, l'absence de contrôle sur les niveaux d'expression des VHHs peut générer un signal aspécifique important. Notre objectif était de pouvoir visualiser l'apparition d'une MPT (γ -H2AX) en réponse à un stimulus (le stress réplicatif) et de pouvoir quantifier précisément les niveaux de γ -H2AX induits par différents niveaux de stress réplicatif. L'objectif poursuivi était donc de disposer d'un chromobody adapté à la visualisation de toute l'étendue entre une absence de signal et un signal γ -H2AX intense.

Pour atteindre cet objectif nous avons initié une collaboration avec l'équipe du professeur Di Ventura à Freiburg qui a mis au point un système optogénétique d'export nucléaire inducible par exposition à la lumière bleue, le système LEXY. γ -H2AX étant un antigène nucléaire ancré au sein de la chromatine, notre stratégie a été de déplacer les chromobodies non liés à γ -H2AX du noyau vers le cytoplasme permettant ainsi de ne visualiser qu'un signal spécifique à l'intérieur du noyau.

L'ensemble des résultats obtenus ont fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis à publication prochainement et qui est présenté ci-après (article n°2, en cours de soumission).

Les résultats complémentaires obtenus lors de ce travail sont présentés à la suite de l'article.

2 Article n°2

Development of a novel nanobody to specifically visualize histone H2AX phosphorylation in fixed and living cells

Short title: Tracking of H2AX phosphorylation with a nanobody

E. Moeglin¹, C. Massute², D. Desplancq¹, A. Stoessel¹, J. Ranniger², A.G. McEwen^{3,4,5,6}, G. Zeder-Lutz¹, M. Oulad-Abdelghani^{3,4,5,6}, M. Chipper¹, G. Zuber¹, P. Lafaye⁷, A. Poterszman^{3,4,5,6}, B. Di Ventura^{2,*}, E. Weiss^{1,*}

¹ Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242, CNRS/Université de Strasbourg, boulevard S. Brant, 67412 Illkirch, France

² Signaling Research Centers BIOSS and CIBSS, and Institute of Biology II, University of Freiburg, Germany

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Illkirch Cedex, C.U. Strasbourg, France

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Illkirch, France

⁵ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U964, Illkirch, France

⁶ Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁷ Institut Pasteur, PFIA, CNRS/INSERM/Université Paris Descartes, rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

Correspondence should be addressed to B.D.V. (barbara.di.ventura@biologie.uni-freiburg.de) and to E.W. (etienne.weiss@unistra.fr)

ABSTRACT

Histone H2AX phosphorylated at serine 139 (γ -H2AX) is a hallmark of DNA damage signaling the presence of DNA double-strand breaks in mammalian cells. While γ -H2AX can be visualized with antibodies in fixed cells, its detection in living cells was so far not possible. Here we use immune libraries and phage display to isolate nanobodies that specifically bind to γ -H2AX. We engineer a bivalent version of the best nanobody, which we call gammaXbody, and show that bivalency is essential to quantitatively visualize γ -H2AX in fixed drug-treated cells. We solve the crystal structure of the gammaXbody-phosphopeptide complex to understand the atomic constituents behind specificity and design a non-binding mutant. Finally, we devise an optogenetic strategy to remove unbound gammaXbody from the nucleus making γ -H2AX foci detectable in intact living cells. This novel tool enables to study the dynamics of this particular chromatin modification in individual cells under a variety of conditions.

Keywords: H2AX, phosphorylation, replication stress, nanobody, imaging, optogenetic control, cancer cells, genotoxicity assay

INTRODUCTION

Histones constitute the core proteins of chromatin and their post-translational modifications (PTMs) contribute to the molecular basis of epigenetic gene regulation and cellular memory (1). In humans, several variant forms of histones have been described (2) and this is remarkably relevant for the H2A histone. The H2A variants represent the largest and most diverse family of histones; there is overwhelming evidence that their unstructured N- and C-termini, which protrude out of the core structure of the nucleosome, harbor main sites for PTMs in response to varying stimuli (3). The H2AX variant shares high amino acid similarity with H2A and is characterized by an extended C-terminus, which is phosphorylated when the cells become injured by agents that provoke DNA replication stress (RS) and genome instability (4). The phosphorylation of serine at position 139 (S139) of H2AX has been particularly well studied and represents a key event in the detection and response to DNA damage (5).

Phosphorylation of histone H2AX at S139, which gives rise to what generally referred to as γ -H2AX, is in fact a very early step in the DNA damage response (DDR) and an essential signal for the recruitment and retention of DDR complexes at the site of damage (6). Three different phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-related kinases mediate S139 phosphorylation on chromatin: ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related), and DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (7). ATM and DNA-PK share functional redundancy upon ionizing radiation, while ATR may preferentially phosphorylate H2AX during RS (8). This PTM of H2AX is highly dynamic and a number of phosphatases, including those of the PPP family and Wip1, are able to dephosphorylate γ -H2AX to fine-tune the duration and intensity of the DDR signaling (9). It has also been found that H2AX can be phosphorylated at residue T136 and at the C-terminal residue Y142 to facilitate DNA repair, whereas the persistency of the latter PTM may also trigger apoptosis (10). Nevertheless, S139 phosphorylation is regarded as the main PTM of H2AX since it is specifically recognized by the adaptor protein MDC1, which further recruits several E3 ubiquitin ligases to favor DNA repair and/or restart of the halted forks during RS (11).

Because γ -H2AX is involved in the DDR, it is generally considered a biomarker of DNA double-strand breaks (DSBs) and its relevance as read-out of sustained RS is well accepted (12). In addition, H2AX is also phosphorylated in the absence of DNA breakage, likely during replication fork arrest and subsequent single-stranded DNA accumulation, and this early event upon insult induces the formation of discrete nuclear foci of γ -H2AX, which were visualized with specific antibodies under the microscope. The formation of γ -H2AX, which can spread

progressively over the whole nucleus (pan-nuclear γ -H2AX), gives in fact an estimate of the severity of the RS. γ -H2AX is considered nowadays a universal bio-indicator of the severity of genotoxicity of compounds that interfere with DNA replication *in vitro* and *in vivo* as well (13). Indeed, almost all studies aiming at selecting small molecules triggering irreversible genome instability refer to γ -H2AX formation and retention. In particular, tracking γ -H2AX is of high interest for validating chemotherapeutics (14) and for controlling the carcinogenic properties of chemicals present in biological samples (15). Immunofluorescence with validated antibodies seems to be the method of choice for accurately determining γ -H2AX levels (16) but there is no simple tool available for monitoring γ -H2AX turn-over and for measuring its direct impact on cell viability.

In a previous study, we have shown that delivery in cells of antigen-binding fragments (Fabs) derived from an anti- γ -H2AX monoclonal antibody (mAb) allows following the fate of cancer cells after treatment with varying RS-inducing drug combinations (17, 18). Although it was possible to show with this method that extensive γ -H2AX phosphorylation is indicative of irreversible cell death induction, we could not clearly identify the dynamic changes of the γ -H2AX levels during the treatment. Indeed, conventional antibodies cannot be easily delivered in living cells, and therefore require fixation of the samples.

Recently, it has been shown that single-domain antibody fragments of camelids, generally termed nanobodies, represent exquisite tools for tracking intracellular components (19, 20). Nanobodies correspond to the variable domain (VHH) of the heavy chain-only antibodies (HcAb) expressed in these animals (19). They can be cloned as VHH repertoires with minimal modification from total RNA of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained after immunization, thus presenting an authentic picture of the *in vivo*-matured heavy chain repertoire diversity. Moreover, their small size (~15 kDa) compared to conventional antibodies (~150 kDa) and, especially, their capacity to fold stably in a reducing environment make them excellent binding molecules in cells (20, 21). While alpaca-derived nanobodies against γ -H2AX have already been generated (22), these tools didn't allow specific unambiguous detection of γ -H2AX in irradiated cells.

Here, we develop a novel nanobody, which we call gammaXbody, with high specificity against γ -H2AX. We demonstrate that bivalency is essential to achieve high specificity against the antigen. We solve the crystal structure of the nanobody in complex with the phosphopeptide representing the C-terminus of H2AX and are able to design mutations that impair the binding. We show the ability of the gammaXbody to quantitatively visualize γ -H2AX in fixed as well

as live cells with the same precision as a validated mAb. Finally, we develop an optogenetic strategy based on the blue light-inducible nuclear export system LEXY (23) to discard inside live cells the non-specific background binding events in the crowded nucleus and retain only the fraction of nanobodies bound to γ -H2AX. Together, the gammaXbody and the optogenetic strategy presented here will enable to study the dynamics of H2AX phosphorylation at S139 in living cells in unprecedented ways. The optogenetic approach is versatile and can easily be adopted with other nanobodies, allowing a new way to visualize proteins and their PTMs inside cells with high specificity.

RESULTS

Development and selection of specific anti- γ -H2AX nanobodies by phage display

To produce a nanobody to track γ -H2AX in cells under RS, we immunized alpacas with the phosphorylated peptide CKATQA(p)SQEY corresponding to the C-terminal end of γ -H2AX (residues 134-142). This peptide has been used in a previous study to generate monoclonal antibodies that are suitable for detecting γ -H2AX in various immunoassays (17). Following immunization, the PBMCs were collected and VHH libraries of approximately 10^7 independent clones were constructed. The display of the VHH molecules on the tip of M13-based phages allows selecting by the phage display technology those that bind to the phosphopeptide immobilized on plate. This method of antigen presentation was preferred to other methods such as immobilization on magnetic beads because it previously allowed screening successfully cell culture supernatants containing monoclonal antibodies (17). Colony counting following the first round of panning (R1) showed that phages expressing a VHH against the phosphopeptide were only present in the repertoire of one animal (alpaca 2) (Fig. 1A). The same results were obtained after the second round of selection, indicating that only a low fraction of the cloned VHH molecules bound to the antigen. This suggests that immunization with the phosphopeptide did not trigger a strong heavy chain-only antibody response in the animals, but promoted mainly the synthesis of IgG1, since the sera collected from the 3 animals were positive when tested by ELISA with anti-alpaca immunoglobulins. Of note, anti- γ -H2AX heavy chain-only antibodies could not be detected in the sera by immunoprecipitation with peptide-coated beads.

We tested the binding specificity of the VHH-displaying phages selected from library 2 by comparing their reactivity against the phosphorylated and the non-phosphorylated form of the peptide coated on plate (phage-ELISA). The selected populations bound preferentially to the phosphopeptide, which suggests that the phosphate group linked to the S139 residue is important for the recognition (Fig. 1B, left). Interestingly, we also observed that the phages that corresponded to the library without selection (R0) were able to react with the phosphopeptide, albeit to a lesser extent (Fig. 1B). Similar results were obtained when the same experiment was performed with nuclear extracts of U2OS cells treated for 24 hours with hydroxyurea (H), which induces RS and causes H2AX phosphorylation (Fig. 1B, right). This suggests that the VHH molecules displayed on the surface of the selected phages recognize γ -H2AX.

Individual clones of the positive phage population (R1 and R2 from library 2) were amplified and subjected to DNA sequencing. The alignment of 165 different sequences showed that

almost all analyzed VHH clones have a similar amino acid composition, except at the positions 98 and 99 (Kabat numbering) in the complementary-determining region 3 (CDR3) (Fig. 1D), implying that they all may have arisen from a single B cell. The specific binding of the four most-represented variants (A4, A9, C6 and G2) to the phosphopeptide was confirmed by phage-ELISA (Fig. 1C). Collectively, these results show that the screening by phage display of several immune VHH libraries led to the selection of a unique VHH scaffold that specifically binds to γ -H2AX.

The selected nanobodies are soluble in both bacterial and mammalian cell cytoplasm

To test whether the four identified VHH variants could be used as nanobodies in immunoassays and in cells, we first sub-cloned their coding regions into a bacterial vector equipped with the relevant tags for detection and purification and expressed them as single polypeptides in the cytoplasm of *E. coli* cells. SDS-PAGE analysis of cell extracts showed that the four nanobodies behave differently, despite their high amino acid sequence homology: C6 and A9 are soluble, whereas A4 and G2 are mostly insoluble after cytoplasmic expression (fig. S1A). The yield of the purified A9 and C6 nanobodies, which migrate as single bands on gel (Fig. 2A), was in the range of 8-20 mg/L of bacterial culture. Their capacity to bind to the phosphopeptide was tested by ELISA. Both reacted with the antigen when used at a concentration of 0.1-10 μ g/mL (Fig. 2B). No reactivity towards the non-phosphorylated peptide was observed under these conditions (Fig. 2B), confirming the results obtained with the phage-ELISA. We then tested the performance of the purified A9 and C6 nanobodies in immunofluorescence. Both showed the typical staining of γ -H2AX following treatment of H1299 cells with H or with a combination of gemcitabine (G) and a Chk-1 inhibitor (A) (Fig. 2C and fig. S1B). Treating the cells with both drugs induces intense RS (17). Interestingly, image quantification indicated that the background staining in this assay was always lowest with C6 (Fig. 2D). Despite their ability to detect the phosphorylated C-terminus of H2AX in fixed cells, these nanobodies could hardly reveal γ -H2AX foci, which were instead readily observed with the well characterized anti- γ -H2AX mAb 3F4 (17) (fig. S1C). Together, the results suggested that both C6 and A9 are valuable tools for γ -H2AX detection, but they are not equivalent to conventional antibodies. To understand the interaction between the nanobodies and the phosphopeptide at the atomic level, we solved the crystal structure of the complex at 1.8 Å resolution. We selected the C6 nanobody due to its higher stability upon storage and overall better performance compared to A9. Crystals belonged to space group P3₁, with 6 equivalent copies of the complex in the

asymmetric unit where significant electron density is observed for the last five residues of the peptide (Fig. 2E; Table S1). The other residues are highly flexible or disordered, implying that they are not involved in specific interactions. The nanobody adopts a canonical IgG fold with a scaffold of nine antiparallel β -strands forming two sandwiching β -sheets (24). [REDACTED]

[REDACTED]. Thus, the phosphate group of the phosphopeptide is a crucial determinant for the recognition by the C6 nanobody, explaining its high specificity for the modified peptide.

Next, we examined the behavior of the C6 nanobody when delivered in mammalian cells. In a previous work we have shown that antibodies and fragments thereof can be efficiently transduced into cultured cells by electroporation (25). Given their small size (15-20 kDa), nanobodies can theoretically easily diffuse into the nucleus after delivery in the cytoplasm. We therefore transduced the purified C6 nanobody in H1299 cells, which were then treated with H and imaged after 48 hours. Only in treated cells, the fluorescent signal resembled that typically observed for γ -H2AX (Fig. 3A). Since a similar staining was observed with the transduced Fab prepared by papain digestion of mAb 3F4 (17) (Fig. 3A), we concluded that the C6 nanobody binds to γ -H2AX under physiological conditions of incubation. Nevertheless, the background signal of C6 was slightly above that obtained with Fab 3F4 (Fig. 3A, right panels), which may indicate that the recognition of the antigen under these conditions is less stable for C6 than Fab 3F4. Next, we cloned the coding region of C6 fused in frame to mCherry to generate a chromobody (26) expressed under the control of the β -actin promoter and transiently transfected it into H1299 cells. The C6 chromobody was located in the nucleus of the treated as well as the untreated cells after analysis with either a widefield (Fig. 3B) or a confocal microscope (fig. S2A). We speculated that unspecific binding to a nuclear antigen was caused by the overexpression of the chromobody. To discern specific from unspecific binding, we

treated the cells with cytoskeletal (CSK) buffer prior to fixation. This treatment allows washing out all soluble (unbound) proteins while retaining the interactions of stably bound material (25). Under such stringent conditions, the signal of the chromobody was lost in both drug-treated and untreated cells (Fig. 3B), indicating that its nuclear localization upon transfection does not correspond to specific antigen binding and that the affinity of the C6 may not be sufficient to counteract the CSK wash. The same results were obtained when mCherry was substituted with GFP and A9 used instead of C6 (fig. S2, B and C). Since our aim was to develop a chromobody that can be used in live cells at low concentrations, we decided to improve the binding affinity of the C6 nanobody.

A bivalent C6 nanobody allows for the detection of γ -H2AX with high precision in fixed drug-treated cells

It has been previously reported that the affinity of a nanobody for its antigen can be improved by increasing the valency, for instance by genetically connecting together two copies of the VHH domain with a linker region to generate a so-called bivalent nanobody (27). We thus constructed a bivalent C6 nanobody (called C6B hereafter) and a mutated version of it (called C6BM), [REDACTED]). Both constructs were expressed in *E. coli* cells and, after purification and validation (fig. S3A, left panel), their capacity to bind to the phosphopeptide immobilized on plate was tested by ELISA (fig. S3A, middle panel). This experiment showed that C6B bound specifically to the phosphopeptide, whereas C6BM was, as expected, no more reacting.

To assess whether the purified C6B molecules harbor two functional binding sites, we performed quantitative binding assays using the surface plasmon resonance (SPR) technology. To calculate the affinity of C6 for the antigen (K_D value) we used purified monovalent molecules and found that it lies in the low nanomolar range (11 +/- 4 nM; fig. S3A, right panel). To compare the binding properties of the C6 and C6B nanobodies, saturating amounts were injected separately over a surface coated with an equal amount of the phosphopeptide. The responses were normalized to the peptide density and to the nanobody molecular weight, which allows calculating the fractional occupancy (FO) of the peptide sites (28). At saturation, an FO of one is expected for a 1:1 antibody-antigen molar ratio, while an FO of 0.5 is expected for a homogenous bivalent binding (i.e. 1:2 antibody-antigen molar ratio). As shown in Fig. 4B, the FO of C6B bound to the phosphopeptide was significantly reduced compared to that obtained with C6, indicating that a large proportion of C6B interacts with the antigen in a bivalent

manner. These results, in addition to the slower dissociation rate of C6B observed on the sensorgrams (Fig. 4B), strongly suggest that both VHHs comprising C6B are able to bind to the immobilized phosphopeptide.

To examine if this property of binding by avidity represents an advantage for the detection of γ -H2AX in drug-treated H1299 cells, we performed IF experiments as done above with the monovalent molecules (Fig. 4C). In this case, upon treatment of the cells with H, γ -H2AX foci could be distinguished more clearly than with the monovalent nanobody (compare Fig. 2C and 4C). The same result was obtained with H-treated U2OS cells (fig. S3B), indicating that the bivalent nanobody allows detecting γ -H2AX with high precision in fixed cells. No signal was observed with the C6BM mutant nanobody (Fig. 4C, right panel), which confirms that the staining observed with C6B represents specific binding. Importantly, the staining obtained with C6B is identical to that observed with mAb 3F4 (compare Fig. 4C and fig. S1C), suggesting that bivalent binding is required to be able to visualize discrete amounts of γ -H2AX in cells. To test if C6B could be used as a single-step reagent to detect γ -H2AX foci in fixed cells, we added a cysteine residue in the coding region of C6B between the C-terminus of the second VHH and the E6 tag regions. The purified protein (C6BC) was labelled with Alexa-Fluor 568-maleimide and used in IF. γ -H2AX foci could be distinctly detected and quantified with the fluorescently-labelled C6BC molecules when using different combinations of RS-inducing drugs (Fig. 4D). C6B molecules can also be used for detecting γ -H2AX in transduced cells. Their delivery in H1299 cells by electroporation led to the visualization of foci upon RS induction (Fig. 4E). Almost no signal was detected with C6BM (Fig. 4F and fig. S3D), demonstrating that the specific binding of the bivalent C6 nanobody is maintained within the crowded intracellular context. Collectively, the results show that the possibility of binding through avidity represents an added value for the true detection of γ -H2AX in mammalian cells with the C6 nanobody. We named the C6B nanobody gammaXbody.

An optogenetic strategy enables the visualization of the specific binding of the gammaXbody to γ -H2AX in live cells

To assess whether the gammaXbody could be used in live cells, we modified the previously constructed chromobody to add a second VHH copy thus creating what we called the “chromogammaXbody”. Upon transfection of H1299 cells with this construct, a strong nuclear mCherry signal was observed (Fig. 5A). In contrast to what observed with IF or transduction of the purified nanobody, nuclear staining was also observed in the absence of drug treatment,

indicating a certain degree of unspecific binding. CSK treatment however showed that a large fraction of the fluorescent signal of the chromogammaXbody remained in the nucleus thus representing specific binding events (Fig. 5B). No signal was detectable after CSK treatment in cells transfected with the mutant C6BM-mCherry construct (Fig. 5C), suggesting that the CSK treatment washes away all molecules weakly bound to unspecific targets and retains only the molecules strongly bound specifically to the antigen.

Next, we wished to develop a CSK-treatment-like strategy compatible with live cells that would allow us to retain only the chromogammaXbody- γ -H2AX binding events in the nucleus. We envisaged that the blue light-inducible export system LEXY (23) fused to the chromogammaXbody (Fig. 6A) would allow removing from the nucleus all the molecules not stably bound to γ -H2AX upon blue light exposure (Fig. 6B). LEXY is essentially the second light-oxygen-voltage (LOV) domain of *Avena sativa* phototropin 1 (*AsLOV2*) with a nuclear export signal (NES) embedded within the C-terminal J α helix. In the dark, when the J α helix is folded and bound to the core *AsLOV2* domain, the NES is inaccessible and the chromogammaXbody fused to LEXY should stay in the nucleus. Upon illumination of the cells with blue light, the J α helix unfolds and undocks from the core domain, which leads to the exposure of the NES and its recognition by the endogenous export receptor, CRM-1 (Fig. 6A). We reasoned that, once the NES is exposed, if the binding affinity between the nanobody and its antigen is higher than that between the NES and CRM-1, the C6B-mCherry-LEXY fusion protein should remain nuclear (Fig. 6B, right panel). In the absence of the antigen (i.e. untreated cells) or when the C6B-mCherry-LEXY molecules are not specifically bound to γ -H2AX, nuclear export should occur (Fig. 6B). This should permit the exclusive nuclear export of the unbound and weakly bound molecules, and enable the visualization of the specific binding events in the nucleus. To test this hypothesis, we appended LEXY to the chromogammaXbody and added a nuclear localization signal (NLS) at the N-terminus of the fusion to secure a strong nuclear localization prior to the light application. Following transient transfection of this construct, H1299 cells were either non-treated or treated with H for 40 hours. Only H-treated H1299 cells showed retention of the NLS-C6B-mCherry-LEXY construct in the nucleus after illumination with blue light for 8 minutes (Fig. 6C and 6D, movie S1). Importantly, the same result was obtained when inducing intense RS with G combined with VE-821 (V), which is an inhibitor of ATR and behaves like A promoting the formation of γ -H2AX in combination with gemcitabine (G) (17) (Fig. 6E and 6F), and when transfecting U2OS cells treated with H (fig. S4, A and B). To ascertain that the failed export was not a consequence of the impairment of

the nuclear export machinery due to either H alone or its combination with blue light, we employed the mutated chromogammaXbody harboring C6BM. The NLS-C6BM-mCherry-LEXY fusion proteins were exported from the nucleus upon blue light illumination in both treated and untreated cells (Fig. 6, G and H, and movie S2). As an additional control, we constructed the fusion of the previously described chromatibody (29) (Cb), both in monovalent and bivalent form, with LEXY (fig. S4, E and F). For the bivalent NLS-Cb-mCherry-LEXY construct there was barely any export after illumination of the cells with blue light (fig. S4E), indicating that the affinity of the bivalent Cb (CbB) for the H2A-H2B heterodimer was stronger than that of the NES for CRM-1 and that almost all expressed molecules were specifically bound. The monovalent construct could instead be exported (fig. S4F). In both cases, the treatment with H did not cause any nuclear retention. Interestingly, H seemed to have the opposite effect on Cb than on C6: export of Cb was significantly increased upon RS induction (fig. S4, E and F).

Finally, to visualize γ -H2AX foci in live cells we performed confocal microscopy. In the majority of the analysed H-treated H1299 cells transiently transfected with the NLS-C6B-mCherry-LEXY construct, we detected specific foci that resisted the blue light illumination (fig. S4G). In cells expressing the mutant NLS-C6BM-mCherry-LEXY construct, instead, the fluorescent signal translocated from the nucleus into the cytoplasm upon illumination, and no foci were detected (fig. S4H). Collectively, these results show that γ -H2AX can be visualized in live cells with a bivalent chromobody equipped with an optogenetic element which allows highlighting only its specific binding.

DISCUSSION

The detection of γ -H2AX with antibodies in fixed cells is an established method for assessing RS and/or DNA damage. Due to the lack of methods to follow this PTM in living cells, it is not clear whether it corresponds to a transient state of the chromatin following damage allowing the coordination of responses and recovery upon injury or it is a consequence of the spontaneous strong activation of defined kinases, which is finally reverted by the re-start of DNA replication in cycling cells. Notably, the typical structures observed with antibodies after cell fixation can persist over a long time and it has been shown that this pattern might be of relevance for therapeutic purposes (30). Since upon insult γ -H2AX levels vary from one cell to another, our goal was to obtain a reagent that would be most adequate for monitoring in individual cells both γ -H2AX levels and their fate after treatment with varying doses of genotoxic agents. Because classical antibodies are relatively expensive reagents and cannot diffuse freely into the nucleus upon delivery, we have generated nanobodies that can be advantageously produced in bacteria and that have the intrinsic property to fold stably in a reducing environment (31). Their capacity to diffuse into the nucleus makes them usable as intrabodies in cells following either transduction or transfection.

It is well known that generating nanobodies against small peptides or chemicals is very challenging and might be more difficult than against globular proteins (32, 19). The immunogen used here consisted of a small peptide harboring a phospho-serine linked chemically to a carrier protein. This conjugate was found to be adequate for eliciting a strong anti- γ -H2AX B cell response in mice in a previous work (17). Despite the fact that the titers of the alpaca's sera were pretty high upon collecting the PBMCs, we had to perform numerous selection attempts to isolate one clone that could specifically interact with the peptide used for immunization, confirming that single-domain antibodies cannot easily bind to small linear epitopes. This might also be the reason why another group was unsuccessful in selecting an anti- γ -H2AX nanobody following immunization of a lama with the same peptide (29). It suggests that the main subclass of IgG produced in these animals after immunization with a small peptide are IgG1 molecules that harbor a light chain and not the IgG2 and IgG3 HcAbs that are the source for generating nanobodies. This might be an important consideration for future nanobody generation.

The amino acid composition of the isolated VHH variants minimally differed. Indeed, only two residues in CDR3 were altered, whereas the residues in the two other CDRs were conserved. Interestingly, the 3D structure of the VHH-peptide complex showed that these two residues are

not essential for the interaction with the phosphorylated peptide. It is possible that these alterations reflect the recombination variability that occur during the rearrangement of the V (variable), D (diversity), J (joining) gene segments, which further suggests that the isolated variants originate from a single B cell. Strikingly, the nature of these two residues in CDR3 was found to be critical for the stable folding of the nanobodies upon expression in the bacterial cytoplasm, since clone G2 was almost insoluble compared to C6, for instance (fig. 1S). Whether these small changes within the VHH domain also affect the folding in mammalian cells remains to be tested. Moreover, the 3D structure analysis revealed that both the phosphate group carried by S139 and the C-terminal Y play a preponderant role for recognition, which could explain the observed specific binding of the variants to the phosphopeptide. It has been reported that the C-terminal Y of γ -H2AX can also be phosphorylated and this may trigger cell death signaling (10). Our nanobodies do not bind to a peptide that contains both modifications (i.e. phospho-S139 and phospho-Y142; E. Moeglin, personal communication), indicating that γ -H2AX detected in our experiments following drug treatment is not phosphorylated at the C-terminus. [REDACTED]

It was not surprising that it was necessary to render the nanobody bivalent to detect γ -H2AX without ambiguity. Indeed, several groups have reported that having multiple copies of the VHH coding region enhances binding through avidity (27, 33). This strategy was indeed useful for the identification of the discrete γ -H2AX foci that are formed early after treatment of the cells. It has been reported that these γ -H2AX foci are arranged into nano-domains, called nano-foci, only visible by super-resolution microscopy (34). Thus, if the γ -H2AX molecules are in close proximity in the foci, bivalent binding is possible, thereby precluding the fast dissociation of the bivalent nanobody upon binding to modified chromatin compared to the monovalent molecules. Previously reported alpaca-derived nanobodies recognizing γ -H2AX functioned well *in vitro*, but none of them was able to specifically interact with γ -H2AX in cells. We speculate that this be due to the fact that these nanobodies were expressed as monovalent molecules, thus lacking the bivalency important for stable target binding in the cellular context (22). We proved the binding capacity of the bivalent nanobody to γ -H2AX with different methods, among which treatment of the cells with CSK buffer prior to fixation. This

experiment, which was particularly instrumental for the rapid validation in cells of the binding-defective mutant nanobody that served as reliable negative control, demonstrates that our bivalent nanobody is stably bound to γ -H2AX in cells. It would now be of interest to test whether this stable recognition of γ -H2AX, which is observed even after more than 48 hours of incubation, has an impact on the ability of the cells to recover from drug-induced RS. In particular, we do not know if the gammaXbody is capable of interfering with the cellular response to RS or, more precisely, if masking phosphorylated S139 with the nanobody slows down the action of phosphatases that allow the injured cells to return to their initial state after drug withdrawal.

To our knowledge, this study shows for the first time that γ -H2AX foci can be specifically detected and tracked in living cells. The transduction experiment indicates that γ -H2AX is readily accessible in the nucleus, is not buried into the chromatin and is rather free from interactions with MDC-1, contrary to what was proposed by Rajan and colleagues (22). The images taken after transduction of the purified C6B nanobody into the cells were very similar to those obtained after cell fixation and subsequent antibody incubation, indicating that the localization of γ -H2AX can be scrutinized in the crowded context of live cells in an unbiased way. Interestingly, γ -H2AX was also easily detectable with the chemically-labelled fluorescent C6B nanobody, making it a potential reagent for the quantitative determination in one step of γ -H2AX levels in high-throughput screening assays (15, 35). Although well applicable *in vitro*, the Alexa Fluor-nanobody conjugates formed aggregates in the transduced cells upon prolonged incubation at 37°C, which prompted us to test the performance of the chromogammaXbody. Even though chromobodies have been successfully applied to monitor several intracellular antigens in live cells (36), their overexpression generates in general high background staining, especially when the amount of intracellular target is low. Lower expression levels of the chromobodies, achieved either by reducing their half-lives or by adopting weak promoters to drive their expression, can help overcome this issue allowing for the visualization of endogenous antigens with more confidence (37, 38). We were surprised to observe that our nanobody fused to either eGFP or mCherry re-localizes to the nucleus when expressed in cells upon transfection, even in the absence of any drug treatment. Its preferred localization in this compartment is likely due to overexpression which triggers unspecific binding. To overcome this problem, we have implemented an optogenetic strategy based on the concept of competitive binding in the nucleus. Upon equilibrium, only the nanobodies stably associated to γ -H2AX are resistant to the light-driven nuclear export and remain in the nucleus, because the affinity

between the bivalent C6 and its antigen is stronger than that between CRM-1 and the NES. The molecules loosely bound re-localize in the cytoplasm instead. This selective nuclear export is explained by the fact that the affinity of NES peptides for the CRM/Ran-GTP complexes that promote nuclear export lies generally within the micromolar range (39), while the affinity of our nanobody towards γ -H2AX is in the nanomolar range (fig. S3). In addition, because with this system blue light can be repeatedly applied to control the accumulation of the chromobody in the nucleus, it might be possible to monitor bound chromobodies at different time points over a long period. This new method of discarding unspecific binding in cells via optogenetics is effectively equivalent to an *in vitro* washing step after incubation with antibodies, with the advantage of being fully compatible with live cell imaging. The advantage of a light-inducible over a constitutive NES is that the chromobody has the possibility to accumulate in sufficient amount in the nucleus, where the antigen is, before being exported to reveal only the true binding events. While optogenetically controlled nanobodies have been recently reported whereby an optogenetic component was used to localize the nanobodies to specific cellular localization upon exposure of the cells to light (40) or to activate/inhibit the binding capacity of the nanobodies with light (41), these methods are conceptually very different from the one developed here, as they are not used to wash away the unbound fraction but rather to spatially confine the activity of the nanobodies.

In conclusion, the gammaXbody and the optogenetic strategy presented here will pave the way to reliably study the dynamics of γ -H2AX in individual cells, possibly coupled with super-resolution imaging, under a variety of conditions and in response to genotoxic stimuli in particular. Moreover, we believe that this approach can be applied to the tracking of numerous other nuclear proteins and PTMs.

MATERIALS AND METHODS

VHH libraries and phage selection

Alpacas (*Llama pacos*) were immunized at days 0, 21 and 35 with the synthetic phosphorylated peptide CKATQA(p)SQEY corresponding to the C-terminus of H2AX after covalent cross-linking to ovalbumin (150 µg). The immunogen was mixed with Freund complete adjuvant for the first immunization and with Freund incomplete adjuvant for the following immunizations. The immune response was monitored by titration of serum samples by ELISA with immunizing peptide on plate. Bound antibodies were detected with anti-alpaca rabbit IgG (42). For the construction of the libraries, blood samples (200 ml) of the immunized animals were collected under strict veterinary control and the PBMCs were isolated by Ficoll gradient centrifugation (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France). For the preparation of total RNA, approximately 10^7 cells were lysed with the TRIzol reagent (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA). Complementary DNA (cDNA) was amplified using either SuperScript IV reverse transcriptase (ThermoFischer Scientific) or the BD Smart RACE kit (BD Biosciences). The VHH repertoires were amplified from the cDNA by two successive PCR reactions using 3 different primer pairs (PCR1, PCR2; Table S2) and the VHH fragments were cloned into the SfiI/NotI restriction sites of the pHEN1 phagemid vector. After transformation into either *E. coli* TG1 or XL1-blue cells by electroporation, the bacterial colonies (approximately 4×10^7 independent transformants per library) were infected with M13KO7 helper phage to produce the phage libraries. The recombinant phages of each library were purified by PEG 8,000/NaCl precipitation and aliquots were stored at -80°C after addition of 15% glycerol. Biopanning was performed with the phosphopeptide (0.5-5 µg/ml) coated on microtiter wells (ThermoFisher Scientific). Briefly, approximately 10^{11} phages in PBS containing 5% nonfat-dried milk were added to uncoated wells for 1 h and subsequently transferred to the peptide-coated wells. After incubation at 20°C for 1 hour, the wells were extensively washed with PBS containing 0.05% Tween 20. Bound phages were eluted with trypsin and amplified in growing TG1 cells for the next round of selection. The amount of phosphopeptide coated on plate was lowered to 0.5 µg/ml in the second round of selection. Phage titers and enrichment after each panning round were determined by infecting TG1 cells with 10-fold serial dilutions of the collected phages and plating on LB agar plates containing 100 µg/mL ampicillin and 1% glucose. Where indicated, binding of the phages to antigen on plate was revealed with an anti-M13 monoclonal antibody conjugated to horse radish peroxidase (HRP; Abcam, Cambridge, UK). The VHH

nucleotide sequences were determined using the M13-RP primer (GATC-Eurofins, Ebersberg, Germany).

VHH engineering and bacterial production

The coding region of the selected VHHs in the pHEN1 vector were amplified by PCR with primers VHH-BspHI-Deg and VHH-NotI-short and subcloned into the pET-E6T-6H expression plasmid, a derivative of pETOM (43), which contains in frame at the NotI site the E6 epitope tag recognized by the 4C6 mAb and a His6 tag. To generate the bivalent VHH constructs, the coding region of the VHH was amplified by SOE-PCR with the primer pairs pETOM-For/G4S-Rev and G4S-For/E6T-Rev. The G4S-Rev and G4S-For are the annealing primers to add the (G4S)₃ linker region. The recombinant fragment was cloned into the NcoI-digested pET-E6T-6H plasmid after digestion with NcoI restriction enzyme, thus generating pET-C6B-E6T-6H. [REDACTED]

[REDACTED] The resulting PCR fragment was sub-cloned into the NcoI/NotI-digested pET-C6-E6T-6H to obtain pET-C6M-E6T-6H. The plasmid pET-C6BM-E6T-6H, which encodes the bivalent form of the mutated C6 coding region was constructed as described above. The additional Cys residue in the coding region of the bivalent C6 was obtained by amplification of the C6 coding region with primers VHH-BspHI-For and C6-Cys-Rev and sub-cloning into the pET-C6B-E6T-6H. All primers used to generate the above described plasmids are listed in Table S2.

The VHH variants were expressed in *E. coli* BL21(DE3) plysS cells by addition of IPTG (1 mM) and incubation overnight at 20°C. The expressed polypeptides were purified as previously described (43), except that IMAC chromatography was performed on a HITRAP™ IMAC HP 1ml column (GE Healthcare) loaded with nickel ions. The C6 variants with a cysteine residue at the C-terminal end of the second VHH coding region were purified on HIS TRAP™ Excel columns (GE Healthcare) in the presence of 2 mM TCEP. All buffers used in the process were supplemented with 1 mM EDTA and 0.2 mM PMSF. Where indicated, the eluted samples were further purified by size exclusion chromatography on a Superdex 75 10/300 GL column equilibrated in 20 mM Hepes buffer pH 7.2 containing 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF and 2 mM TCEP (optional).

ELISA

For the ELISA assays, microtiter wells (ThermoFisher Scientific) were coated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of phosphorylated or non-phosphorylated peptide CKATQASQEY in PBS overnight at 4°C. The purified VHH preparations were diluted in PBS containing 0.2 % non-fat dried milk and following incubation at RT for 1 hour they were revealed with mAb 4C6 and subsequent addition of HRP- conjugated rabbit anti-mouse IgG (GE Healthcare). After several washes with PBS containing 0.1% NP40 and addition of 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich), the optical density was measured at 450 nm in an ELISA reader. The data were processed with R software using the *drc* package (44).

SPR analysis

All experiments were performed on a Biacore T200 instrument at 25°C in HBS-P buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% P20 surfactant. The phosphopeptide CKATQA(p)SQEY was immobilized on the biosensor surface (BR-1005-30; GE healthcare) through the SH group of the N-terminal cysteine using thiol coupling chemistry. The reference surface was treated similarly except that peptide injection was omitted. The purified VHH samples were serially injected in duplicate for 120 seconds over reference and peptide surfaces. Each sample injection was followed by a wash with HBS-P buffer during 600 sec. Sensorgrams were corrected for signals from the reference flow cell as well as after running buffer injections. The K_d was determined by fitting the equilibrium response (R_{eq}) versus the concentration curve to a 1:1 interaction model with the Biacore 2.0.2 evaluation software (GE Healthcare). Responses were normalized relative to phosphopeptide density as fractional occupancy (FO) of target sites (28).

3D structure determination

Purified C6 protein was incubated for 1 hour with a 1.3-fold excess of phosphopeptide treated with 2 mM N-ethyl maleimide to prevent dimerization. The complexes were subjected to size exclusion chromatography on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Hepes buffer pH 7.2, 150 mM NaCl. The peak fractions were concentrated to 5.1 mg/ml with a Amicon Ultra 3K filter (Merck-Millipore). The crystallization experiments were carried out by the sitting-drop vapor diffusion method at 20°C using a Mosquito Crystal dispensing robot (TTP Labtech) for mixing equal volumes (200 nL) of the C6-peptide sample

and reservoir solutions in 96-well 2-drop MRC crystallization plates (Molecular Dimensions). Crystallization conditions were tested using commercially available screens (Qiagen, Molecular Dimensions). Several wells were found positive after about 1 week of incubation and crystals obtained with 25% PEG 3350, 0.2M sodium acetate. The crystals were transferred to 35% PEG 3350, 0.2M sodium acetate before being flash cooled in liquid nitrogen. The data were collected at the Proxima 2A beamline of the synchrotron Soleil at a wavelength 0.98 Å (12.65 keV) on an EIGER X 9M detector (Dectris) with 20% transmission. 360° of data were collected using 0.1° oscillation and 0.025 s exposure per image, with a crystal to detector distance of 134.25 mm. The data were indexed, integrated, and scaled using XDS (45). The 3D structure of the C6/phosphopeptide complex was solved by molecular replacement using the PHASER module of PHENIX (46) with the structure of VHH PorM_01 (PDB ID: 5LZ0) edited to remove water molecules and the CDR loops, being used as a search model. Refinement was performed using the refine module of PHENIX (46) followed by iterative model building in COOT (47). The structural figures were prepared with Chimera-X software (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>).

Cell culture, transduction and histone preparation

The H1299, HeLa and U2OS cells (laboratory stocks) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's tissue culture medium (DMEM; Life Technologies, Carlsbad, USA) supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 µg/mL) and 10% heat inactivated foetal calf serum at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Fresh cells were thawed from frozen stocks after 10 passages and mycoplasma contamination was tested by DAPI staining. For the optogenetic experiments, H1299 and U2OS cells were cultivated in RPMI 1640 and phenol red-free DMEM medium (Life Technologies), respectively, both supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 1% (v/v) penicillin and 1% (v/v) streptomycin. Where indicated, the cells were treated with either hydroxyurea (H; 2 mM), gemcitabine (G; 0.1 µM), AZD-7762 (A; 0.1 µM), clofarabine (C; 0.3 µM), triapine (T; 2 µM), VE-821 (V; 1 µM) or combinations of two drugs at the same concentration as indicated. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich. Transduction experiments with purified C6 or Fab 3F4 were performed essentially as previously described (25). Briefly, 10⁵ cells in PBS were mixed with the protein sample (2 µg) and subjected to electroporation (1550 V, 10 msec, 3 pulses) using the Neon transfection device (Life Technologies). The treated cells were allowed to recover overnight in complete medium without antibiotics before addition of the drugs. For

the purification of the histone proteins, the harvested cells (approximately 10^7 /ml) were lysed for 10 minutes at 4°C in PBS supplemented with 0.5 % Triton X100, 2 mM PMSF, 0.02 % NaN₃ and 1 mM Na₃VO₄. After centrifugation for 10 minutes at 6500 g at 4°C, the recovered nuclei were acid extracted overnight at 4°C in 0.2 M HCl. The histone proteins present in the clarified lysate were stored at -20°C.

Plasmid construction for experiments in mammalian cells

The pβA-scFv-eGFP, a derivative of pDRIVE-hβ-actin (48), was modified by PCR to insert in frame to the scFv the E6 tag and the mCherry protein using E6T-HindIII-For/E6T-HindIII-Rev and mCherry-For/mCherry-Rev primer pairs, respectively. This vector which carries unique NcoI and SpeI restriction sites was used to sub-clone the VHH variants as described above, thereby generating pβA-C6-E6T-mCherry, pβA-C6M-E6T-mCherry, pβA-C6B-E6T-mCherry and pβA-C6BM-E6T-mCherry. The pβA-C6B-E6T-NES-mCherry plasmid was generated by inserting the annealed oligonucleotides NESPKIa-HindIII-For and NESPKIa-HindIII-Rev into the unique HindIII restriction site of pβA-C6B-E6T-mCherry. All oligonucleotides used to construct these expression vectors are listed in Table 2S.

To construct pcDNA3.1-NLS-C6B-mCherry-LEXY bearing the fusion between two copies of the C6 nanobody (C6B), mCherry and LEXY, we first PCR-amplified the coding sequence of one copy of the C6 nanobody from plasmid pβA-C6B-E6T-mCherry using primers CM01 and CM02, then the coding sequence of the second copy of the C6 nanobody plus the preceding linker region using primers CM03 and CM04 and the destination vector pNLS-LEXY (23) without the *ccdb* gene with primers CM05 and CM06, and then ligated the three fragments via Gibson assembly at 3:7:1 ratio. Plasmid pcDNA3.1-NLS-C6BM-mCherry-LEXY was created following the same procedure by PCR-amplifying the coding sequence from plasmid pβA-C6BM-E6T-mCherry with primers CM07 and CM08. To clone pCDNA3.1-NLS-C6-mCherry-LEXY bearing the fusion between one copy of the C6 nanobody, mCherry and LEXY, we first PCR-amplified the coding sequence of one copy of the C6 nanobody from plasmid pCDNA3.1-NLS-C6B-mCherry-LEXY using primers CM09 and CM10, as well as the destination vector pNLS-LEXY without the *ccdb* gene with primers CM05 and CM06, and then ligated the two fragments via Gibson assembly. To clone pCDNA3.1-NLS-CbB-mCherry-LEXY bearing the fusion between two copies of the chromatibody (Cb), mCherry and LEXY, we first PCR-amplified the coding sequence of the two copies of Cb separated by a linker from plasmid pβA-Cb-E6T-EGFP using primers JR01 and JR02 for the first copy of Cb, and primers JR03 and

JR04 for the second copy, as well as the destination vector pNLS-LEXY without the *ccdb* gene using primers JR05 and JR06, and then ligated the three fragments via Gibson assembly at 5:5:1 ratio. To clone pCDNA3.1-NLS-Cb-mCherry-LEXY bearing the fusion between one Cb copy, mCherry and LEXY, we PCR-amplified the coding sequence of Cb from pEGFP-C1-chromatibody (29) with primers CM11 and CM12 that included the BbsI restriction enzyme cutting site. We then digested the destination vector pNLS-LEXY and the insert with BbsI and then ligated the two fragments together with T4 ligase. To clone pDNA3.1-NLS-C6-Cb-mCherry-LEXY bearing the fusion between one copy of the C6 nanobody, one copy of the Cb, mCherry and LEXY, we first PCR-amplified the coding sequence of one copy of the nanobody and one copy of the Cb from plasmid p β A-CbB-E6T-EGFP with primers JR07 and JR08, as well as the destination vector pNLS-LEXY without the *ccdb* gene with primers JR09 and JR10, and then ligated the two fragments via Gibson assembly at 5:1 ratio. In all cloning procedures, PCRs were performed using Phusion Flash DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) followed by agarose gel electrophoresis to analyze PCR products. Bands of the expected size were cut out from the gel, and the DNA was purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Following Gibson assembly, the plasmids were transformed into chemically competent TOP10 cells. Plasmid extraction and purification was carried out using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). All oligonucleotides used for the generation of the constructs with the LEXY element are listed in Table S3.

Transient transfection

The day before transfection, 8×10^4 cells were plated in 12-well culture plates containing glass coverslips. Transient DNA transfection was performed using jetPRIME (Polyplus Transfection, Illkirch, France) according to manufacturer's instructions. The culture medium was replaced with fresh medium after 4 hour of incubation with the polymer/plasmid mixtures. For optogenetic experiments, the cells were seeded into 8-well slides (IBIDI, Martinsread, Germany) at densities of 2×10^4 cells per well. The following day, cells were transfected with 100 ng total DNA using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. After 5-7 hours, the transfection medium was removed, cells were washed once with PBS, and fresh medium was added. Cells were incubated (37°C, 5% CO₂) for 40 hours (H-treated cells) or 24 hours (G+V-treated cells), followed by microscopic analysis.

Immunofluorescence microscopy

For the analysis by classical immunofluorescence microscopy, the transfected or transduced cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and, after permeabilization with 0.2% Triton X100 for 5 min, they were incubated with mAb 3F4 or VHH preparations diluted in PBS containing either 10% fetal calf serum or 3% BSA. Where indicated, the cells were treated with CSK-100 modified buffer (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 6.8, 1 mM EGTA, and 0.2% Triton X-100) for 5 minutes prior to fixation. The VHH molecules were revealed by addition of mAb 4C6 which binds to the E6 tag and bound antibodies were detected with Alexa Fluor 488 or 568 labelled-anti-mouse immunoglobulins (Life Technologies). Where indicated, Alexa 568 labelled-C6B molecules were used. The labelling of the purified bivalent C6 equipped with a cysteine residue at the C-terminus was performed essentially as previously described (30). Briefly, purified protein in 0.1 M KH₂PO₄ pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose was mixed with an equimolar amount of Alexa Fluor 568 maleimide derivative (ThermoFisher Scientific). After 1 hour of incubation at room temperature and subsequent addition of N-ethylmaleimide in excess to block the chemical reaction, the mixture was centrifuged through a Zeba spin column with a cut-off of 7 kDa. The amount of fluorophore per bivalent C6 in the flow-through was calculated by spectrophotometry with a Nanodrop 200 device (ThermoFisher Scientific). After incubation of the cells with the different reagents and several washes with PBS, the coverslips were mounted with 4',6'-diamino-2-phenyl-indole (DAPI) Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) and imaged with a Leica DM5500 microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with 20X and 63X objectives. The signal was recorded with a Leica DFC350FX camera. Confocal microscopy was performed as previously described (18). All microscopy images were processed using the Fiji/Image J software. For the measurement of the nuclear fluorescence intensity, the images of microscopy fields were acquired with the 20X objective. The nuclei were set with the DAPI channel acquisition as regions of interest (ROI) and the mean fluorescence intensity in each ROI was measured using the Fiji built-in-tool and data were processed with the R software.

Optogenetic experiments

Epifluorescence microscopy was performed using an inverse Zeiss Axio Observer.Z1/7, equipped with a motorized stage and a dark incubation chamber. Images were acquired at 5% CO₂ and 37 °C using a × 63/1.40 OIL DIC Plan-Apochromat objective (Zeiss). For blue light irradiation as well as imaging of EGFP, the 38 HE filter set (Zeiss; excitation 470/40, dichroic FT 495, emission 525/50) was used. mCherry was imaged using the 43 HE filter set (Zeiss;

excitation 550/25, dichroic FT 570, emission 605/70). Cells were focused in the mCherry channel, thereby avoiding white light irradiation before imaging. Time-lapse microscopy was performed applying automated imaging time courses. mCherry images were taken every 30 s. Activation of LEXY was achieved taking an image in the GFP channel (150 ms exposure time and 5% light intensity) every 30 s for 8 min. An mCherry image (1 second exposure time and 2.5% light intensity) was taken before each blue light pulse. Microscopic images were processed with ImageJ. Nuclear mCherry intensities were evaluated by drawing a region of interest (ROI) in the nucleus and by measuring the median fluorescence intensity of the ROI. For experiments with constructs containing the C6 nanobody, the ROI encompassed the whole nucleus, while for experiments using constructs containing Cb, three independent ROIs were drawn. Three independent ROIs were additionally drawn in areas of the image deprived of cells to measure the background signal as the mean of the values in the three ROIs. Values, which represent the mean of three independent experiments, were normalized to the value at time $t = 0$ sec.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Excel software (Microsoft, version 16.16.22). Averages are represented as means \pm SD and the number of replicates is indicated in the figure legends. The statistical significance of the data obtained with the drug combinations (Figure 4) and with opto-genetically controlled export (Figure 6) was determined with the Student's t test and indicated as * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 and **** p -value < 0.0001 . In the boxplots (Figures 2, 3 and 4), the bars indicate the median and interquartile range of the recorded fluorescence after processing with R software version 3.1.2.

REFERENCES

1. S. R. Bhaumik, E. Smith, A. Shilatifard, Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1008–1016 (2007).
2. B. Biterge, R. Schneider, Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* **356**, 457–466 (2014).
3. D. Corujo, M. Buschbeck, Post-Translational Modifications of H2A Histone Variants and Their Role in Cancer. *Cancers* **10**, 59 (2018).
4. T. Ubhi, G. W. Brown, Exploiting DNA Replication Stress for Cancer Treatment. *Cancer Res.* **79**, 1730–1739 (2019).
5. M. E. Gagou, P. Zuazua-Villar, M. Meuth, Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 739–752 (2010).
6. J. Ji, Y. Zhang, C. E. Redon, W. C. Reinhold, A. P. Chen, L. K. Fogli, S. L. Holbeck, R. E. Parchment, M. Hollingshead, J. E. Tomaszewski, Q. Dudon, Y. Pommier, J. H. Doroshov, W. M. Bonner, M. S.-Y. Huen, Ed. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PLOS ONE* **12**, e0171582 (2017).
7. M. Podhorecka, A. Skladanowski, P. Bozko, H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucl. Acids* **2010**, 1–9 (2010).
8. A. N. Blackford, S. P. Jackson, ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell.* **66**, 801–817 (2017).
9. S. Fu, Y. Yang, D. Tirtha, Y. Yen, B. Zhou, M.-M. Zhou, M. Ohlmeyer, E. C. Ko, R. Cagan, B. S. Rosenstein, S. Chen, J. Kao, N. Cordes, Ed. γ -H2AX Kinetics as a Novel Approach to High Content Screening for Small Molecule Radiosensitizers. *PLOS ONE* **7**, e38465 (2012).
10. P. J. Cook, B. G. Ju, F. Telese, X. Wang, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**, 591–596 (2009).
11. G. Coster, M. Goldberg, The cellular response to DNA damage: A focus on MDC1 and its interacting proteins. *Nucleus* **1**, 166–178 (2010).
12. T. Nikolova, M. Dvorak, F. Jung, I. Adam, E. Krämer, A. Gerhold-Ay, B. Kaina, The γ H2AX Assay for Genotoxic and Nongenotoxic Agents: Comparison of H2AX Phosphorylation with Cell Death Response. *Toxicol. Sci.* **140**, 103–117 (2014).
13. U. Plappert-Helbig, S. Libertini, W. Friauff, D. Theil, H.-J. Martus, Gamma-H2AX

- immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity *in vivo*: Gamma-H2AX Tissue-specific Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**, 4–16 (2019).
14. C. E. Redon, U. Weyemi, P. R. Parekh, D. Huang, A. S. Burrell, W. M. Bonner, γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 743–756 (2012).
 15. B. Kopp, L. Khoury, M. Audebert, Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch. Toxicol* **93**, 2103–2114 (2019).
 16. P. Johansson, A. Muslimovic, R. Hultborn, E. Fernström, O. Hammarsten, In-solution staining and arraying method for the immunofluorescence detection of γ H2AX foci optimized for clinical applications. *BioTechniques* **51**, 185–9 (2011).
 17. E. Moeglin, D. Desplancq, S. Conic, M. Oulad-Abdelghani, A. Stoessel, M. Chipier, M. Vigneron, P. Didier, L. Tora, E. Weiss, Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress. *Cancers* **11**, 355 (2019).
 18. S. Conic, D. Desplancq, A. Ferrand, V. Fischer, V. Heyer, B. Reina San Martin, J. Pontabry, M. Oulad-Abdelghani, K. Babu N., G. D. Wright, N. Molina, E. Weiss, L. Tora, Imaging of native transcription factors and histone phosphorylation at high resolution in live cells. *J. Cell Biol.* **217**, 1537–1552 (2018).
 19. T. Li, M. Vandesquille, F. Koukouli, C. Duffeffant, I. Youssef, P. Lenormand, C. Ganneau, U. Maskos, C. Czech, F. Grueninger, C. Duyckaerts, M. Dhenain, S. Bay, B. Delatour, P. Lafaye, Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Control. Release* **243**, 1–10 (2016).
 20. B.-M. Keller, J. Maier, M. Weldle, S. Segan, B. Traenkle, U. Rothbauer, A Strategy to Optimize the Generation of Stable Chromobody Cell Lines for Visualization and Quantification of Endogenous Proteins in Living Cells. *Antibodies* **8**, 10 (2019).
 21. T. Uchański, E. Pardon, J. Steyaert, Nanobodies to study protein conformational states. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **60**, 117–123 (2020).
 22. M. Rajan, O. Mortusewicz, U. Rothbauer, F. D. Hastert, K. Schmidhals, A. Rapp, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, Generation of an alpaca-derived nanobody recognizing γ -H2AX. *FEBS Open Bio* **5**, 779–788 (2015).
 23. D. Niopek, P. Wehler, J. Roensch, R. Eils, B. Di Ventura, Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat. Commun.* **7**, 10624 (2016).
 24. S. Muyldermans, Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 775–797 (2013).
 25. G. Freund, A.-P. Sibling, D. Desplancq, M. Oulad-Abdelghani, M. Vigneron, J. Gannon, M.

- H. Van Regenmortel, E. Weiss, Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *mAbs* **5**, 518–522 (2013).
26. P. Panza, J. Maier, C. Schmees, U. Rothbauer, C. Sollner, Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. *Development* **142**, 1879–1884 (2015).
27. E. Beirnaert, A. Desmyter, S. Spinelli, M. Lauwereys, L. Aarden, T. Dreier, R. Loris, K. Silence, C. Pollet, C. Cambillau, H. de Haard, Bivalent Llama Single-Domain Antibody Fragments against Tumor Necrosis Factor Have Picomolar Potencies due to Intramolecular Interactions. *Front. Immunol.* **8**, 867 (2017).
28. G. Zeder-Lutz, L. Choulier, M. Besse, A. Cousido-Siah, F. X. R. Figueras, B. Didier, M.-L. Jung, A. Podjarny, D. Altschuh, Validation of surface plasmon resonance screening of a diverse chemical library for the discovery of protein tyrosine phosphatase 1b binders. *Anal. Biochem.* **421**, 417–427 (2012).
29. D. Jullien, J. Vignard, Y. Fedor, N. Béry, A. Olichon, M. Crozatier, M. Erard, H. Cassard, B. Ducommun, B. Salles, G. Mirey, Chromatibody, a novel non-invasive molecular tool to explore and manipulate chromatin in living cells. *J. Cell Sci.* **129**, 2673–2683 (2016).
30. M. S. Siddiqui, M. François, M. F. Fenech, W. R. Leifert, Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **766**, 1–19 (2015).
31. T. Pleiner, M. Bates, S. Trakhanov, C.-T. Lee, J. E. Schliep, H. Chug, M. Böhning, H. Stark, H. Urlaub, D. Görlich, Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *eLife* **4**, e11349 (2015).
32. M. Arbabi-Ghahroudi, Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Front. Immunol.* **8**, 1589 (2017).
33. S. Albert, C. Arndt, S. Koristka, N. Berndt, R. Bergmann, A. Feldmann, M. Schmitz, J. Pietzsch, J. Steinbach, M. Bachmann, From mono- to bivalent: improving theranostic properties of target modules for redirection of UniCAR T cells against EGFR-expressing tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* **9**, 25597–25616 (2018).
34. F. Natale, A. Rapp, W. Yu, A. Maiser, H. Harz, A. Scholl, S. Grulich, T. Anton, D. Hörl, W. Chen, M. Durante, G. Taucher-Scholz, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, Identification of the elementary structural units of the DNA damage response, *Nat. Commun.* **8**, 15760 (2017).
35. D. Heylmann, B. Kaina, The γ H2AX DNA damage assay from a drop of blood. *Sci. Rep.* **6**, 22682 (2016).
36. B. Traenkle, U. Rothbauer, Under the Microscope: Single-Domain Antibodies for Live-Cell Imaging and Super-Resolution Microscopy. *Front. Immunol.* **8**, 1030 (2017).
37. B.-M. Keller, J. Maier, K.-A. Secker, S.-M. Egetemaier, Y. Parfyonova, U. Rothbauer, B.

- Traenkle, Chromobodies to Quantify Changes of Endogenous Protein Concentration in Living Cells. *Mol. Cell. Proteomics* **17**, 2518–2533 (2018).
38. L. Keller, N. Bery, C. Tardy, L. Ligat, G. Favre, T. H. Rabbitts, A. Olichon, Selection and Characterization of a Nanobody Biosensor of GTP-Bound RHO Activities. *Antibodies* **8**, 8 (2019).
39. R. T. Behrens, M. Aligeti, G. M. Pocock, C. A. Higgins, N. M. Sherer, F. Kirchhoff, Ed. Nuclear Export Signal Masking Regulates HIV-1 Rev Trafficking and Viral RNA Nuclear Export. *J. Virol.* **91**, e02107-16, e02107-16 (2017).
40. T. A. Redchuk, M. M. Karasev, P. V. Verkhusha, S. K. Donnelly, M. Hülsemann, J. Virtanen, H. M. Moore, M. K. Vartiainen, L. Hodgson, V. V. Verkhusha, Optogenetic regulation of endogenous proteins. *Nat. Commun.* **11**, 605 (2020).
41. A. A. Gil, C. Carrasco-López, L. Zhu, E. M. Zhao, P. T. Ravindran, M. Z. Wilson, A. G. Goglia, J. L. Avalos, J. E. Toettcher, Optogenetic control of protein binding using light-switchable nanobodies. *Nat. Commun.* **11**, 4044 (2020).
42. P. Lafaye, I. Achour, P. England, C. Duyckaerts, F. Rougeon, Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid β , prevent A β -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol. Immunol.* **46**, 695–704 (2009).
43. D. Desplancq, A.-S. Rinaldi, A. Stoessel, A.-P. Sibler, D. Busso, M. Oulad-Abdelghani, M. H. Van Regenmortel, E. Weiss, Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *J. Immunol. Methods* **369**, 42–50 (2011).
44. C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig, D. Gerhard, Y. Xia, Ed. Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE* **10**, e0146021 (2015).
45. W. Kabsch, *XDS*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
46. D. Lieschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L.-W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito, O. V. Sobolev, D. H. Stockwell, T. C. Terwilliger, A. G. Urzhumtsev, L. L. Videau, C. J. Williams, P. D. Adams, Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **75**, 861–877 (2019).
47. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of *Coot*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
48. A.-S. Rinaldi, G. Freund, D. Desplancq, A.-P. Sibler, M. Baltzinger, N. Rochel, Y. Mély, P. Didier, E. Weiss, The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living

cancer cells. *Exp. Cell Res.* **319**, 838–849 (2013).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Mirey for the generous gift of the pEGFP-C1-chromatibody plasmid, S. Conic for assistance with the confocal microscopy, D. Krischke for assistance with cloning, Serena Sirigu for assistance in using beamline Proxima 2A and P. Poussin-Courmontagne for the crystallization screen. We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities (proposal ID 20181001). We thank R. Grosse and L. Tora critical reading of the manuscript. We are grateful to L. Tora for interesting discussions.

Funding: This work was supported by EUCOR-The European Campus (Seed Money #22), the Ligue Régionale contre le Cancer (Comité du Haut-Rhin), the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI (ANR-10-INBS-05), the Instruct-ERIC and Instruct-ULTRA infrastructure of EU Horizon 2020 (grant ID 731005), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Strasbourg. E.M. was founded by a MENESR fellowship.

Author contributions: E.W. and B.D.V. conceived the study, E.M., D.D., C.M. and J.R. performed most of the experiments; A.S., M.O-A., M.C. and P.L. constructed the VHH libraries and performed the VHH selections, A.G.M and A.P. solved the 3D structure; G.Z.-L. analyzed the SPR data. E.W. and B.D.V. supervised the work and wrote the manuscript.

Conflicts of interest: the authors declare no competing interests.

Data availability: the data of the 3D structure of the C6 nanobody have been deposited to the PDB (PDB ID 6ZWK). Additional data related to this paper may be requested from E.W.

FIGURES

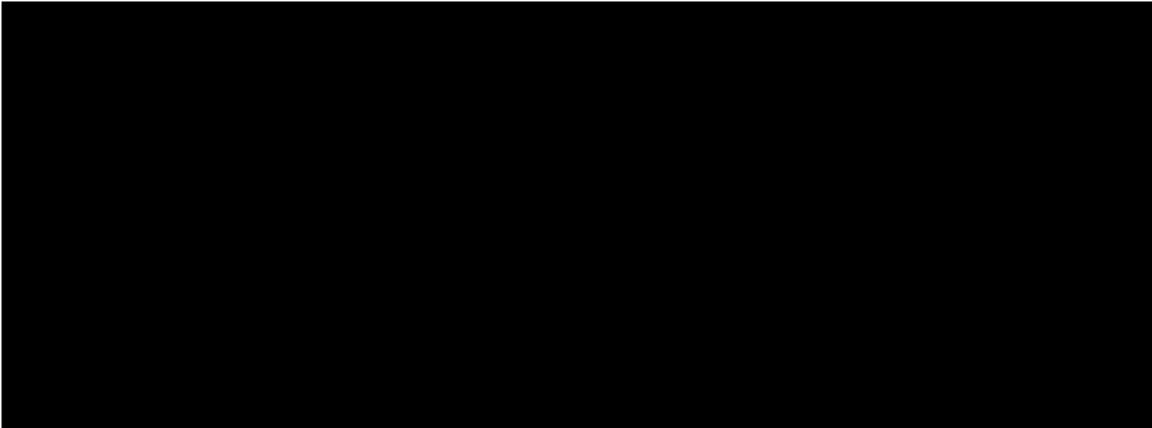
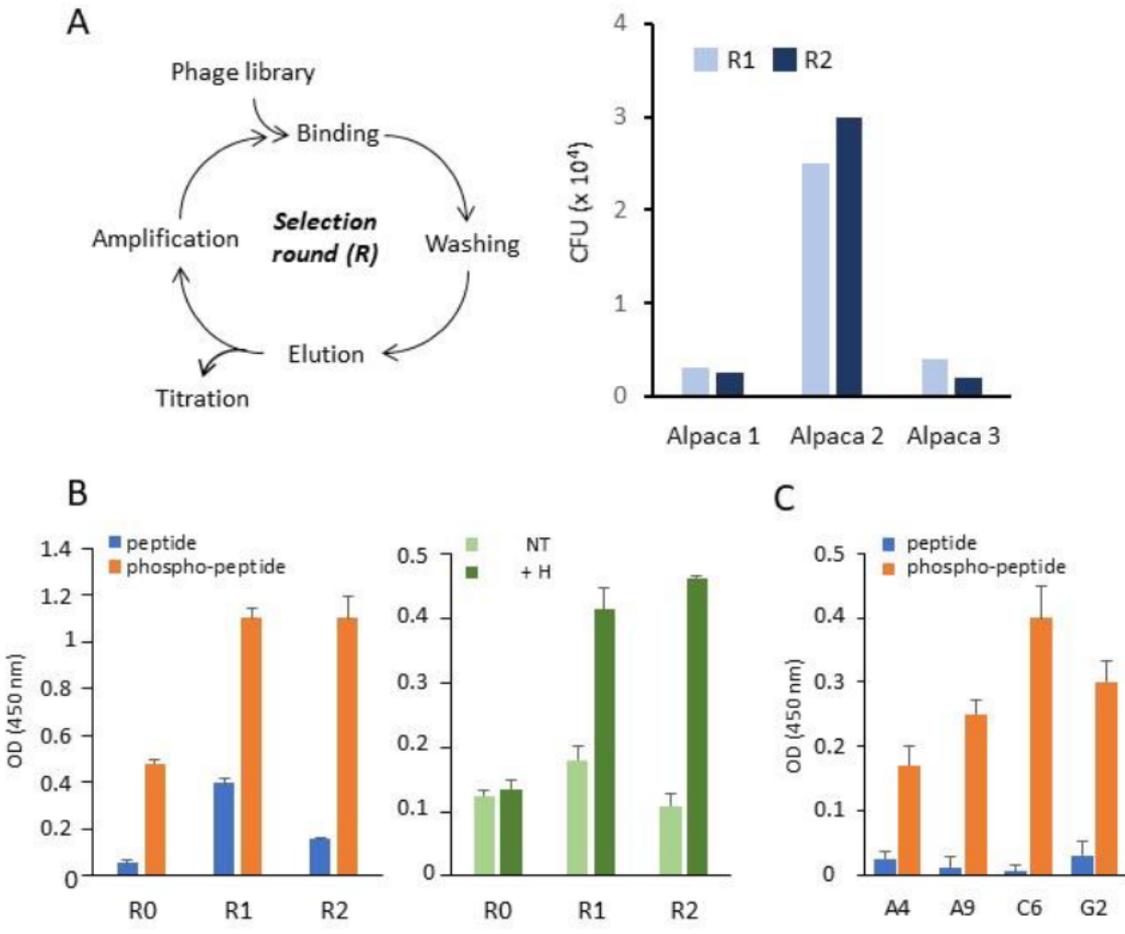


Fig. 1: Development and selection of specific anti- γ -H2AX nanobodies. **(A)** Schematic representation of a phage display selection round (left). The histogram on the right shows the number of phages retained on plate after 2 rounds of selection with 3 different libraries issued from PBMCs of individual animals. **(B)** The specific binding capacity of the phages selected from the library 2 were assayed by phage-ELISA with either peptides as indicated (left) or histones extracted from H-treated or untreated (NT) cells (right), both immobilized on plate. **(C)** Four individual VHH-phages identified by sequencing (A4, A9, C6 and G2) were subjected to phage-ELISA. Their specific binding to either the non-phosphorylated (peptide) or the phosphorylated (phosphopeptide) H2AX C-terminal peptide is shown. Bound phages were revealed with an HRP-labelled anti-M13 conjugate (Materials and Methods). **(D)** The sequences of clones A4, A9, C6 and G2 are aligned based on homology, according to the Kabat numbering system. The residues highlighted in yellow correspond to the CDR residues. Residues 114 to 125 are part of the hinge region. The R residues at positions 100C and 100D are shown in bold and the R residue indicated with an arrow is a hallmark residue of the VHH variable domain.

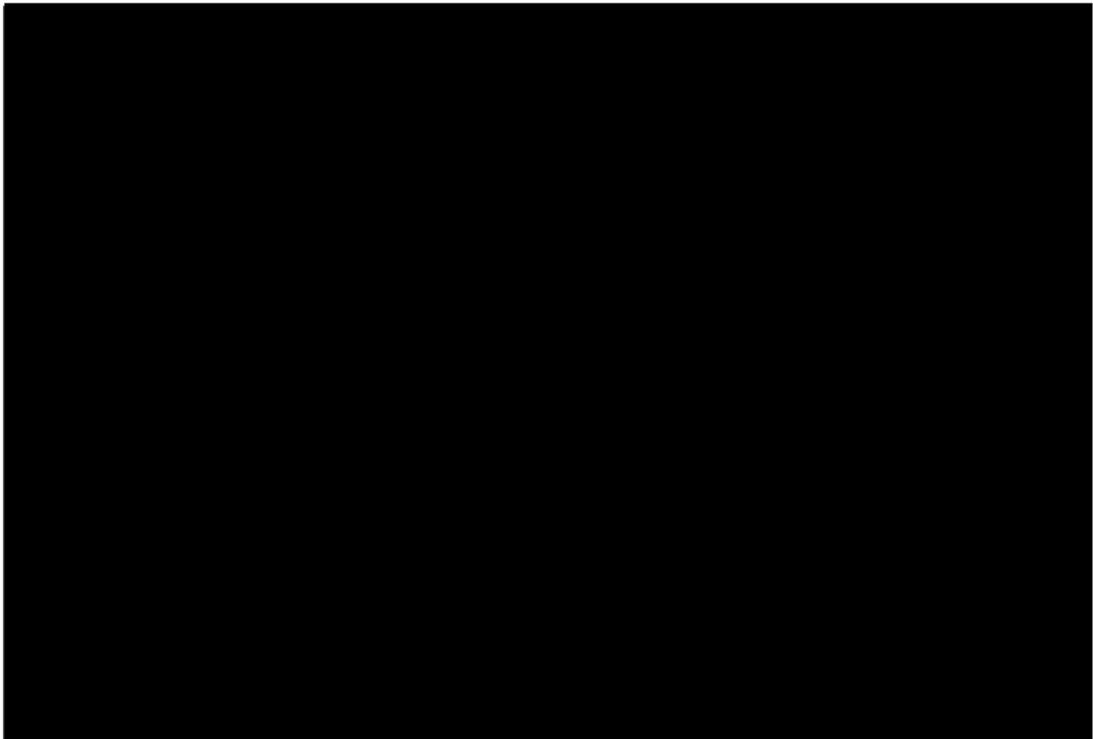
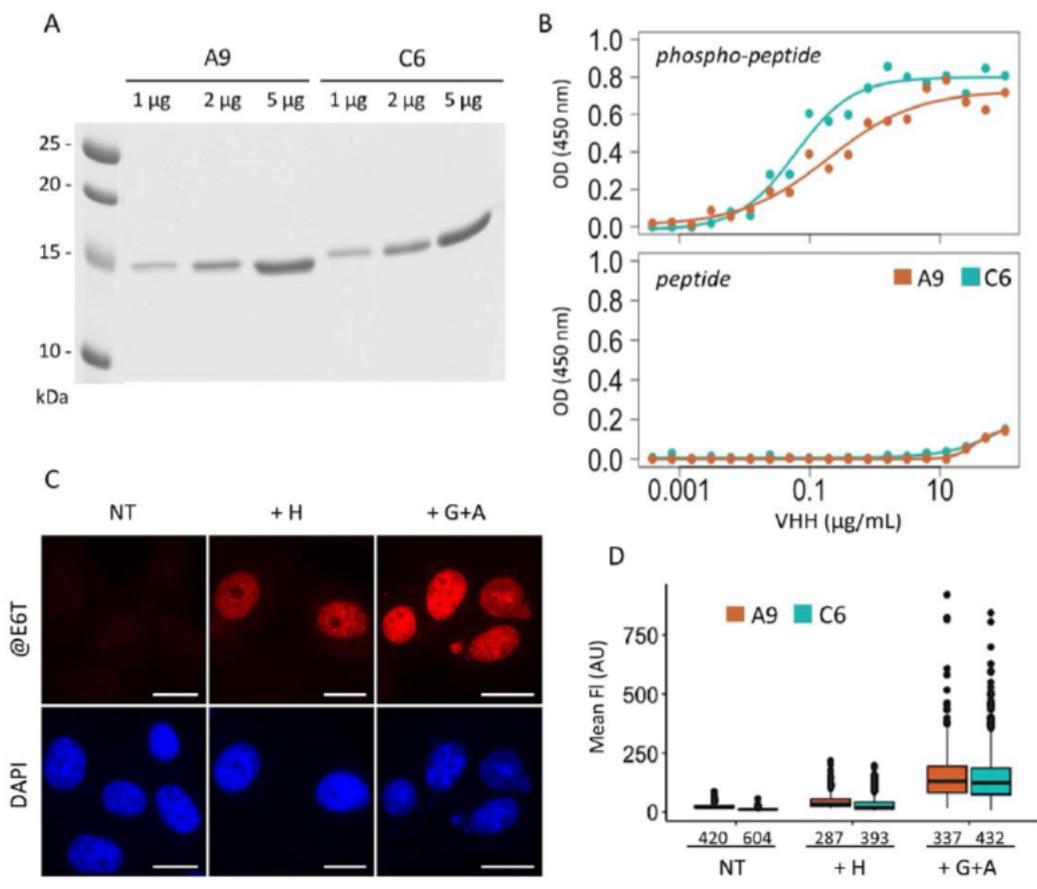


Fig. 2: Biochemical and structural analysis of the selected nanobodies. **(A)** SDS-PAGE analysis of the purified nanobodies A9 and C6. **(B)** The binding capacity of the purified samples shown in (A) was tested by ELISA with either phosphorylated (phosphopeptide; 1 $\mu\text{g/mL}$) or non-phosphorylated (peptide; 1 $\mu\text{g/mL}$) C-terminal H2AX peptide coated on plate. **(C)** Immunofluorescence assay with C6 nanobody. H1299 cells were treated for 24 hours with the indicated drugs and incubated after fixation with nanobody C6. Bound molecules were revealed with anti-tag E6 and Alexa 568-labelled anti-mouse IgG. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm . **(D)** Quantification of the γ -H2AX fluorescence signal recorded following incubation of the treated cells treated as in (C) with either A9 or C6 nanobody. **(E)** Crystallographic 3D-structure of the C6 nanobody in complex with the phosphorylated peptide corresponding to γ -H2AX C-terminal tail (ApSQEY). The CDR1, CDR2 and CDR3 loops colored in blue, green and yellow, respectively. The γ -H2AX tail is shown in magenta and peptide residues are boxed. **(F and G)** Close-up view of the γ -H2AX tail peptide in the nanobody binding site. Residues are color coded and labelled as in (E). Water molecules in the interface between the γ -H2AX tail and the nanobody are represented as red spheres and hydrogen bonds are represented as cyan dotted lines.

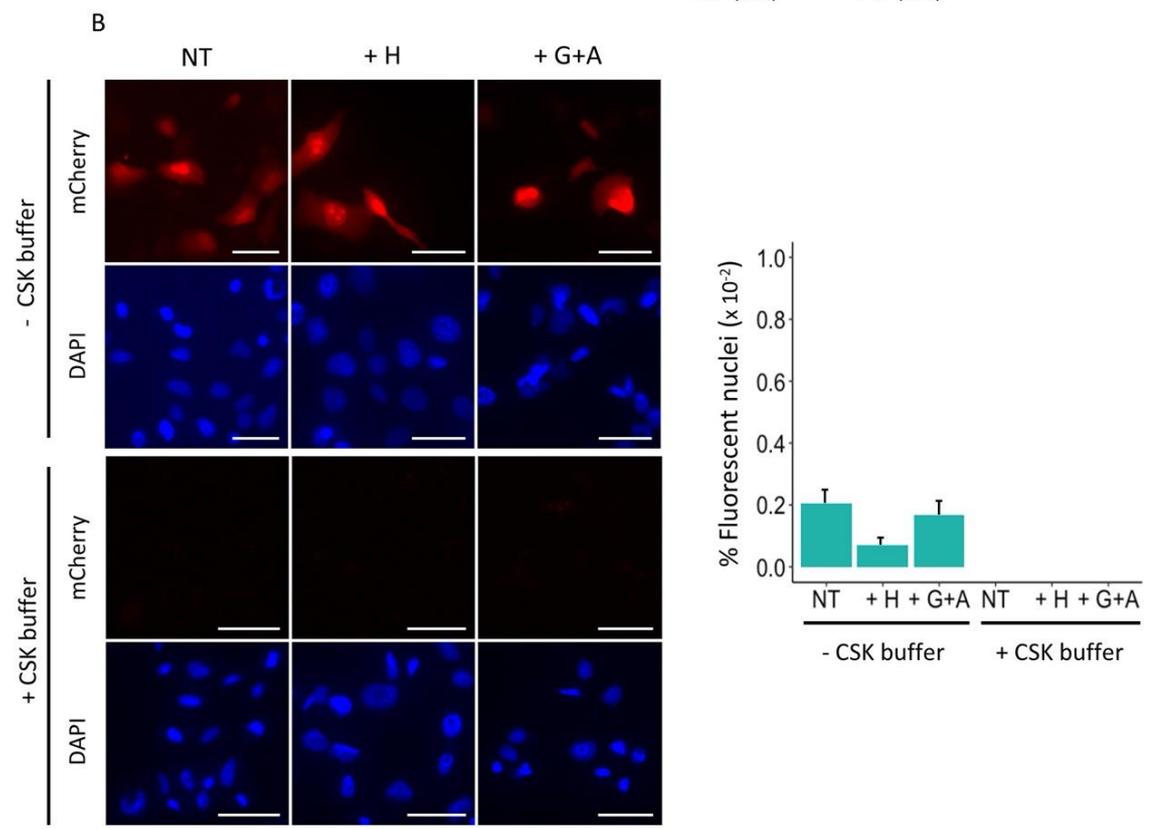
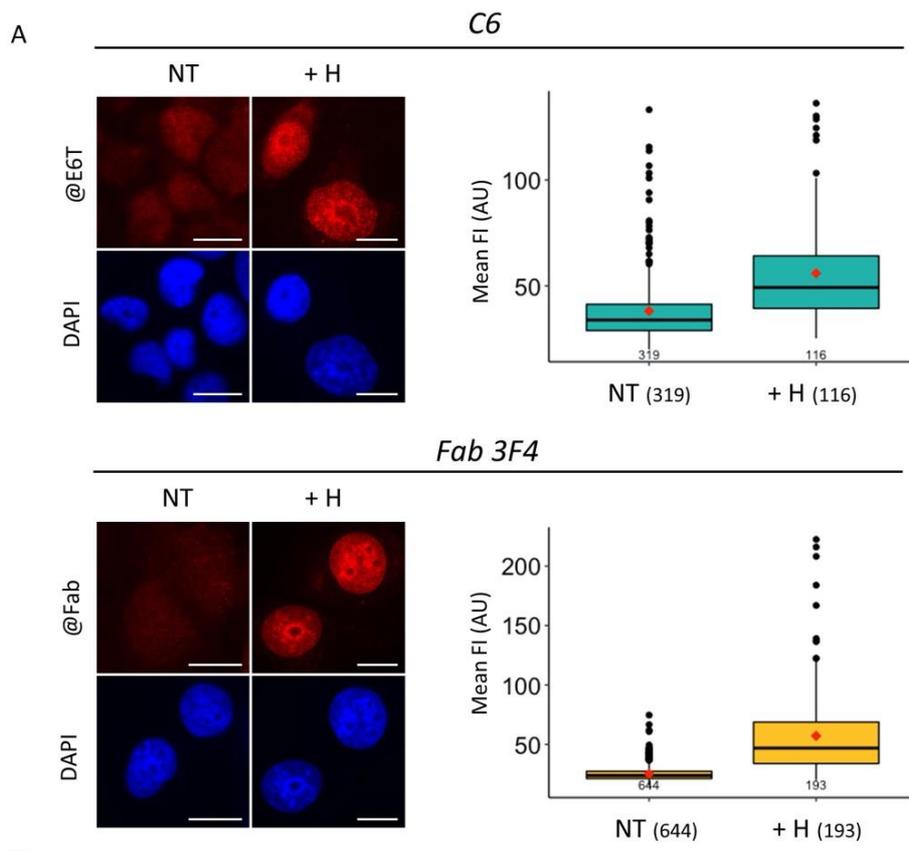


Fig. 3: C6 nanobody localization to the nucleus in drug-treated H1299 cells. **(A)** Following transduction with either C6 nanobody or Fab 3F4, H1299 cells were treated with H and analyzed by immunofluorescence 48 hours post-treatment. Representative images are shown on the left. Bound nanobody or Fab were revealed with anti-E6T antibody and Alexa 568-labelled anti-mouse globulins. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm . The quantification of the γ -H2AX mean fluorescence intensity (FI) of the monitored cells is shown on the right. The numbers indicated in brackets correspond to the number of cells analyzed in each condition. **(B)** Immunofluorescence analysis of H1299 cells after transfection with the plasmid encoding the C6 nanobody. 4 hours post-transfection, the indicated drugs were added. After incubation for 20 h, the cells were either fixed (- CSK buffer) or washed with CSK buffer prior to fixation (+ CSK buffer). The expressed nanobody molecules were revealed as in **(A)**. The panel shows representative images recorded under the microscope (left) and the percentage of fluorescent cells observed in each condition is shown (right). Cut-off for negative cells was set on non-transfected cells using the maximal recorded value. Scale bar: 200 μm .

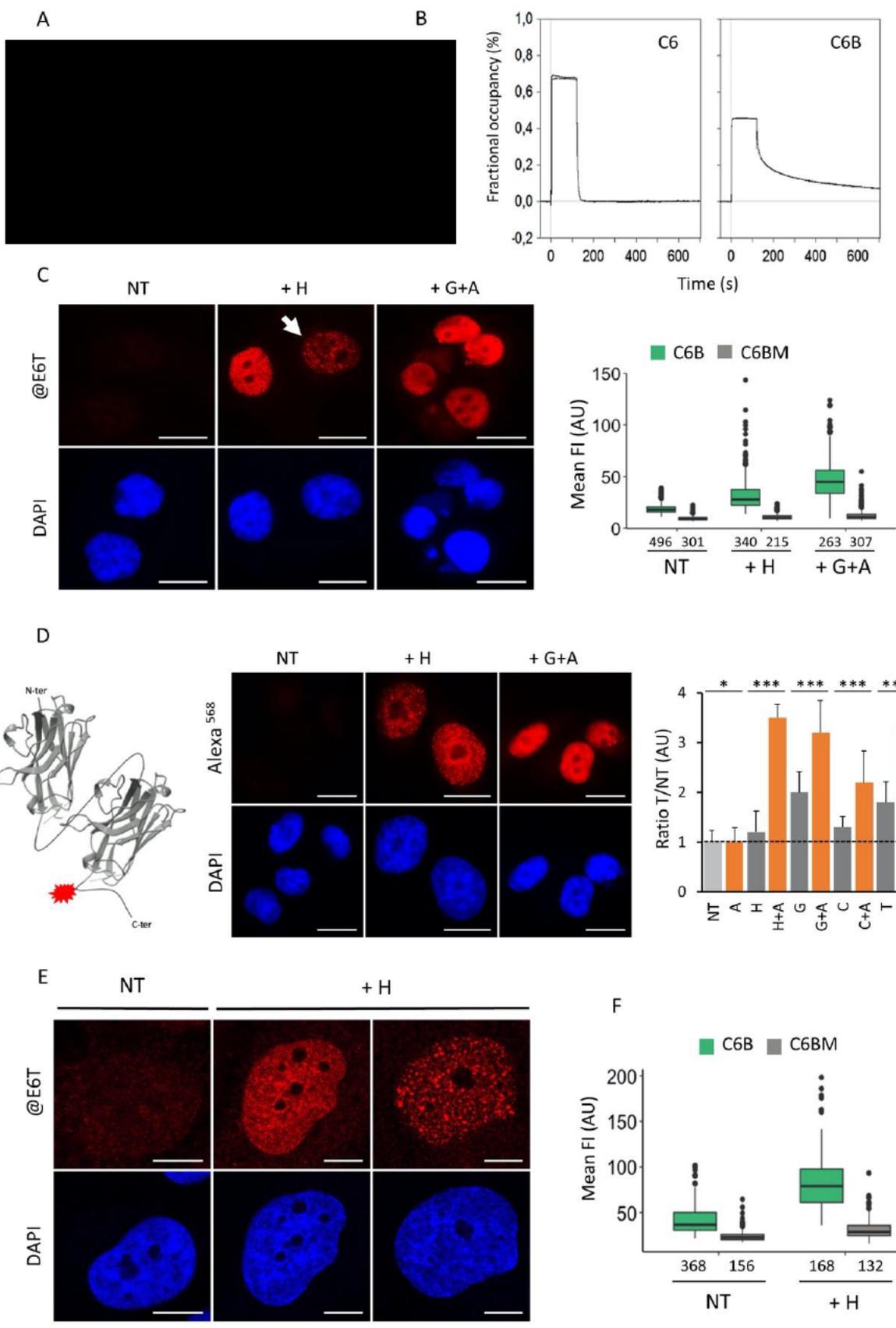


Fig. 4: Binding performance of the bivalent C6 nanobody. **(A)** Schematic representation of the constructs used to produce bivalent nanobodies in *E. coli* cells. The four R residues of bivalent C6 nanobody (C6B) that have been altered to generate the mutant bivalent C6 nanobody (C6BM) are indicated. **(B)** Analysis by SPR of the interaction of monovalent (C6; 180 nM) or bivalent (C6B; 80 nM) C6 nanobody with the phosphopeptide immobilized on chip. The curves show typical normalized profiles of the fractional occupancy calculated with the signals recorded for each nanobody (Materials and Methods). Injection of nanobody was stopped at the 120 seconds time-point and dissociation was analyzed during 700 seconds. **(C)** Representative immunofluorescence images of H- or G+A-treated H1299 cells following fixation and incubation with bivalent C6 nanobody (left). Bound material was revealed as described in the legend of Figure 3. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m. The quantification of the mean γ -H2AX fluorescence intensity of these analyzed cells and those monitored after incubation with the C6BM molecules is shown on the right. The number of cells analyzed in each condition is indicated. **(D)** Detection of γ -H2AX in drug-treated H1299 cells with the fluorescently-labelled C6BM. A depiction of the bivalent nanobody chemically conjugated to Alexa 568 (red) is shown on the left. Middle: Immunofluorescence analysis of drug-treated H1299 cells after incubation with the labelled conjugate. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The histogram on the right corresponds to the normalized γ -H2AX FI detected with the conjugate of cells treated (T) with the indicated drugs or drug combinations. The dashed line corresponds to the fluorescence background level measured with non-treated (NT) cells. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. **(E)** Detection of γ -H2AX with delivered C6B or C6BM. H1299 cells transduced with either C6B or C6BM nanobodies were treated with H and revealed with anti-tag E6 antibody and Alexa 568-labelled anti-mouse globulins 40 hours post-treatment. Representative immunofluorescence images of C6B-transduced cells taken with a confocal microscope after DAPI counterstaining (blue) are shown (left). Scale bar: 10 μ m. The quantifications of the mean FI of cells transduced with either C6B (green) or C6BM (grey) are shown (right). The number of analyzed cells in each condition is indicated (bottom).

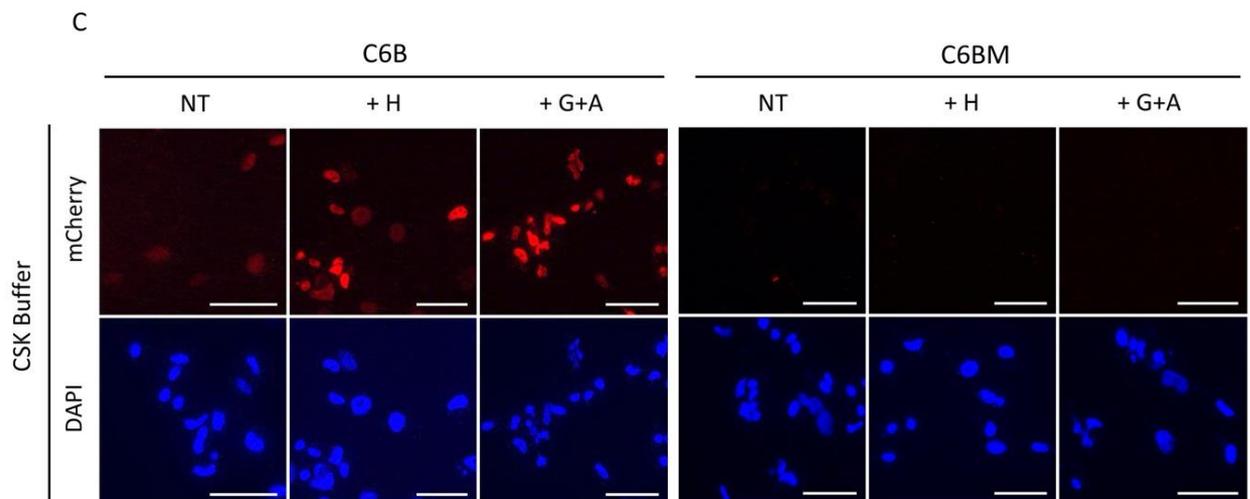
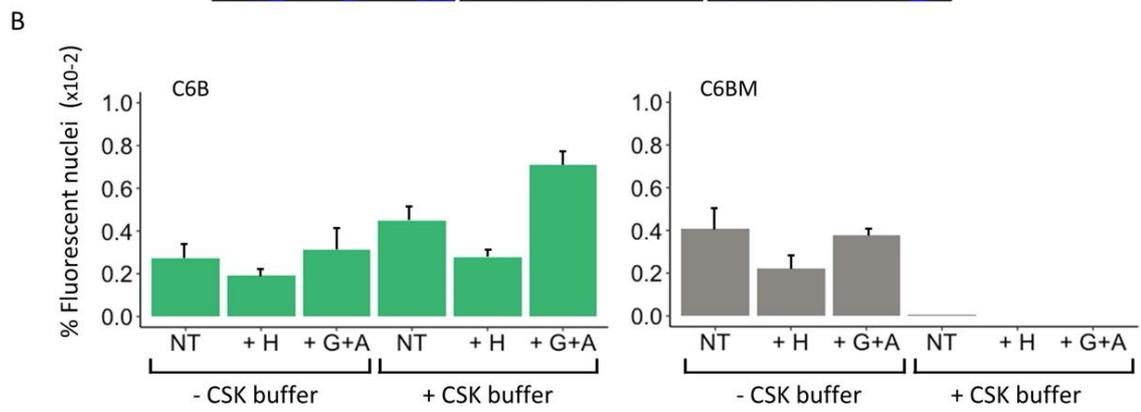
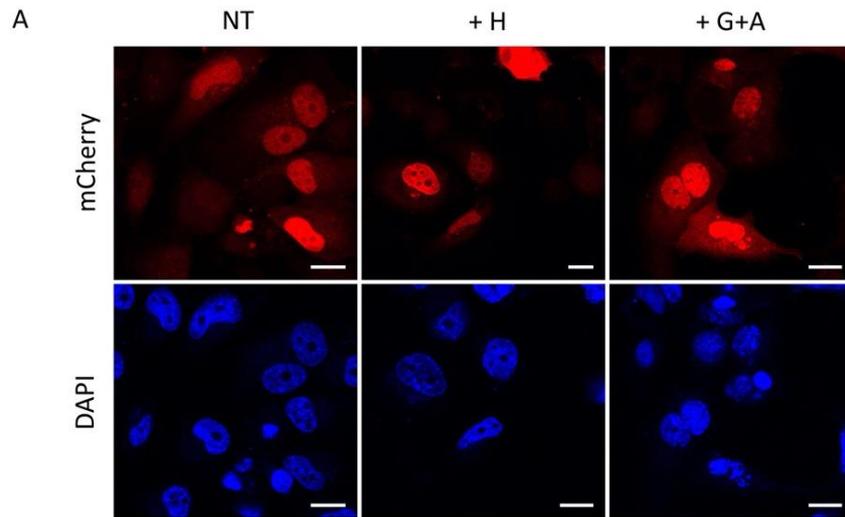


Fig. 5: Expression of the bivalent chromobodies in transfected cells. **(A)** Representative immunofluorescence images of H1299 cells transfected with the p β A-C6B-E6T-mCherry construct. The transfected cells were treated with the indicated drugs during 24 hours and after cell fixation, expressed nanobody-mCherry fusions were monitored under a confocal microscope. Scale bar: 20 μ m. **(B)** Evaluation of the binding stability of the C6B-mCherry or the C6BM-mCherry fusions expressed in H1299 cells treated with the indicated drugs after transfection. The histograms show the percentage of fluorescent nuclei detected after fixation (- CSK buffer) or after a wash with CSK buffer prior to fixation (+ CSK buffer). Up to 300 nuclei recorded from 3 independent experiments in each condition were analyzed to calculate the percentages. **(C)** Representative immunofluorescence images of the transfected H1299 cells used in (B). Scale bar: 200 μ m.

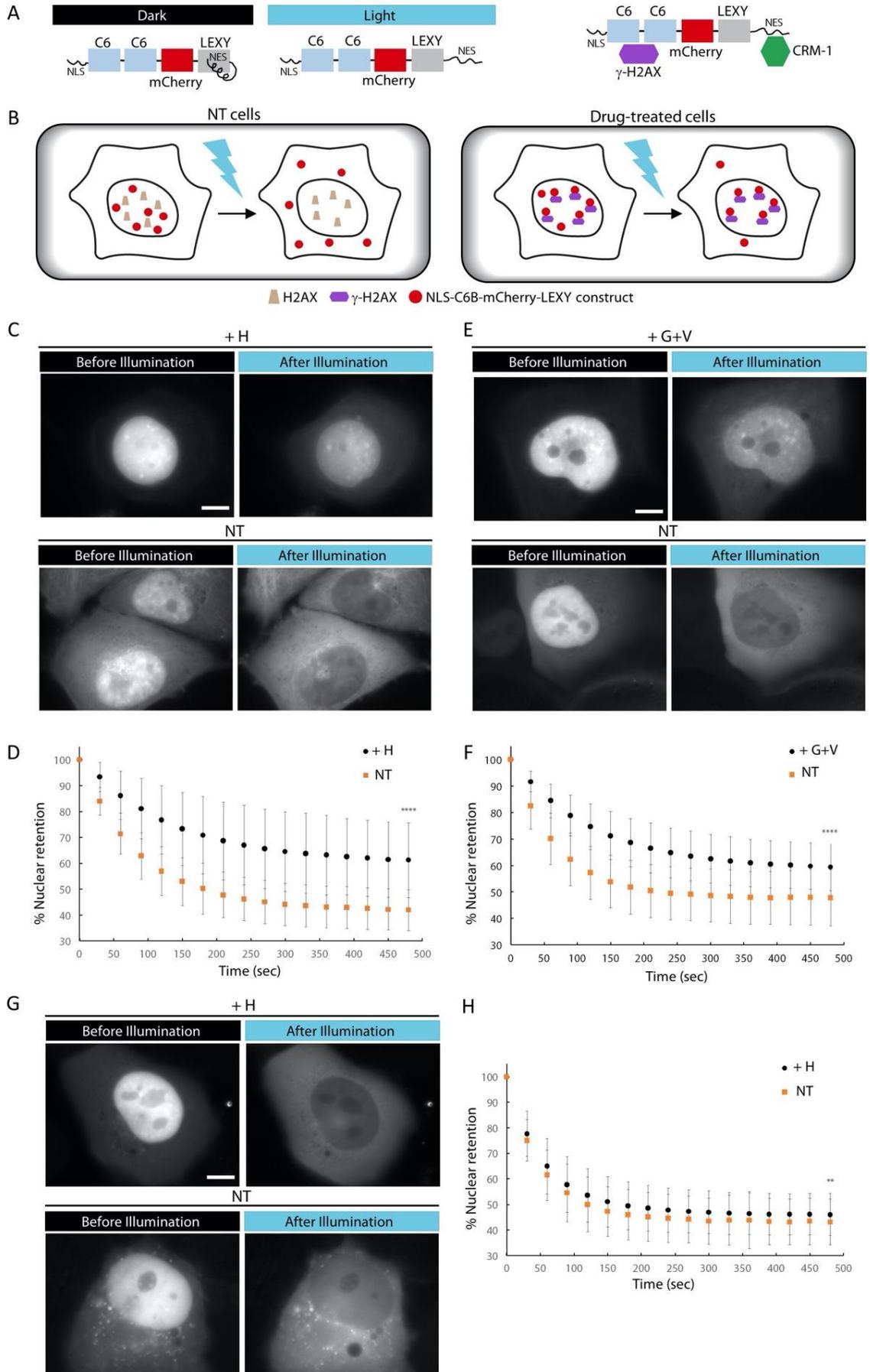


Fig. 6: An optogenetic strategy based on light-mediated export allows for the specific detection of γ -H2AX in live cells. **(A)** Schematic representation of the construct used and mechanism of blue light-mediated exposure of the NES. (left). The potential binding partners (γ -H2AX, CRM-1) of the C6 chromobody-LEXY fusion are also represented (right). **(B)** Expected behavior of the C6 chromobody-LEXY fusion construct in untreated (NT) and drug-treated cells after blue light illumination (cyan thunder symbol). **(C, E and G)** Representative wide-field fluorescence microscopy images of H1299 cells transiently transfected with either the NLS-C6B-mCherry-LEXY **(C, E)** or NLS-C6BM-mCherry-LEXY **(G)** construct and treated with the indicated drugs or left untreated (NT). Images were taken 40 hours **(C, G)** and 24 hours **(E)** after treatment. Blue light was applied in brief pulses every 30 seconds for 8 minutes. Scale bar: 10 μ m. **(D, F and H)** Corresponding quantification of nuclear retention. Values represent mean \pm s.d. of three independent experiments. **, *p*-value < 0.01; ****, *p*-value < 0.0001 (Student's t-test, heteroscedastic).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

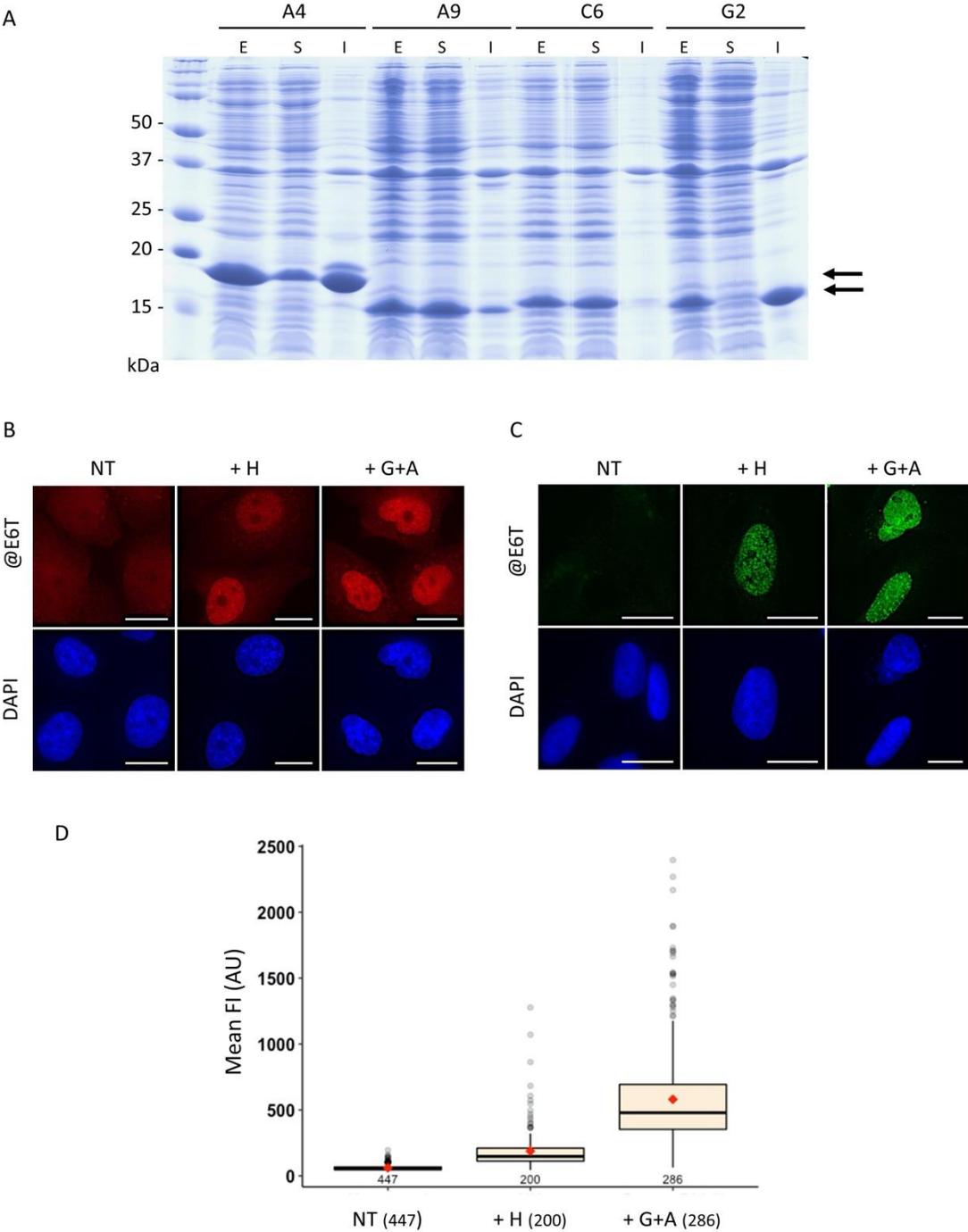


Fig. S1: Characterization of the A9 nanobody. **(A)** Analysis by SDS-PAGE of the bacterially-expressed nanobodies. The gel shows the protein content of similar amounts of total (E), soluble (S) and insoluble (I) fractions of extracts obtained after lysis of the induced bacteria. **(B and C)** Representative immunofluorescence images of drug-treated H1299 cells recorded after incubation with either A9 nanobody (B) or mAb 3F4 (C). Scale bar: 20 μm . **(D)** Quantification of the signal obtained with the cells shown in (C). The number of analyzed cells is indicated in brackets.

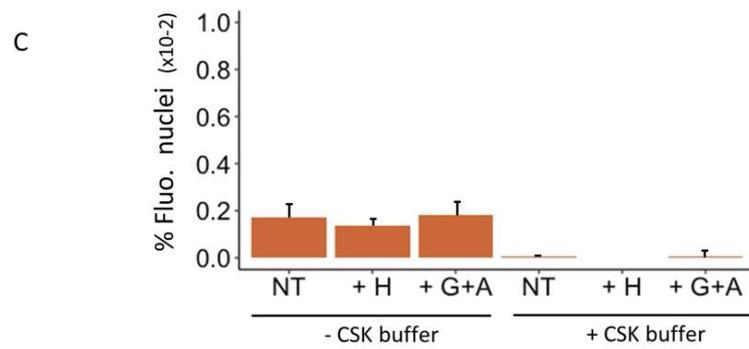
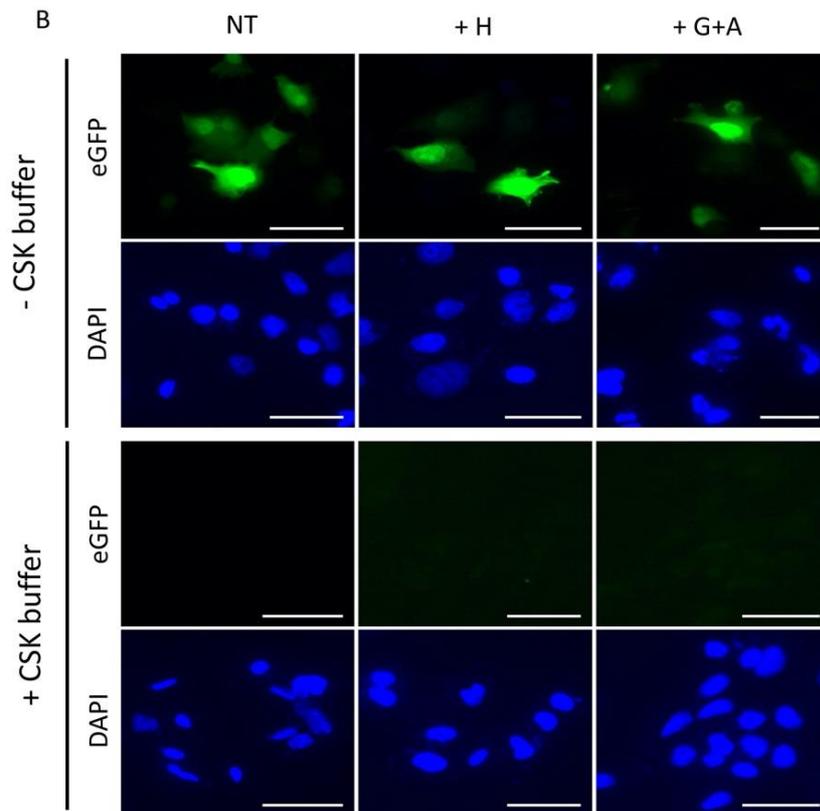
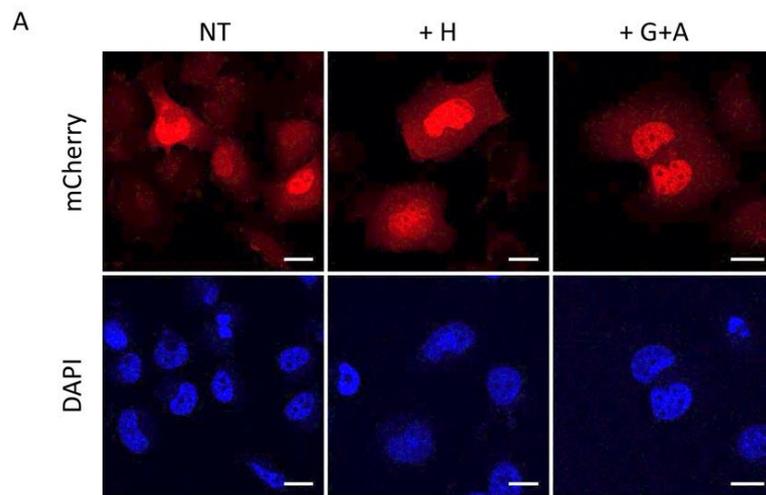


Fig. S2: Microscopic analysis of C6 and A9 nanobodies. **(A)** Representative confocal microscopy images of H1299 cells incubated with C6 nanobody. The cells were treated as indicated in the legend of Fig. 2C. Scale bar: 20 μm . **(B and C)** Immunofluorescence analysis of H1299 cells after transfection with chromobody A9-GFP. The cells were treated as indicated in the legend of Fig. 3B. Representative images recorded under the microscope **(B)** and the corresponding percentage of fluorescent cells observed in each condition **(C)** are shown. Cut-off for negative cells was set on non-transfected cells using the maximal recorded value. Scale bar: 200 μm .

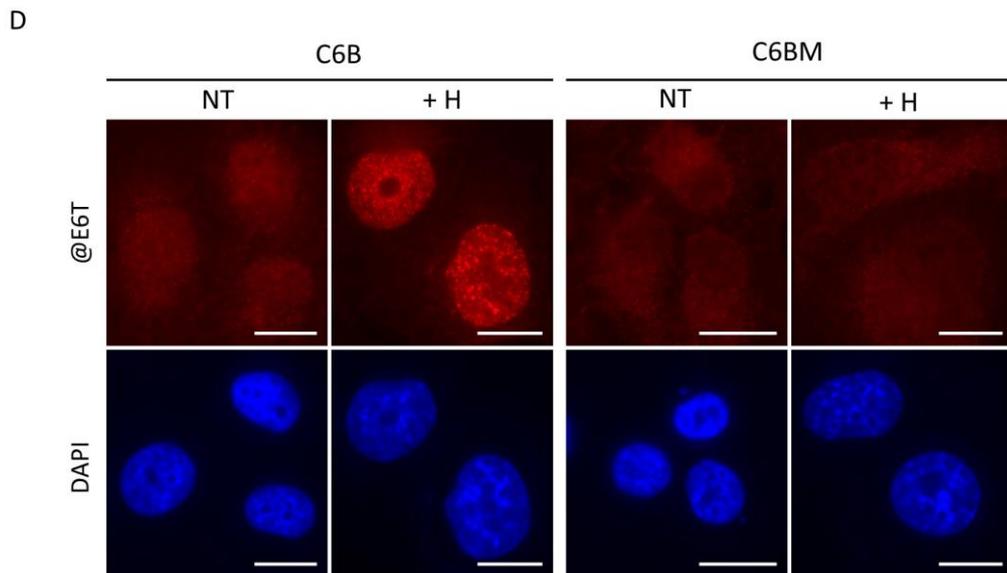
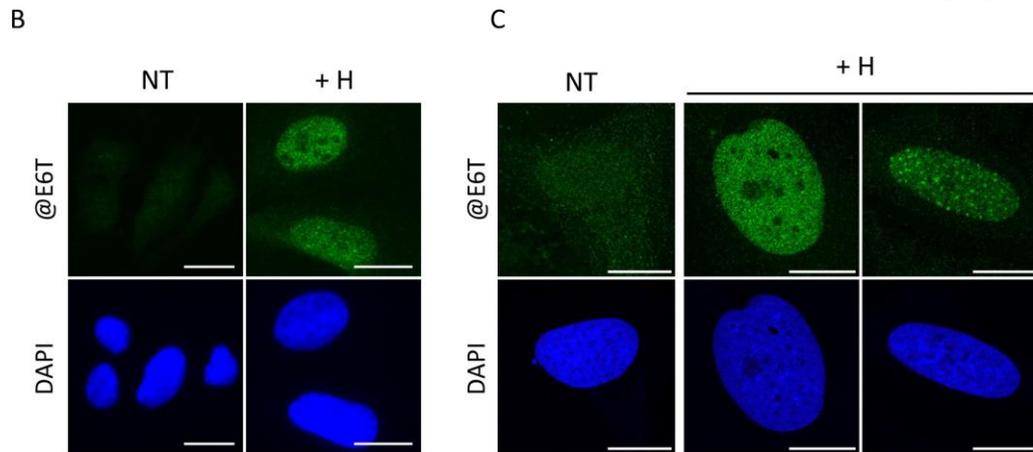
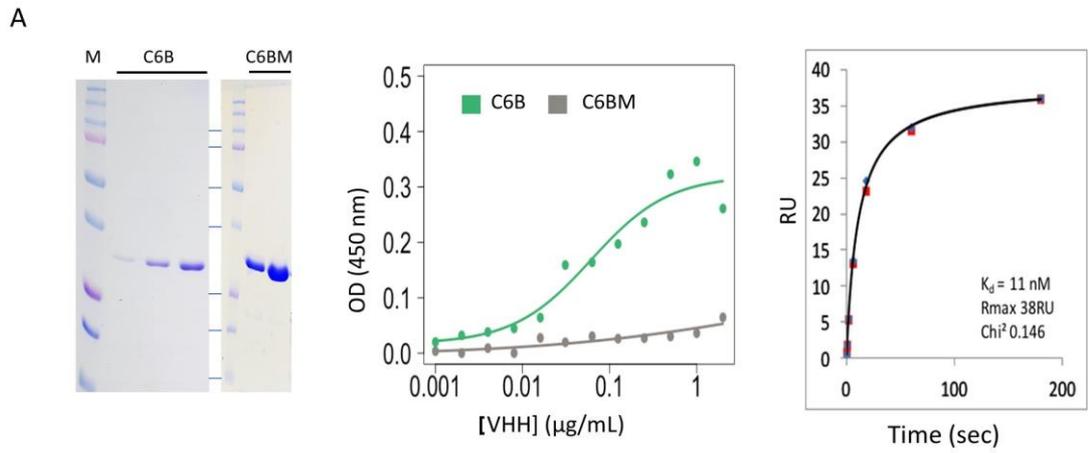


Fig. S3: Biochemical and fluorescence microscopic analyses of C6B and C6BM nanobodies. **(A)** Purification and binding analysis of the C6B and C6BM nanobodies. Aliquots of purified protein (1 to 5 μg) were subjected to SDS-PAGE (left) and varying concentrations were probed by ELISA with fixed phosphopeptide on plate (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (middle). The panel on the right shows the binding profile of C6 nanobody to the phosphopeptide as probed by SPR (Materials and Methods). The experimental values of a typical experiment are indicated. **(B)** Immunofluorescence assay with C6B in U2OS cells. Bound nanobodies were revealed with anti-E6 tag antibodies and Alexa Fluor 488 anti-mouse immunoglobulins. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm . **(C)** Transduction of C6B in U2OS cells. Representative images taken with a confocal microscope after DAPI counterstaining (blue) are shown. Scale bar: 10 μm . **(D)** Transduction of C6B and C6BM in H1299 cells. Typical images recorded with a conventional fluorescence microscope after treatment of the cells as indicated in the legend of Fig. 4E are shown. Scale bar: 20 μm .

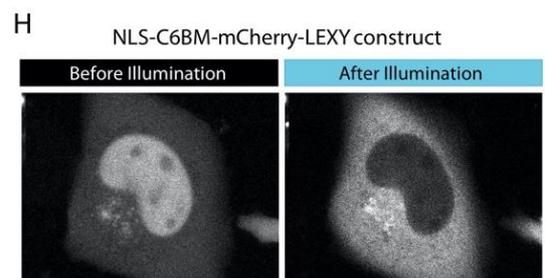
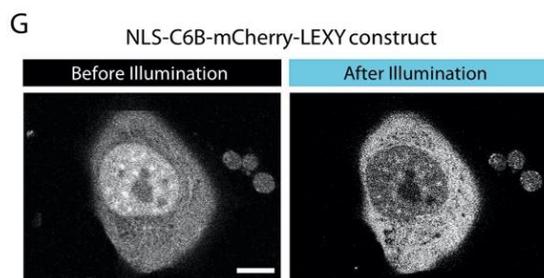
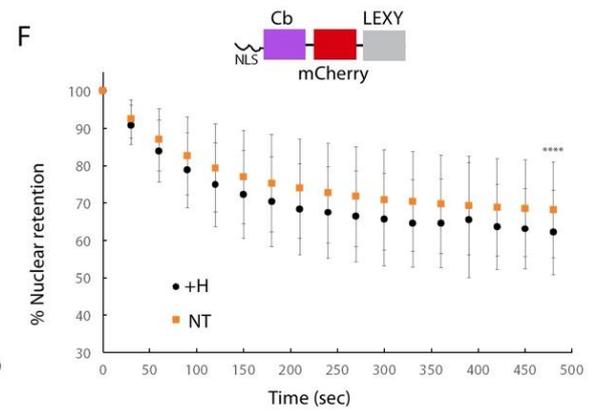
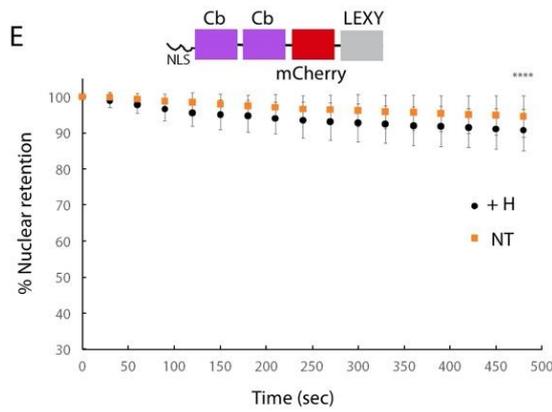
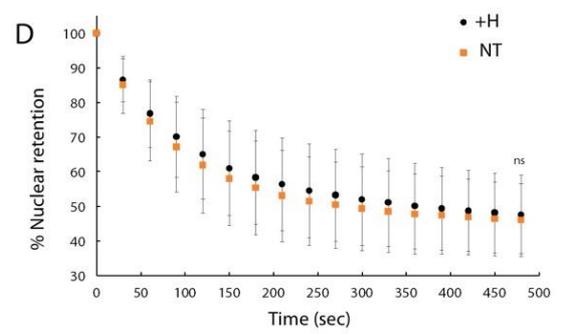
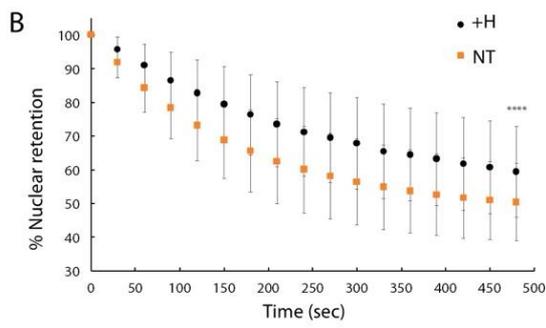
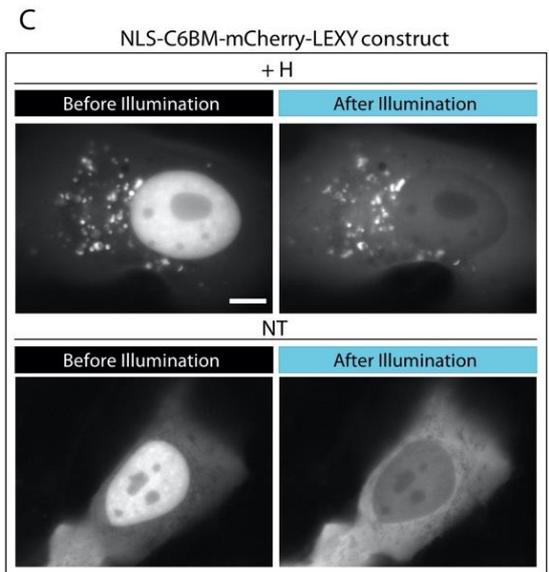
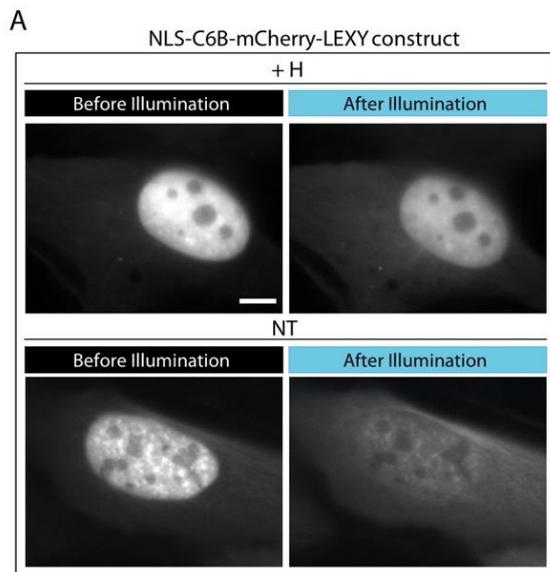


Fig. S4: Nuclear retention analysis of C6 and Cb nanobodies. (**A** and **C**) Representative wide-field fluorescence microscopy images of U2OS cells transiently transfected with the indicated constructs after 40 hours post-treatment with H or left untreated (NT). Blue light was applied as indicated in the legend of Fig. 6. Scale bar: 10 μm . (**B** and **D**) Corresponding quantification of nuclear retention. Values represent mean \pm s.d. of three independent experiments. ****, *p*-value < 0.0001 (Student's t-test, heteroscedastic). (**E** and **F**) Nuclear retention of the monovalent or the bivalent chromatibody (Cb) analyzed in parallel. The H1299 cells were treated as described in the legend of Fig. 6. The constructs used are schematically represented (top). (**G** and **H**) Typical images taken with a confocal microscope of H1299 cells transfected with the indicated constructs and treated with H as indicated in the legend of Figure 6. Scale bar: 10 μm .

Table S1: Data collection and refinement statistics of the C6 nanobody in complex with the peptide corresponding to the γ -H2AX tail.

Data collection	
Resolution range (Å)	61.49 - 1.55 (1.605 - 1.55)
Space group	P 3 ₁
a, b, c (Å)	87.41, 87.41, 105.41,
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Total No. reflections	1376552 (137008)
No. of unique reflections	130630 (13033)
Multiplicity	10.5 (10.5)
Completeness (%)	99.77 (99.90)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	13.47 (0.99)
R-merge	0.0903 (1.938)
R-meas	0.0949 (2.038)
R-pim	0.0291 (0.627)
CC1/2	0.999 (0.679)
CC*	1 (0.899)
Overall B factor from Wilson plot (Å ²)	21.48
Structure Refinement	
No. of reflections used in refinement	130626 (13030)
No. of reflections used for test set	6402 (651)
R-work	0.1491 (0.3091)
R-free	0.1844 (0.3268)
CC(work)	0.976 (0.877)
CC(free)	0.955 (0.860)
Number of non-hydrogen atoms	7621
Macromolecules	6621
Ligands	8
Solvent	992
R.M.S. deviations	
Bonds (Å)	0.006
Angles (°)	0.86
Ramachandran plot	
Most favored (%)	98.95
Allowed (%)	1.05
Outliers (%)	0
Average B-factor (Å ²)	31.81
Macromolecules	30.29
Ligands	36.24
Solvent	41.9
Rotamer outliers (%)	1.75
Clashscore	0.99

Table S3: List of the primers used for the construction of the expression vectors encoding the mCherry and LEXY tags

Name	Nucleotide sequence	Used for generating
CM01	5'-caaagcgcgtgaagctggacatgACTGAGGTGCAGCTGGTGG-3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM02	5'-CCGCCTGAACCGCCTCCACCGGCCGCTGAGGAGACGGTGA-3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM03	5'-TCACCGTCTCCTCAGCGGCCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGG-3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM04	5'-tcctcctcgcccttgctcacggccgctgaggagacggtgac -3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM05	5'-tcaccgtctcctcagcggccgtgagcaagggcgaggagga -3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM06	5'-ACCAGCTGCACCTCAGTcatgtccagcttcacgcgcttg-3'	pC6B-mCherry-LEXY
CM07	5'-caaagcgcgtgaagctggacATGACTCAGTTGCAGCTCGTGGAG-3'	pC6BM-mCherry-LEXY
CM08	5'-tcctcctcgcccttgctcacGGCCGCTGAGGAGACGGTGA-3'	pC6BM-mCherry-LEXY
CM09	5'-ACTGGATCCgtgagcaagggcgaggaggat-3'	pC6-mCherry-LEXY
CM10	5'-TACGGATCCGGCCGCTGAGGAGACGGT-3'	pC6-mCherry-LEXY
CM11	5'-GCCTATGAAGACTGcatgATGGCCCAGGTGCAGCTG-3'	pCb-mCherry-LEXY
CM12	5'-GCCTATGAAGACTGtcacGCTGGAGACGGTGACCAG-3'	pCb-mCherry-LEXY
JR01	5'-caaagcgcgtgaagctggacATGGCCCAGGTGCAGCTGCA-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR02	5'-GTGGCtcgaGATCCGCTGCCACCTCCGCCTGACCCGCCTC-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR03	5'-GAGGCGGGTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGATCtcgaGCCAC-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR04	5'-tcctcctcgcccttgctcacGCTGGAGACGGTGACCAGGG-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR05	5'-AACGAACTCATGACYSABBTSCAGCTSSWGSMTVCVCC-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR06	5'-TGCAGCTGCACCTGGGCCATgtccagcttcacgcgcttg-3'	pCbB-mCherry-LEXY
JR07	5'-caaagcgcgtgaagctggacATGACTCAGTTGCAGCTCGTGG-3'	pC6/Cb-mCherry-LEXY
JR08	5'-tcctcctcgcccttgctcacGCTGGAGACGGTGACCAGGG-3'	pC6/Cb-mCherry-LEXY
JR09	5'-CCCTGGTCACCGTCTCCAGCgtgagcaagggcgaggagga-3'	pC6/Cb-mCherry-LEXY
JR10	5'-ACGAGCTGCAACTGAGTCATgtccagcttcacgcgcttg-3'	pC6/Cb-mCherry-LEXY

Movie S1: Analysis by time-lapse microscopy of a nucleus of H1299 cells transiently transfected with the NLS-C6B-mCherry-LEXY construct and treated with H. Images were taken as indicated in the legend of Figure 6. Scale bar: 10 μm .

Movie S2: Analysis by time-lapse microscopy of a nucleus of H1299 cells transiently transfected with the NLS-C6BM-mCherry-LEXY construct and treated with H. Images were taken as indicated in the legend of Figure 6. Scale bar: 10 μm .

3 Résultats complémentaires

Dans cette section sont abordés les résultats non présentés dans l'article et qui ont été obtenus au cours du développement du VHH C6 couplé au système LEXY. Seront ainsi abordés les résultats relatifs à la caractérisation des différents VHHs, à la génération des témoins positif et négatif pour le système LEXY, les stratégies d'export nucléaire étudiées et enfin la stratégie de conjugaison du VHH C6 avec un fluorochrome.

3.1 Caractérisation initiale des VHHs

3.1.1 Séquences des VHHs isolés

Les 4 VHHs caractérisés dans l'article ont été séquencés et l'alignement de ces séquences est présenté en Figure 40. La séquence d'acides aminés a été numérotée en utilisant le système de numérotation Kabat (Kabat et al., 1991).

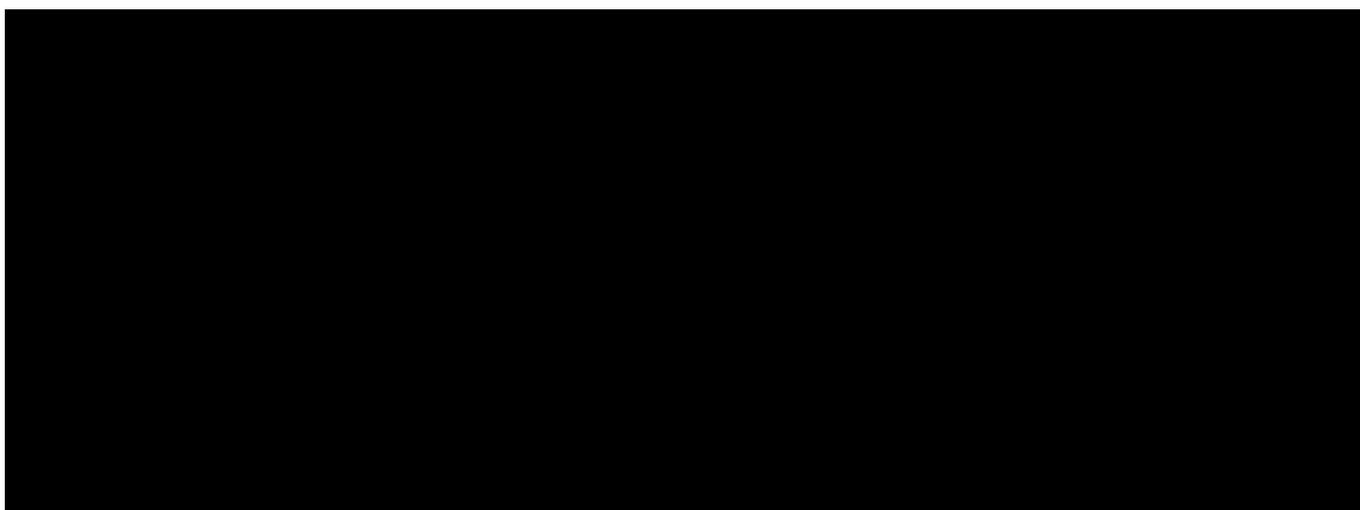
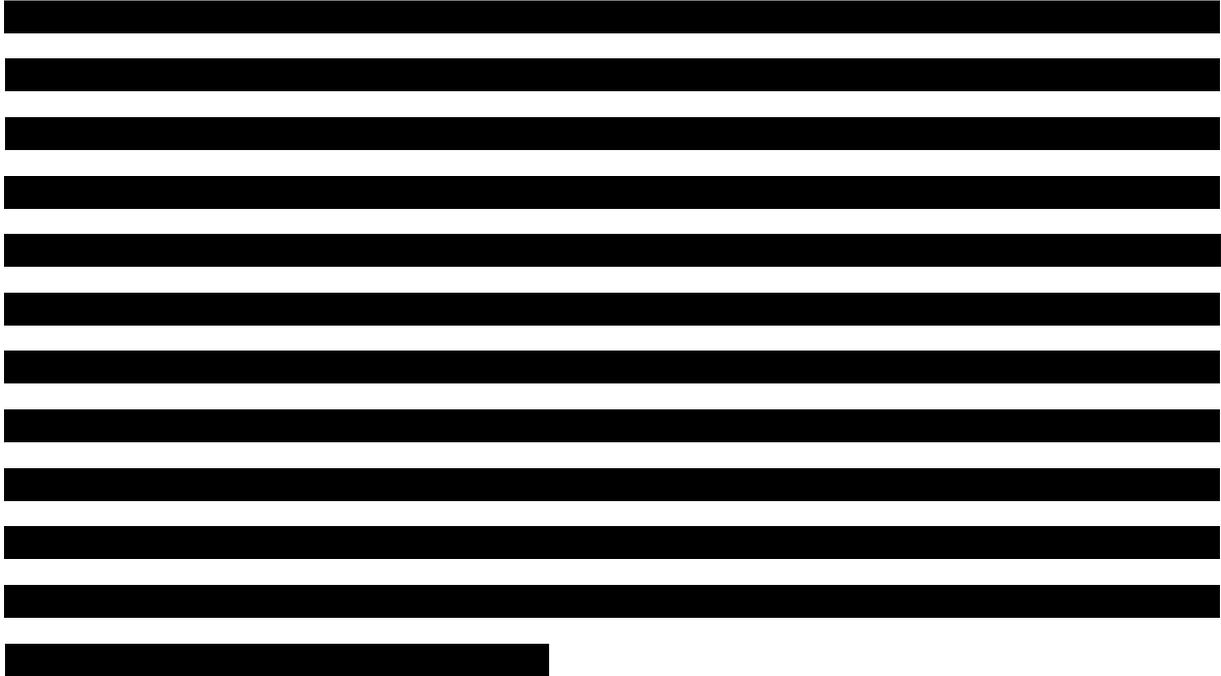


Figure 40 : Séquences des 4 VHHs caractérisés. Jaune : régions CDR, bleu : variabilité dans les régions FR, rouge : variabilité dans la région CDR3, vert : résidus hydrophiles de la région FR2.

Cet alignement montre que ces 4 VHHs diffèrent très peu au niveau de leur séquence d'acides aminés (différences indiquées en bleu). Ceci indique que ces différents VHHs sont probablement issus d'une même cellule B progénitrice. Le VHH A4 se distingue des 3 autres VHH par la présence d'un hinge long (9 résidus supplémentaires).

[Redacted text]



3.1.2 Test ELISA

Le premier test utilisé pour la caractérisation des VHHs est le test ELISA, réalisé contre les peptides C-terminaux de H2AX, phosphorylés ou non sur la sérine en position 139.

Les résultats obtenus avec les VHHs C6 et A9 ont été présentés dans l'article (Figure 2B), cependant le VHH A4 a également été caractérisé par test ELISA.

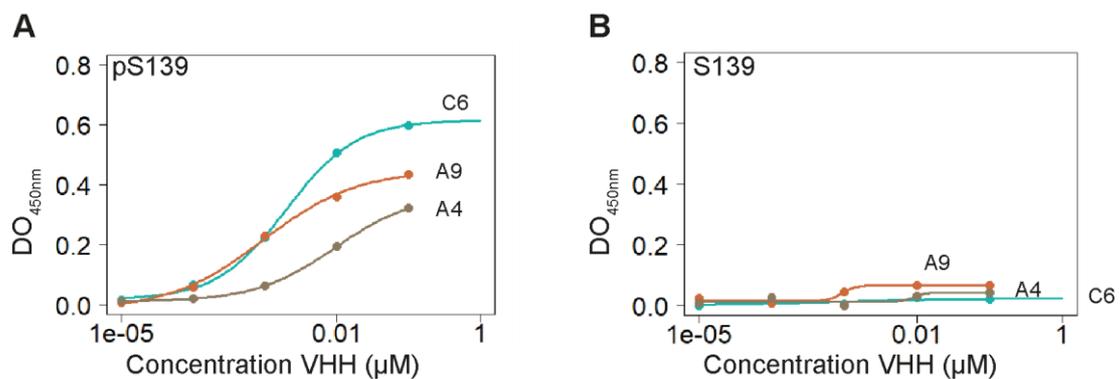


Figure 41 : Analyse par test ELISA des VHHs C6, A9 et A4 contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139) (A) ou une sérine (S139) en position 139 (B).

Les résultats obtenus ont montré que le VHH A4 est également capable de reconnaître γ -H2AX dans ces conditions. Alors que le VHH C6 atteint un plateau à la concentration de 0,1 μ M (\approx 1,5 μ g/ml), les VHHs A4 et A9 ne sont pas à saturation à cette concentration. Les valeurs de densité optique mesurées ainsi que les pentes inférieures des courbes indiquent que ces 2

VHHs possèdent une affinité relative pour γ -H2AX inférieure à celle du VHH C6 (Figure 41A). Les résultats du test ELISA réalisé avec les 3 VHHs contre le peptide C-terminal de H2AX non phosphorylé indiquent qu'aucun d'entre eux ne réagit contre ce peptide (Figure 41B).

3.1.3 Immunofluorescence

Le VHH A4 a été testé en immunofluorescence sur des cellules H1299 traitées 24 h (Figure 42 et Figure 43). La quantification des intensités nucléaires moyennes de γ -H2AX montre un profil comparable à celui obtenu avec les VHHs A9 et C6, à savoir un signal résiduel dans les cellules non traitées, un signal modéré dans les cellules traitées à l'hydroxyurée et enfin un signal fort dans les cellules traitées avec la combinaison G + A. Néanmoins, l'intensité globale du signal observé est faible.

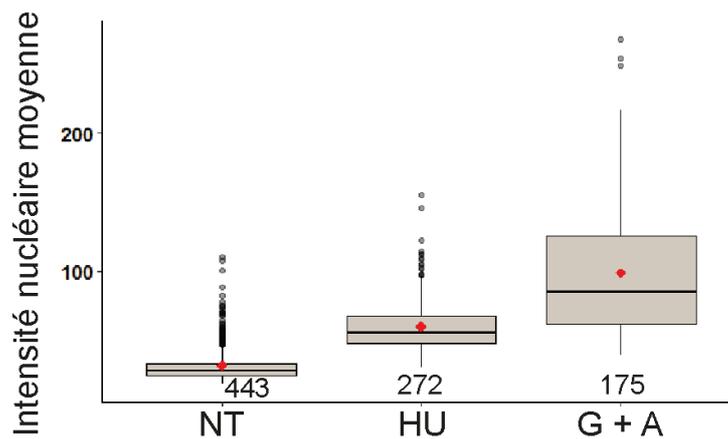


Figure 42 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH A4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

En revanche, l'observation des lames à plus fort grossissement (630x) a montré que le VHH A4, bien que permettant de détecter l'induction de γ -H2AX après traitement avec des produits génotoxiques forme de nombreux agrégats lors de son utilisation en immunofluorescence (Figure 43).

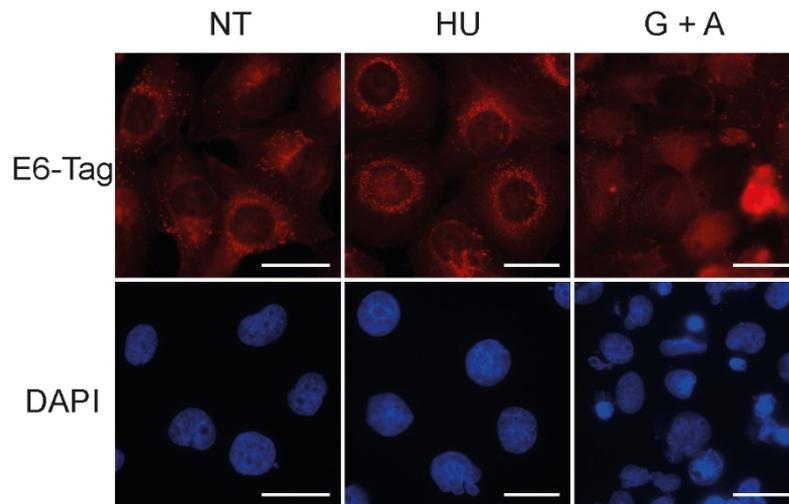


Figure 43 : IF avec le VHH A4 (100 ng/ml) sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. Révélation du Tag E6 avec l'anticorps 4C6. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

3.1.4 Transduction

Les 3 VHHs ont été vectorisés dans des cellules U2-OS traitées ou non pendant 48 h à l'hydroxyurée (Figure 44). La révélation des VHHs a été réalisée en utilisant l'anticorps 4C6 dirigé contre le tag E6.

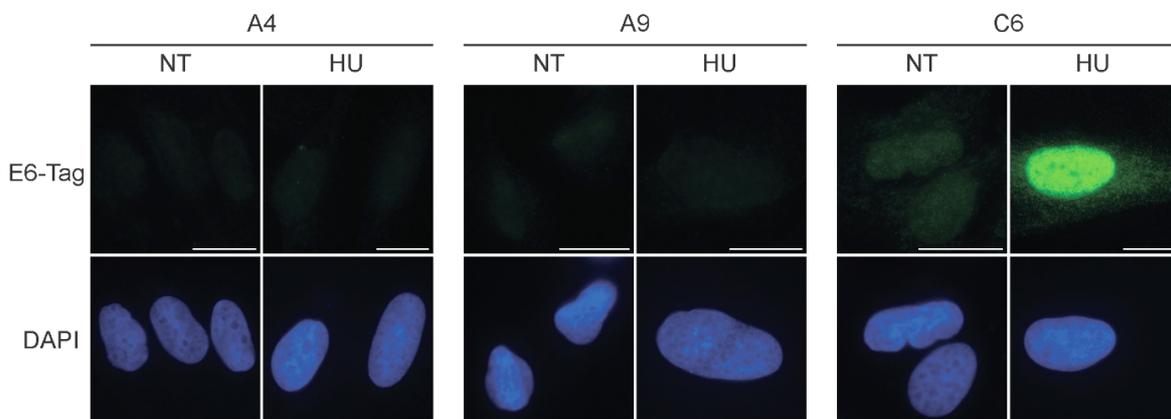


Figure 44 : Transduction des VHHs A4, A9 et C6 dans des cellules U2-OS traitées ou non à l'hydroxyurée pendant 48 h. 8 μ g/transduction. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m

De façon surprenante, le VHH C6 est le seul à détecter de γ -H2AX après sa transduction dans les cellules, les VHHs A4 et A9 n'étant pas détectés dans ces conditions. Il est à noter que bien que le VHH C6 permette de détecter γ -H2AX dans les cellules traitées, un bruit de fond cytoplasmique est également observable dans ces conditions. L'utilisation de quantités inférieures du C6 en transduction n'a pas permis la détection nette de γ -H2AX. Ces

observations nous ont indiqué qu'un excès de ce VHH devait être introduit dans les cellules pour permettre une détection de l'ensemble des molécules de γ -H2AX.

3.1.5 Transfection

Pour poursuivre la caractérisation *in cellulo* de ces 3 VHHs, ceux-ci ont été exprimés dans des cellules U2-OS après transfection du plasmide p β -Actin-VHH-eGFP (Figure 45). Les cellules ont été incubées 24 h en présence d'hydroxyurée après transfection, ceci afin d'évaluer la capacité de ces VHHs à détecter les foci de γ -H2AX dans un contexte intracellulaire. Ces expériences ont également permis d'évaluer la solubilité des VHHs lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules eucaryotes.

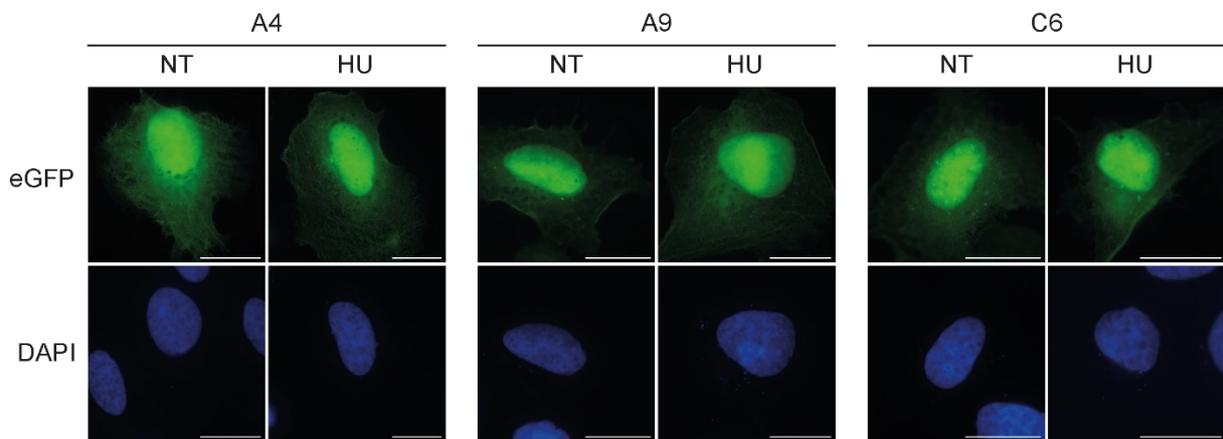


Figure 45 : Transfection des VHHs A4, A9 et C6 dans des cellules U2-OS et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Les observations faites en microscopie à épifluorescence ont montré que les 3 VHHs sont solubles lorsqu'ils sont exprimés dans le milieu intracellulaire. Ils présentent cependant tous les 3 une accumulation nucléaire en présence ou en absence de traitement. Cette accumulation nucléaire a été observée dans d'autres lignées cellulaires transfectées avec ces VHHs (HeLa, H1299) et confirmée par microscopie confocale dans le cas du VHH C6 (Figure S2A de l'article n°2). Cette localisation nucléaire systématique ne peut pas correspondre à la détection de γ -H2AX par les VHHs du fait de son intensité (induction de stress répliatif modéré) et de sa présence dans les cellules non-traitées. Ce résultat nous a amené à développer une stratégie, utilisable après transfection du VHH dans les cellules vivantes, permettant de supprimer le signal associé aux VHHs non liés à γ -H2AX. Nous avons ainsi

entamé la collaboration avec l'équipe de l'université de Fribourg pour l'utilisation de leur système LEXY qui peut permettre l'export nucléaire des VHHs non liés.

3.1.6 Extraction avec le tampon CSK

L'utilisation du système LEXY couplé à un VHH dirigé contre γ -H2AX suppose que l'interaction de ce dernier avec son antigène soit suffisamment forte pour résister à l'export nucléaire reposant sur l'interaction d'une séquence d'export nucléaire avec la protéine CRM1 (Chromosomal Maintenance 1). Aussi, afin d'évaluer la force de l'interaction des VHHs synthétisés dans les cellules avec γ -H2AX, des tests d'extraction avec le tampon CSK ont été réalisés sur les VHHs monovalents et sont présentées dans l'article n°2 (Figure 3B et Figure S2B et C). Ces tests nous ont indiqué qu'aucun des 3 VHHs monovalents ne présente une affinité suffisante pour résister à l'extraction par le tampon CSK

3.1.7 Conclusions

Le bilan des expériences de caractérisation des 3 VHHs (A4, A9 et C6) a permis de déterminer que le VHH C6 était le meilleur candidat pour l'observation de γ -H2AX dans les cellules vivantes. Le bilan des résultats des différentes expériences de caractérisation est présenté dans la Table 7

VHH	ELISA	IF	Transduction	Solubilité après transfection	Extraction au tampon CSK
A4	+	-	-	+	-
A9	+	+	-	+	-
C6	+	+	+	+	-

Table 7 : Caractère fonctionnel des différents VHHs dans les expériences de caractérisation

A l'issue de ces résultats, une version bivalente du VHH C6 a été créée, ce VHH s'étant montré le seul fonctionnel dans l'ensemble des tests de caractérisation

3.2 Caractérisation du VHH C6 bivalent (C6B)

3.2.1 Purification

L'analyse des différentes étapes de la purification montre qu'après expression cytoplasmique en système procaryote, une grande partie du VHH C6B est présent dans la phase soluble

indiquant que ce VHH est soluble après expression cytoplasmique dans les bactéries (Figure 46A, colonnes S et I, encadré rouge). Lors du passage de cette phase soluble sur une colonne de chromatographie d'affinité chargée en nickel, le VHH C6B est retenu sur la colonne comme le montre l'analyse de l'effluent (Ft) et des fractions de lavage (W). Le VHH C6B peut être élué efficacement comme le montre la présence d'une bande à environ 30 kDa visible sur les fractions d'éluion. L'analyse des fractions d'éluions par chromatographie d'exclusion de taille permet de récupérer des fractions contenant uniquement le VHH C6B de taille attendue (Figure 46B).

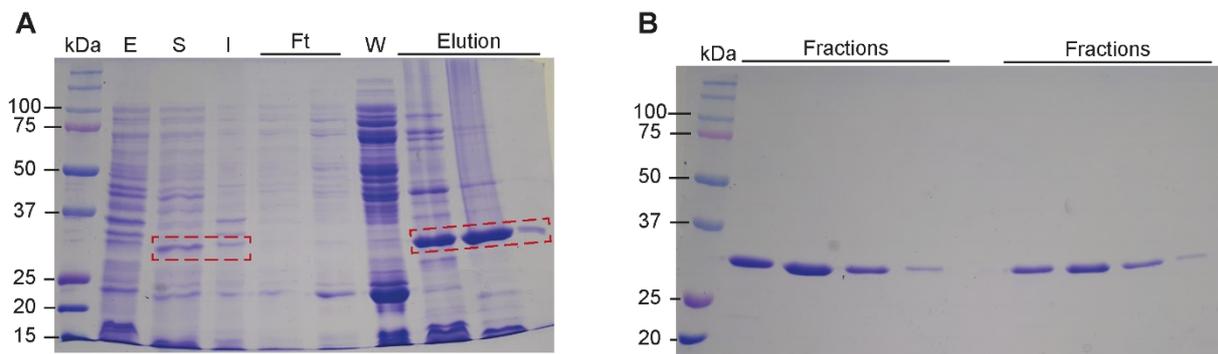


Figure 46 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification du VHH C6B. (A) Analyse de l'expression chez *E. coli* BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'éluion obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent (flowthrough); W : lavage (wash).

3.2.2 Test ELISA

Le VHH C6B a été caractérisé par des tests ELISA dans lesquels il a été comparé au C6 monovalent. Ces tests ELISA ont été réalisés avec différents peptides C-terminaux de H2AX adsorbés sur le support : le peptide non phosphorylé (S139), le peptide avec une phosphosérine en position 139 (γ -H2AX, pS139) et le peptide bi-phosphorylé avec une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 (pS139 + pY142) (Figure 47).

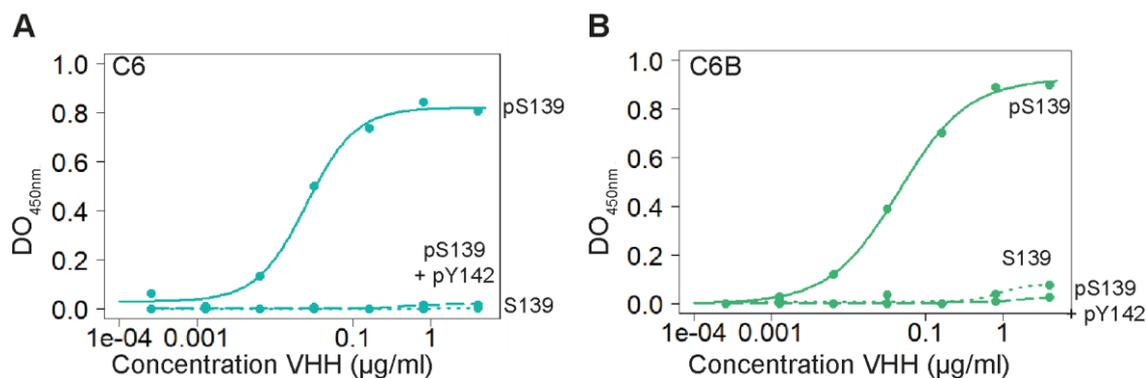


Figure 47 : Analyse par test ELISA des VHHs C6 (A) et C6B (B) contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139), une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 (pS139 + pY142) ou non-phosphorylé (S139).

Dans ces conditions le VHH C6B est réactif uniquement envers le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine en position 139. Le signal obtenu avec le VHH C6B contre le peptide γ -H2AX semble atteindre un plateau à une concentration de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ (≈ 26 nM). Aucune réactivité n'a pu être observé contre les peptide non phosphorylé ou bi-phosphorylé. Les mêmes conditions ont été utilisées sur le VHH C6. Les résultats montrent une réactivité uniquement envers H2AX phosphorylé sur la sérine 139. Le signal obtenu avec le VHH C6 contre le peptide γ -H2AX semble atteindre un plateau à une concentration de 0,16 $\mu\text{g/ml}$ (≈ 10 nM). Ces résultats confirment les informations obtenues par la résolution de la structure cristallographique. [REDACTED]

Ces résultats ne renseignent cependant pas sur la capacité du VHH C6 à reconnaître H2AX phosphorylé uniquement sur la tyrosine 142, cette phosphorylation étant décrite comme constitutive en absence de stress répliatif (Cook et al., 2009; Xiao et al., 2009).

3.2.2.1 Test ELISA par compétition

Les VHHs C6 et C6B ont également été évalués par un test ELISA par compétition. Les VHHs à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ (concentration correspondant au plateau obtenu précédemment) ont été pré-incubés avec les différents peptides C-terminaux de H2AX (Figure 48).

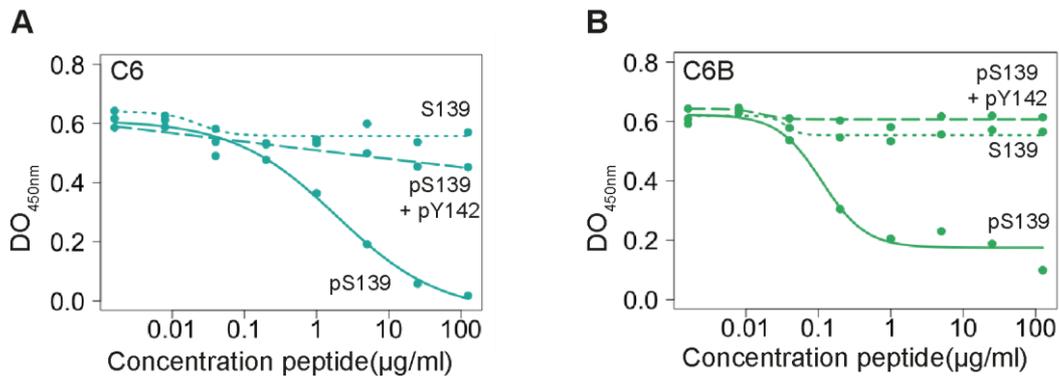


Figure 48 : Analyse par test ELISA par compétition des VHHs C6 (A) et C6B (B) contre le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine en position 139. Préincubation des VHHs à 1 µg/ml avec le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine (pS139), une phosphosérine en position 139 et une phosphotyrosine en position 142 (pS139 + pY142) ou non-phosphorylé (S139) aux concentrations indiquées

La préincubation des VHHs C6 et C6B avec les peptides non-phosphorylé ou bi-phosphorylé n'a pas entraîné de baisse significative du signal obtenu contre γ -H2AX avec ces VHHs, confirmant ainsi leur spécificité pour γ -H2AX. Dans le cas de la préincubation avec le peptide γ -H2AX, une décroissance progressive du signal obtenu avec le VHH C6 est observée, allant jusqu'à la perte totale du signal à la concentration maximale de peptide (100 µg/ml). Dans le cas du VHH C6B, la préincubation avec le peptide γ -H2AX entraîne également une diminution du signal observé mais contrairement au C6 monovalent, un signal résiduel stable est observé à partir d'une concentration en peptide de 1 µg/ml. La présence d'un signal résiduel même à de fortes concentrations en peptides semble indiquer que les 2 VHHs C6 composant la version bivalente sont capable de se lier à γ -H2AX de façon indépendante

3.2.3 Immunofluorescence

Le VHH C6B a été caractérisé par immunofluorescence sur des cellules traitées ou non avec des produits génotoxiques. Le C6B a été utilisé sur des cellules traitées ou non pendant 24 h avec la combinaison G + V permettant d'induire une importante phosphorylation de H2AX (Figure 49).

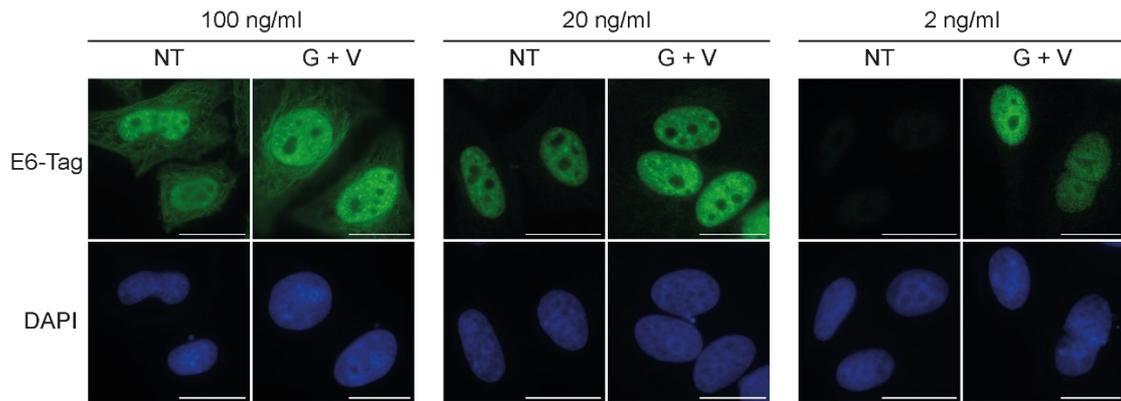


Figure 49 : IF avec le VHH C6B révélé par le tag E6 sur des cellules HeLa traitées 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Parmi les différentes conditions testées, la concentration de 2 ng/ml a permis d'observer γ -H2AX sans signal aspécifique détectable dans les cellules non traitées. Cette concentration a été utilisée dans l'article pour les images d'immunofluorescence avec révélation indirecte ainsi que les quantifications liées (Figure 4C de l'article n°2). Aux concentrations de 100 ng/ml (concentration efficace pour le VHH C6) et 20 ng/ml un fort marquage aspécifique est observable. L'observation d'un marquage nucléaire aspécifique nous a fait suspecter une reconnaissance de la forme non phosphorylée de H2AX par le VHH C6B. Une immunofluorescence a été conduite sur des cellules HeLa sauvages ou délétées pour le gène de H2AX (H2AFX) à la concentration de 10 ng/ml et un marquage nucléaire aspécifique est observable sur les 2 lignées cellulaires (Figure 50). Ce résultat indique que le VHH C6B est capable de reconnaître un antigène nucléaire autre que H2AX.

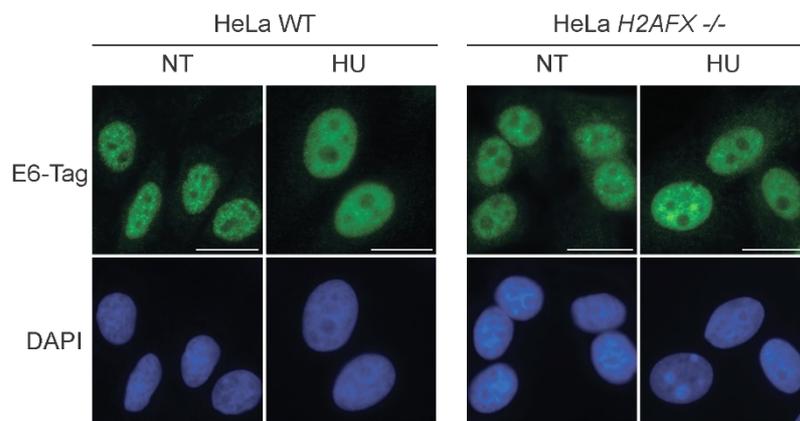


Figure 50 : IF avec le VHH C6B (10 ng/ml) révélé par le tag E6 sur des cellules HeLa et HeLa H2AFX -/- traitées 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Cette caractérisation par immunofluorescence, en plus d'avoir permis la détermination de la concentration efficace du VHH C6B a également mis en évidence que la bivalence a généré une cross-réactivité envers un antigène nucléaire non identifié. Cette cross-réactivité n'a pas été observée avec le VHH C6 monovalent. De plus, le faible écart de concentration en VHH entre le signal spécifique et non spécifique indique également que la fenêtre de spécificité du VHH C6B est très restreinte. Il a ainsi été observé qu'un doublement de la concentration conduit à l'observation d'un marquage aspécifique.

3.2.4 Caractérisation *in cellulo* :

Pour caractériser le VHH C6B *in cellulo*, des expériences de transduction et de transfection de sa séquence codante ont été réalisées.

3.2.4.1 Transduction

La protéine purifiée a été électroporée dans des cellules vivantes qui ont ensuite été incubées en présence ou non d'agents génotoxiques.

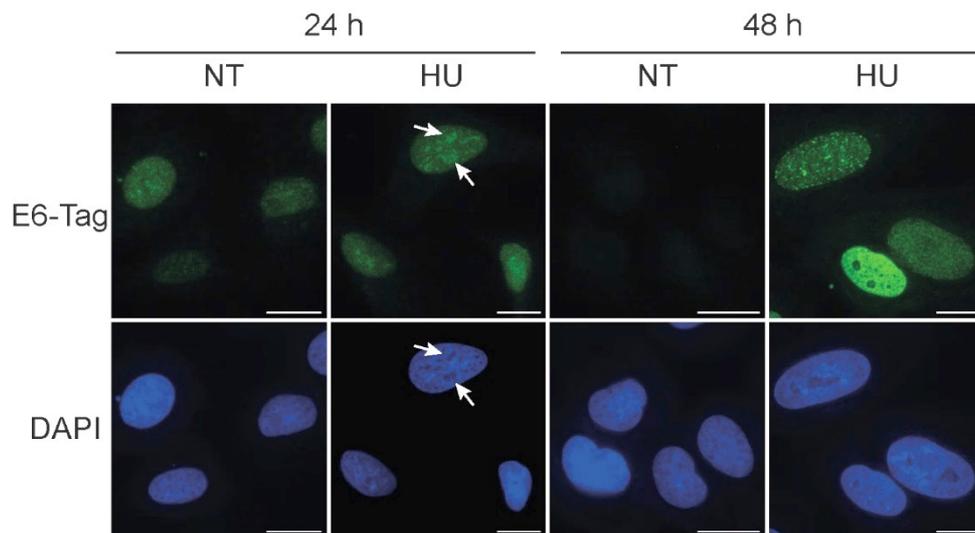


Figure 51 : Transduction du VHH C6B dans des cellules U2-OS et traitement pendant 24 ou 48 h. 2 μg pour 10^5 cellules par transduction ; NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μm .

La quantité de 2 μg de VHH C6B pour 10^5 cellules a permis de visualiser la phosphorylation de H2AX après 48 h de traitement au HU (Figure 51). Dans ces conditions, γ -H2AX est parfaitement détectable sous forme de foci ou d'un marquage pan-nucléaire et pratiquement aucun signal n'est détecté dans les cellules non traitées après 48 h d'incubation. Ce protocole

de transduction a été reproduit pour fournir les images de microscopie confocale présentées dans l'article (Figures 4E et S3C). Ces conditions de transduction n'ont en revanche pas permis d'observer l'induction de γ -H2AX après 24 h d'incubation. En effet, dans ces conditions un signal aspécifique important est détecté dans les cellules non traitées, ne permettant de distinguer γ -H2AX du signal aspécifique. Lors de la révélation du VHH C6B dans les cellules incubées 24 h, des régions de fluorescence plus intenses peuvent être détectées dans le noyau des cellules traitées ou non. Ces régions semblent correspondre aux nucléoles (flèches blanches) et ce phénotype n'a pas été observé en immunofluorescence.

L'utilisation de 2 μ g de de VHH C6B pour 10^5 cellules a permis l'observation spécifique de γ -H2AX après 48 h lors de l'induction d'un stress réplcatif intense. Après 48 h d'incubation, le signal dans les cellules non traitées s'est avéré négligeable comparé à la phosphorylation pan-nucléaire de H2AX. En se basant sur ces résultats, nous avons expérimenté une incubation de 24 h avant le traitement des cellules pour 24 h dans le but de distinguer l'absence de phosphorylation des inductions faible et forte de γ -H2AX (Figure 52).

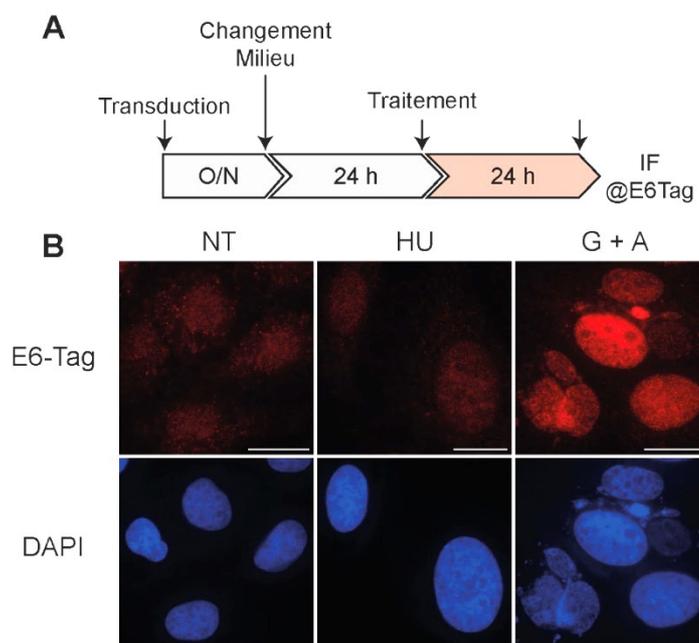


Figure 52 : Transduction du VHH C6B dans des cellules U2-OS, incubation de 24 h et traitement pendant 24 h. (A) Protocole suivi, 2 μ g pour 10^5 cellules par transduction. (B) IF avec l'anticorps 4C6. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Ces conditions ont permis de distinguer comme précédemment l'induction forte de γ -H2AX (condition G + A). En revanche, ces conditions n'ont pas permis de distinguer clairement l'induction faible de γ -H2AX consécutive d'un traitement de 24 h à l'hydroxyurée du fait de la présence d'un signal aspécifique important dans les cellules non traitées comparé aux cellules traitées à l'hydroxyurée. Ainsi, lors de son utilisation en transduction, le VHH C6B n'a permis de ne mettre en évidence que la phosphorylation pan-nucléaire de H2AX.

3.2.4.2 Transfection

Lors de la transfection de la séquence codante du VHH C6B, celui-ci présente une localisation nucléaire systématique, en présence ou en absence de stress répliatif (Figure 5A de l'article n°2). Les tests d'extraction au tampon CSK réalisés avec le VHH C6 bivalent sont présentés en figure 5C de l'article n°2. Lors de l'observation de cellules transfectées avec la séquence codante du VHH C6B et présentant de faibles niveaux d'expression du VHH un signal exclusivement nucléaire a été détecté indiquant que les VHHs synthétisés dans les cellules après transfection se localisent en premier lieu dans le noyau. Dans ce cas, les cellules soumises à un stress répliatif intense (traitement à l'hydroxyurée pendant 48 h) présentent un marquage pan-nucléaire constitué d'une multitude de foci adjacents comme cela peut être observé en immunofluorescence ou en transduction (Figure 53).

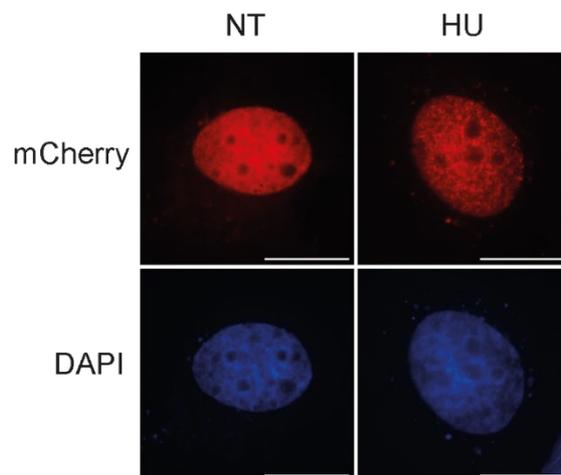


Figure 53 : Transfection du VHH C6B dans des cellules H1299 et incubation de 48 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Si ce marquage correspond effectivement à des foci de γ -H2AX, l'hypothèse pouvant expliquer ce marquage spécifique dans ces cellules traitées serait un équilibre entre le nombre de VHHs synthétisés et le nombre d'histones H2AX phosphorylées. Néanmoins, dans la grande majorité

des cas, l'approche par transfection, du fait de l'absence de contrôle sur le nombre de VHHs synthétisés et de l'accumulation nucléaire de ceux-ci, ne permet pas la visualisation spécifique de γ -H2AX.

3.2.5 Conclusions

La caractérisation du VHH C6B nous a montré que ce VHH est fonctionnel et que la bivalence, par la création d'une avidité, fournit un réactif adapté à l'observation *in cellulo* de γ -H2AX. Les caractérisations par immunofluorescence et transduction ont clairement montré que le VHH C6B reconnaît de façon aspécifique un antigène nucléaire sans que celui-ci n'ait pu être précisément identifié. Le VHH C6B a été développé dans le but de suivre la dynamique de l'apparition de γ -H2AX. L'approche par transduction ne semble pas adaptée à cette observation dynamique du fait de la présence d'un signal nucléaire observable indépendamment de l'induction du stress répliatif. Cependant cette approche pourrait être utilisée pour étudier la dynamique des foyers de γ -H2AX dès que la phosphorylation atteint le stade pan-nucléaire, par exemple la relocalisation de foyers de H2AX dans certains sous-compartiments nucléaires. La caractérisation par transfection nous a montré que le VHH C6B peut reconnaître spécifiquement γ -H2AX lorsqu'il n'est pas présent en excès.

3.3 Témoin positif pour la liaison à un antigène nucléaire : le Chromatibody

Pour contrôler les résultats obtenus avec système LEXY, nous avons utilisé le Chromatibody (Cb), un VHH reconnaissant l'hétérodimère d'histone H2A-H2B présent dans les nucléosomes (Jullien et al., 2016), comme témoin capable de reconnaître un antigène nucléaire présent de façon constitutive. Ce VHH nous a été gracieusement fourni par le docteur Gladys Mirey. Ce VHH a été utilisé dans des expériences de transfection et une version bivalente ainsi qu'une version bispécifique constituée de l'association d'un Cb avec un VHH C6 ont été créées.

3.3.1 Le Chromatibody monovalent

Afin d'évaluer la force de l'interaction du Cb avec son antigène, il a été soumis à des tests d'extraction au tampon CSK.

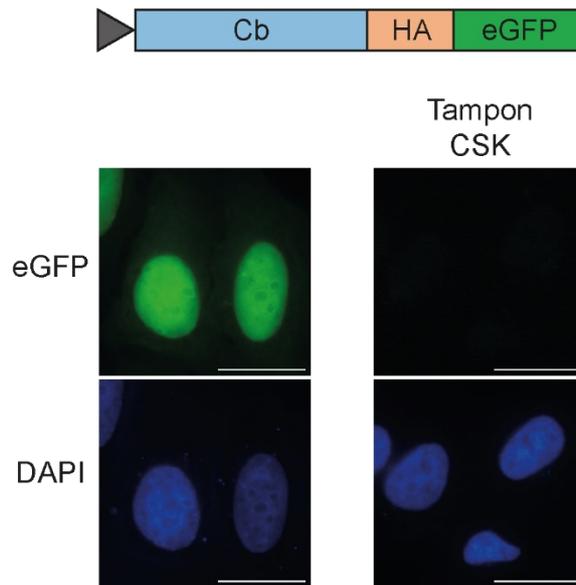


Figure 54 : Transfection du VHH CB dans des cellules HeLa et test au tampon CSK, incubation de 24 h. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Lors de son utilisation en transfection, le Cb a permis l'observation d'un signal fluorescent nucléaire homogène et intense avec les nucléoles apparaissant sous la forme de zones sombres. Ce marquage correspond à celui observé avec le DAPI et indique la reconnaissance des nucléosomes par le Cb, comme décrit dans (Jullien et al., 2016). L'utilisation du tampon CSK sur les cellules transfectées a abouti à la perte complète du signal, indiquant que la force de l'interaction entre le Cb et l'interface H2A-H2B n'est pas suffisante pour résister à l'extraction par le tampon CSK (Figure 54).

3.3.2 Le Chromatibody bivalent

Afin d'augmenter l'affinité apparente du Chromatibody, nous avons créé une version bivalente de ce VHH, le CbB. Ce Cb bivalent a été soumis au test d'extraction par le tampon CSK (Figure 55).

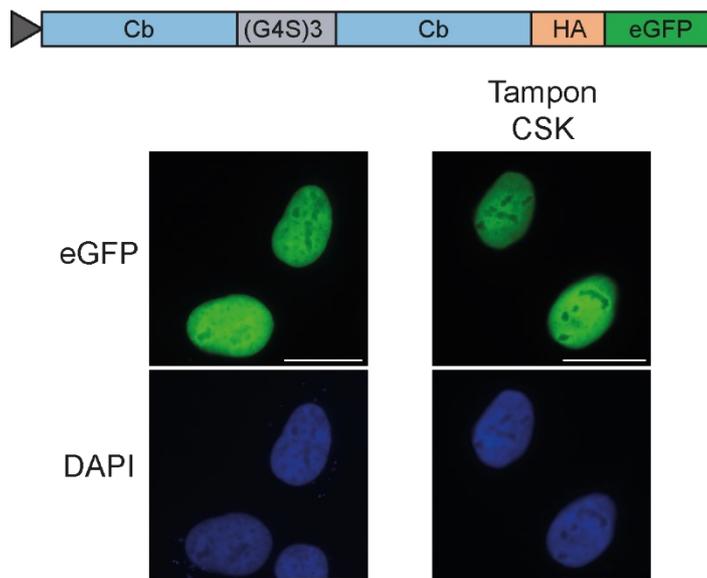


Figure 55 : Transfection des VHHs CbB dans des cellules U2-OS et test au tampon CSK, incubation de 24 h. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Lors de l'extraction avec le tampon CSK, la persistance du signal nucléaire indique que la bivalence permet d'augmenter l'affinité du Cb pour son antigène et de résister à l'extraction par le tampon CSK comme dans le cas du VHH C6B.

3.3.3 Le Chromatibody bispécifique

Les résultats obtenus jusqu'ici ont montré l'importance de la bivalence pour qu'un VHH puisse se fixer avec une affinité suffisante à son antigène. En se basant sur l'hypothèse que la liaison simultanée des 2 VHHs composant les versions bivalentes est à l'origine de l'augmentation de l'affinité apparente, nous avons développé un VHH bispécifique composé d'un VHH C6 associé à un Cb. Le Cb se lie à un antigène présent de façon constitutive et ne résiste pas sous forme monovalente à l'extraction par le tampon CSK. Le VHH C6 se lie à un antigène induit par le stress répliatif et ne résiste pas non plus sous forme monovalente à l'extraction par le tampon CSK. Nous espérons que l'association de ces 2 VHHs permettrait l'observation d'un signal nucléaire uniquement en présence des 2 antigènes, c'est-à-dire dans les cellules soumises au stress répliatif. Cette approche a été envisagée comme alternative au VHH C6B qui présente une cross-réactivité consécutive à la bivalence.

La construction codant pour ces 2 VHHs associés avec un linker a été transfectée dans des cellules qui ont ensuite été exposées ou non à un stress répliatif et certaines de ces cellules ont été soumises à l'extraction par le tampon CSK (Figure 56).

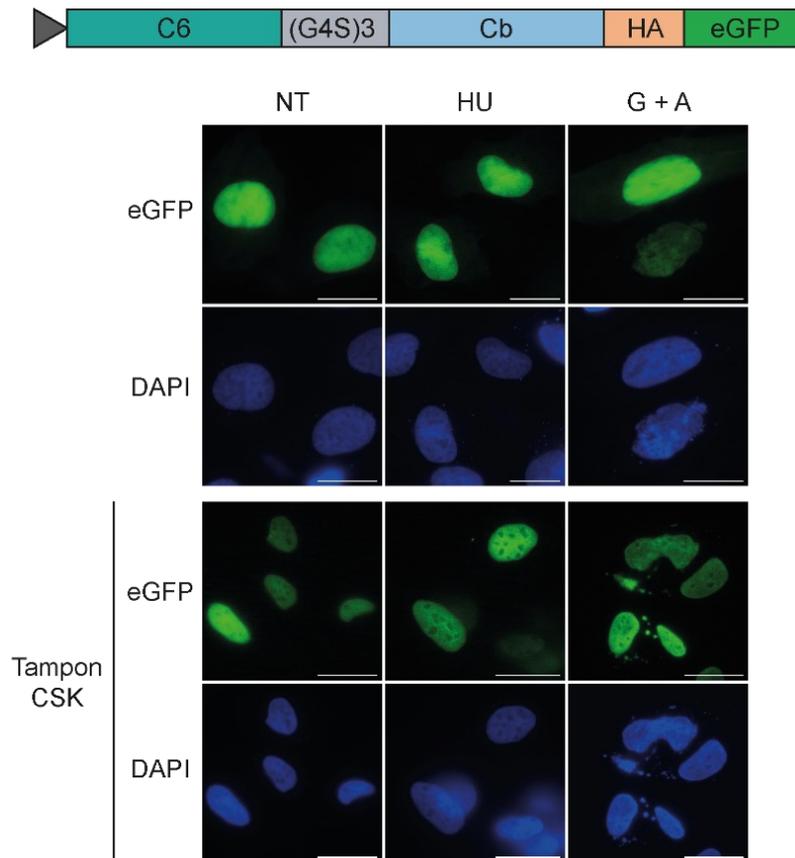


Figure 56 : Transfection du VHH CbH dans des cellules U2-OS et test au tampon CSK, incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

En absence d'extraction, l'hybride Cb-C6 localise dans le noyau des cellules et ce dans toutes les conditions. Il s'agit du résultat attendu du fait de la reconnaissance de l'hétérodimère H2A-H2B par le Cb et de la localisation nucléaire observée dans le cas du VHH C6.

Après extraction par le tampon CSK, une rétention nucléaire des VHHs dans toutes les conditions a été observée. Cependant une différence dans l'organisation du signal nucléaire peut être observée entre les cellules non traitées et traitées. Les cellules non traitées présentant un marquage homogène de l'ensemble du noyau, tandis que dans les cellules traitées, le signal semble s'organiser en de multiples foci contigus, semblable à l'organisation du signal γ -H2AX pan-nucléaire observable en immunofluorescence. La rétention de ce VHH dans les cellules non traitées est probablement due à une reconnaissance aspécifique d'un antigène par le VHH C6. Cette liaison aspécifique, non détectée dans le cas du C6 monovalent est peut-être permise par la stabilisation apportée par l'association avec le Chromatibody.

La nature bispécifique de cette construction ne permet de savoir à quel antigène correspond le signal observé. Bien que l'organisation du signal dans les cellules traitées puisse être

comparable au signal γ -H2AX observable en immunofluorescence nous n'avons pas pu conclure qu'il s'agisse réellement de γ -H2AX.

3.4 Témoin négatif pour la liaison à γ -H2AX : les mutants du VHH C6.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec le VHH C6B et son utilisation dans le système LEXY, nous avons décidé de développer un témoin négatif de la liaison à γ -H2AX. Pour cela, nous avons généré des versions mutées du VHH C6 ne présentant plus d'interaction avec γ -H2AX.

3.4.1 Mutations de la région CDR3

Afin de supprimer la reconnaissance de γ -H2AX par le VHH C6, nous avons décidé de modifier certains des résidus présents dans la région CDR3. 



Figure 57 : Séquences des CDR3 du VHH C6 et des 2 mutants générés, les résidus mutés sont indiqués en rouge

3.4.2 Purification des VHHs C6 mutés

L'analyse des différentes étapes de la purification des VHHs C6M1 et C6M2 montre qu'après expression cytoplasmique en système procaryote, ces VHHs sont présents majoritairement dans la phase soluble (Figure 58A et Figure 59A, colonnes S et I, encadré rouge). Lors du passage de cette phase soluble sur une colonne de chromatographie d'affinité chargée en nickel, ces VHHs sont retenus sur la colonne comme le montre l'analyse de l'effluent (Ft) et des fractions de lavage (W). Ces VHHs sont élués efficacement comme le montre la présence d'une bande à environ 15 kDa visible sur les fractions d'éluion. L'analyse des fractions d'éluions par chromatographie d'exclusion de taille permet de récupérer des fractions contenant uniquement les VHH mutés (Figure 58B et Figure 59B).

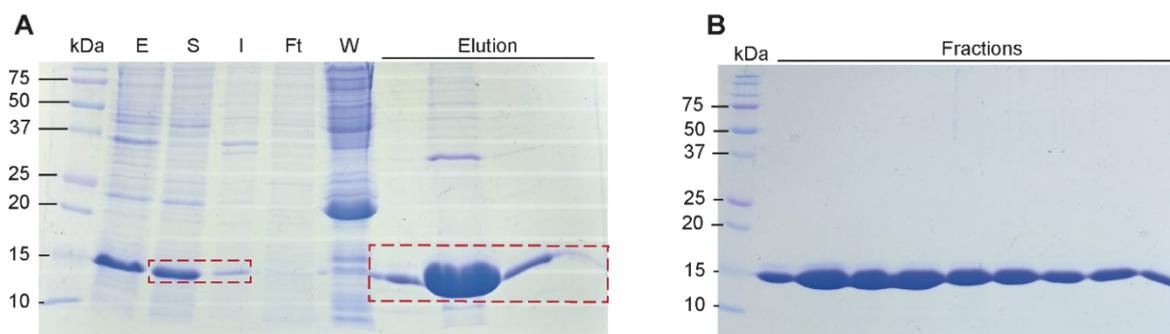


Figure 58 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% de la purification du VHH C6M1. (A) Analyse de l'expression chez *E. coli* BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'éluion obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

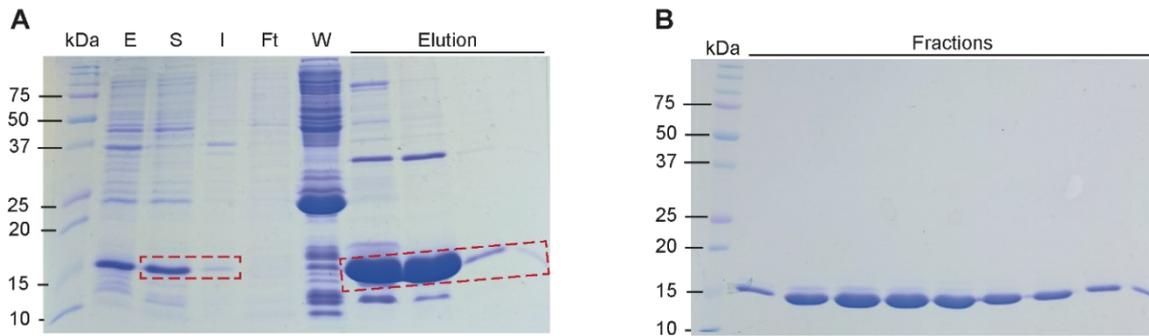


Figure 59 : Analyse par gel SDS-PAGE 15% de la purification du VHH C6M2. (A) Analyse de l'expression chez *E. coli* BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'élution obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

3.4.3 Caractérisation des mutants par test ELISA

Après leur production en système procaryote, les 2 VHHs C6 mutants ont été analysés par test ELISA en comparaison avec le VHH C6 (Figure 60).

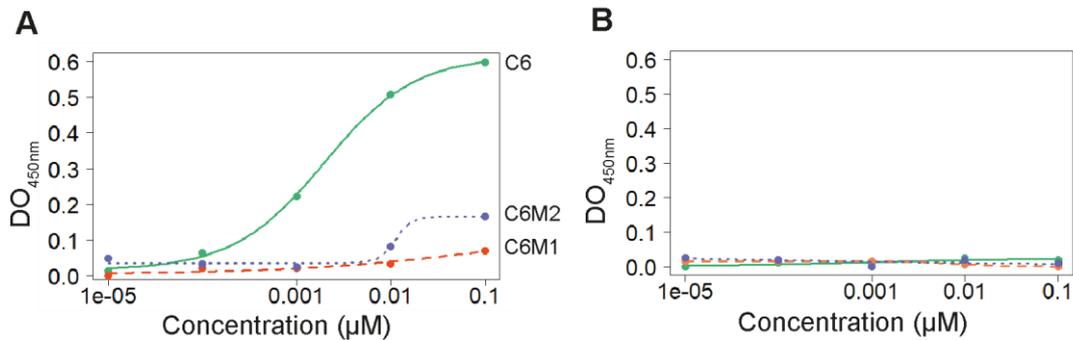


Figure 60 : Analyse par test ELISA des VHHs C6, C6M1 et C6M2 contre le peptide C-terminal de H2AX phosphorylé (A) ou non-phosphorylé (B)

Le test ELISA réalisé avec le peptide H2AX phosphorylé montre que le VHH C6 portant la mutation n°1 (C6M1) ne reconnaît que le peptide C-terminal de H2AX avec une phosphosérine en position 139. Tout comme le VHH C6 non muté, ce mutant ne reconnaît pas non plus la forme non phosphorylée de H2AX. Le VHH C6 portant la mutation n°2 (C6M2) présente quant à lui une interaction faible avec le peptide γ -H2AX à partir de la concentration de 0,1 μ M. Contre le peptide non-phosphorylé, comme pour les 2 autres VHHs, le C6M2 ne reconnaît pas la forme non phosphorylée de H2AX.

3.4.4 Evaluation de la solubilité après transfection dans les cellules

La solubilité des 2 VHHs lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules a été évaluée par transfection (Figure 61). Lorsqu'ils sont exprimés dans le cytoplasme des cellules, les VHHs C6M1 et C6M2 sont tous les 2 solubles. Comme pour l'ensemble des VHHs utilisés en transfection, ceux-ci montrent une accumulation nucléaire dans les cellules que celles-ci soient soumises à un stress réplcatif ou non.

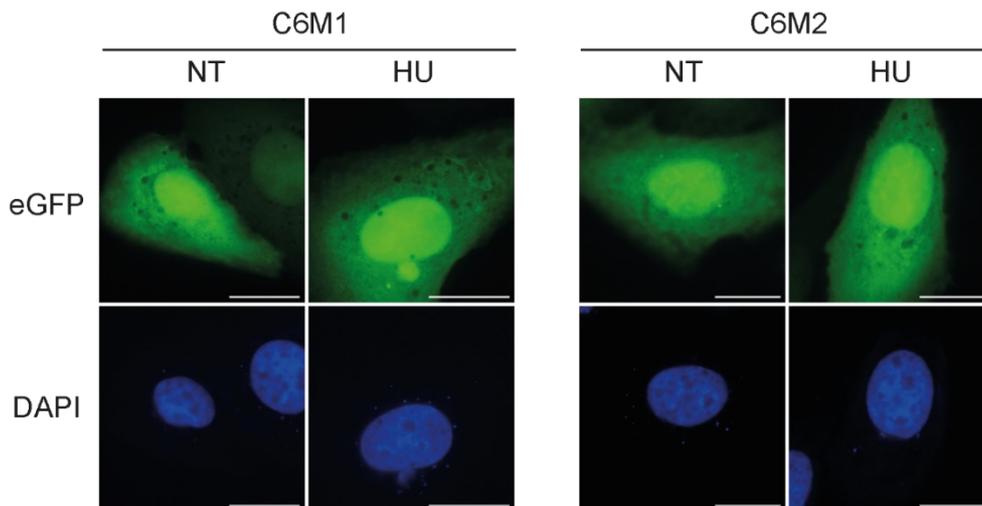


Figure 61 : Transfection des VHHs C6M1 et C6M2 dans des cellules U2-OS et incubation de 24h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

3.4.5 Résonance plasmonique de surface

Lors de la caractérisation des VHHs C6 et C6B par résonance plasmonique de surface, la capacité du VHH C6M1 à se lier aux peptides C-terminaux de H2AX phosphorylés et non phosphorylés a été évalué. Les résultats obtenus n'ont montré aucune réactivité de ce VHH envers les 2 peptides, confirmant ainsi les résultats obtenus par ELISA. [REDACTED]

3.4.6 Le VHH C6 muté bivalent (C6BM1)

3.4.6.1 Purification

La version bivalente du VHH C6M1, le C6BM1, a été généré par clonage moléculaire suivant le même protocole que pour la version bivalente du C6.

L'analyse des différentes étapes de la purification montre qu'après expression cytoplasmique en système procaryote, le VHH C6BM1 est présent dans les phases soluble et insoluble, indiquant que ce VHH muté bivalent s'agrège après expression cytoplasmique dans les bactéries (Figure 62A, colonnes S et I, encadré rouge). Lors du passage de cette phase soluble sur une colonne de chromatographie d'affinité chargée en nickel, le VHH C6B est retenu sur la colonne comme le montre l'analyse de l'effluent (Ft) et des fractions de lavage (W). Le VHH C6B peut être élué efficacement comme le montre la présence d'une bande à environ 30 kDa visible sur les fractions d'élution. L'analyse des fractions d'élutions par chromatographie d'exclusion de taille permet de récupérer des fractions contenant uniquement le VHH C6BM1 de taille attendue (Figure 62B).

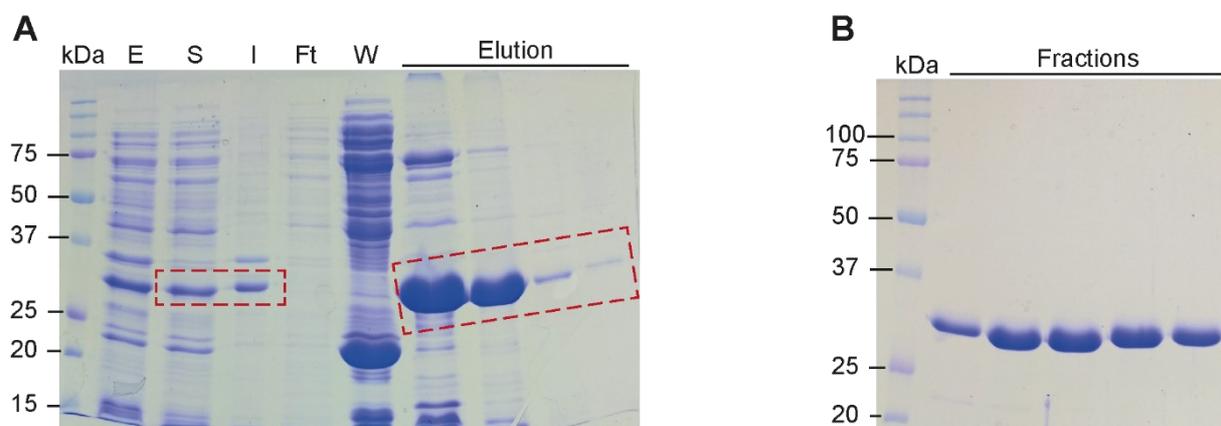


Figure 62 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification du VHH C6BM1. (A) Analyse de l'expression chez *E. coli* BL-21 et de la purification par affinité. (B) Analyse des fractions d'élution obtenues après purification par exclusion de taille. E : extrait total ; S : fraction soluble ; I : fraction insoluble ; Ft : effluent ; W : lavage.

3.4.6.2 Caractérisation par ELISA

La caractérisation du VHH C6BM1 est présentée dans l'article n°2 (Figure S3A).

3.4.6.3 Immunofluorescence

Le C6BM1 a été testé en immunofluorescence sur des cellules U2-OS traitées 24 h avec la combinaison G + V permettant d'induire un stress répliatif intense avec une observation de γ -H2AX pan-nucléaire (Figure 63). La caractérisation du VHH C6B avait mis en évidence une cross-réactivité de ce dernier du fait de son caractère bivalent. Afin d'exclure une potentielle reconnaissance aspécifique d'un antigène par le VHH C6BM1, ce dernier a été testé à la

concentration efficace du VHH C6B (2 ng/ml) ainsi qu'à la concentration de 10 ng/ml qui entraîne un marquage aspécifique dans le cas du VHH C6B.

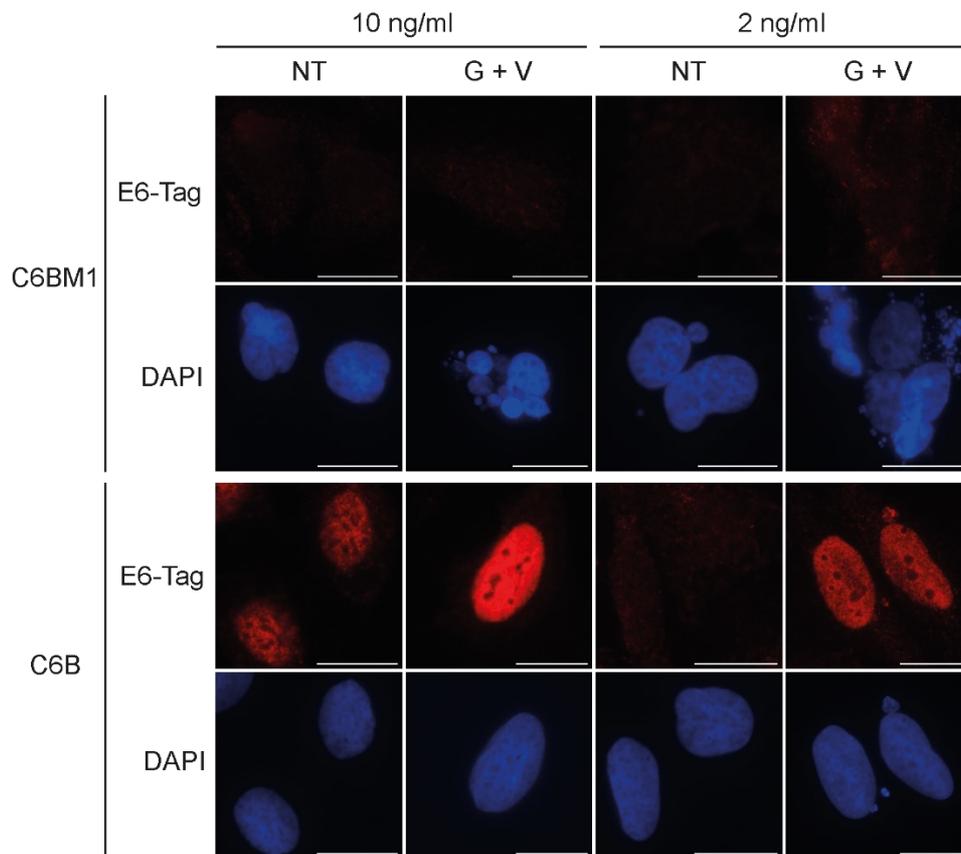


Figure 63 : IF avec les VHHs C6BM1 et C6B (révélés par le tag E6) sur des cellules U2OS traitées pendant 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Aucun signal n'a pu être observé lors de l'utilisation du VHH C6BM1 à ces 2 concentrations sur les cellules traitées ou non. Comme attendu, l'utilisation du VHH C6B à 2 ng/ml sur ces cellules a permis l'observation spécifique de γ -H2AX dans les cellules traitées. L'utilisation du VHH C6B à la concentration de 10 ng/ml sur ces mêmes cellules a conduit à l'observation d'un marquage aspécifique dans le noyau des cellules non-traitées.

Cette première étape de caractérisation nous a permis de conclure que le VHH C6BM1 ne reconnaît pas γ -H2AX ni un autre antigène cellulaire lors de son utilisation *in vitro*. Nous avons ensuite caractérisé ce mutant bivalent dans des expériences de transduction et de transfection pour évaluer son comportement *in cellulo*.

3.4.6.4 Caractérisation *in cellulo*

Les expériences de transduction du VHH C6BM1 sont présentées dans l'article (Figures 4C et S3D). Lors de la transfection de la séquence codante du VHH C6BM1, nous avons pu observer que ce dernier est parfaitement soluble, le remplacement des arginines par des résidus hydrophobes n'ayant pas d'impact sur sa solubilité dans le cytoplasme des cellules (Figure 64).

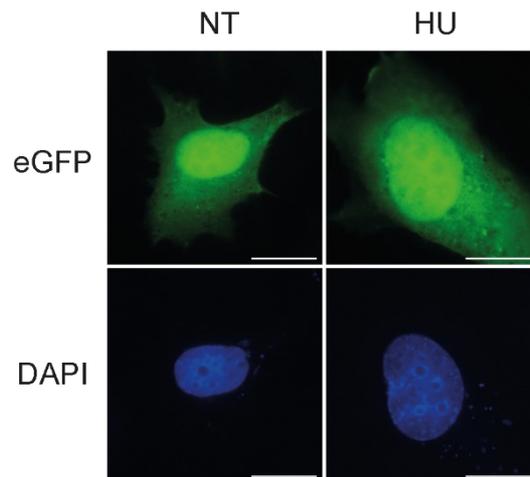


Figure 64 : Transfection du VHH C6BM1 dans des cellules H1299 et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

De façon surprenante Le C6BM1 dès lors qu'il est exprimé dans les cellules montre également une accumulation nucléaire que les cellules soient soumises à un stress répliatif ou non. Il semblerait donc que cette localisation nucléaire soit une caractéristique des VHHs que nous avons isolés étant donné que cette propriété a été retrouvée systématiquement.

3.4.7 Bilan de la caractérisation du VHH C6BM1

L'ensemble de la caractérisation du VHH C6BM1 nous a permis d'affirmer que ce VHH ne possède pas de réactivité contre un quelconque antigène. Il a ainsi pu être, utilisé comme témoin négatif pour confirmer la spécificité des observations faites avec le système LEXY.

3.5 L'export nucléaire constitutif

En prévision du développement du système d'export inductible, nous avons étudié la possibilité d'utiliser l'export constitutif des VHHs non liés par l'ajout d'une séquence d'export nucléaire (NES) à la séquence du VHH. Une séquence NES permet l'export des protéines qui la contiennent via l'interaction de cette séquence avec la protéine CRM1 et cette interaction

fait intervenir des résidus hydrophobes. L'objectif poursuivi était de relocaliser les VHHs non liés ou liés aspécifiquement au cytoplasme permettant de ne conserver que les VHHs liés à γ -H2AX dans le compartiment nucléaire.

3.5.1 Insertion de la séquence NES PKI α :

Pour expérimenter l'export constitutif des VHHs une séquence d'export nucléaire consensus a été utilisée : la séquence NES correspondant aux résidus 35 à 49 de la protéine PKI α (NES-PKI α) (Wen et al., 1995). Cette séquence correspond à une séquence NES consensus de classe 1a (Fung et al., 2015) (Figure 65).

Consensus, classe 1a : -- Φ XXX Φ XX Φ X Φ ---
NES-PKI α : NE**L**AL**K**L**A**GL**D**IN**K**T

Φ : *résidu hydrophobe*

Figure 65 : Alignement de la séquence d'export nucléaire de la protéine PKI α avec la séquence NES consensus de classe 1a. Les résidus hydrophobes participant à l'interaction avec la protéine CRM1 sont indiqués en gras.

Cette séquence NES a été clonée dans les VHH C6, C6B et Cb. Ces constructions ont ensuite été transfectées dans les cellules (Figure 66 et Figure 67). Dans le cas des VHH C6 et C6B, les cellules ont été traitées 24 h avec de l'hydroxyurée, ceci afin de générer un stress répliatif modéré permettant l'observation de foci de γ -H2AX.

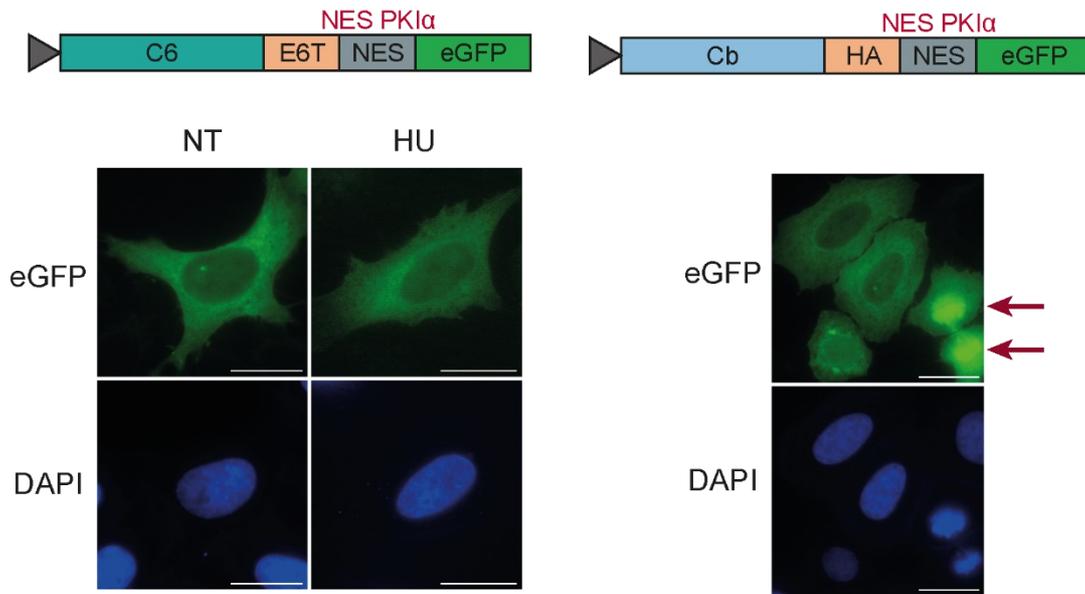


Figure 66 : Transfection des VHHs C6-NESPKI α et CB-NESPKI α dans des cellules HeLa et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

L'observation des cellules transfectées avec le VHH C6 possédant un NES montre un export systématique du VHH dans ces conditions et ceci en absence ou en présence de stress répliatif. Ce résultat était attendu compte tenu des résultats obtenus avec le tampon CSK sur des cellules transfectées avec le VHH C6. Dans le cas du Cb, l'ajout d'une séquence NES conduit également à l'export nucléaire de l'ensemble des VHHs, l'affinité du Cb ne lui permettant pas de rester fixé à son antigène dans ces conditions. Il a été possible d'observer des cellules à l'issue de leur division par mitose. De façon intéressante, malgré l'apparente reformation de la membrane nucléaire, un signal nucléaire est toujours observable dans ce cas (flèches rouges dans la Figure 66). Ceci semble indiquer que l'ensemble des composants de la machinerie d'export nucléaire ne sont pas immédiatement fonctionnels à l'issue de la division cellulaire.

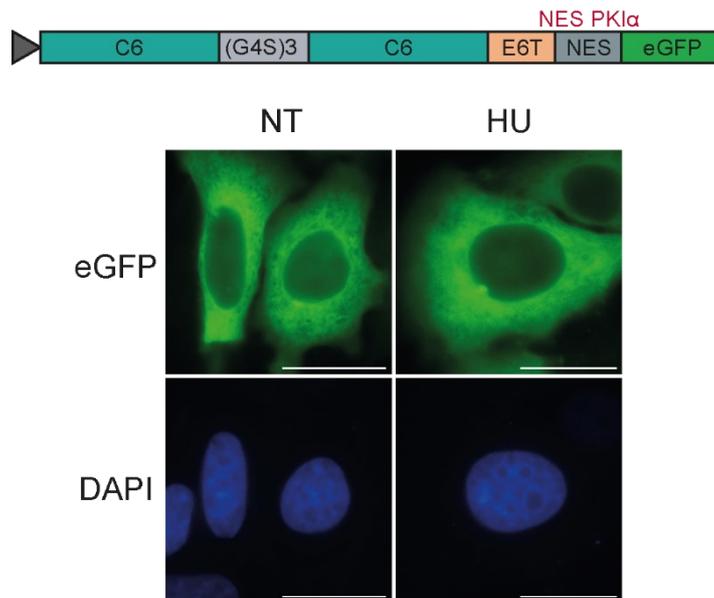


Figure 67 : Transfection des VHHs C6B-NESPKI α dans des cellules HeLa et incubation de 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Dans les cellules transfectées avec le VHH C6B possédant un NES un export nucléaire de l'ensemble des VHHs synthétisés a également été observé en présence ou non de stress répliatif. Ce résultat pourrait être expliqué par un possible export des VHHs du noyau avant qu'ils ne se lient à leur antigène. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons expérimenté l'ajout d'un signal de localisation nucléaire (NLS) sur les VHHs possédant un NES. Cette approche pouvant permettre d'adresser les VHHs au noyau pour permettre la reconnaissance de leur antigène et n'entraîner une relocalisation au cytoplasme qu'en absence de liaison. En effet, différentes études ont montré que lors de la présence simultanée d'une séquence NLS et d'une séquence NES sur une protéine, cette dernière présentait une localisation cytoplasmique indiquant que l'activité de la séquence d'export l'emportait sur le signal de localisation nucléaire (Fu et al., 2018; Sibling et al., 2003).

3.5.2 Ajout d'une séquence NLS

Deux séquences NLS caractérisées et décrites dans la littérature ont été utilisées : la séquence NLS de la protéine cMyc et la séquence NLS de la protéine SV40. Les séquences NLS retenues sont des NLS monopartite, l'interaction de ses signaux de localisation nucléaires avec l'importine requiert la présence d'acides aminés basiques (lysines et arginines), chargés positivement (Makkerh et al., 1996) (Figure 68).

NLS-SV40 : P**KKKR**KV
 NLS-cMyc : P**AAKR**VKLD

Figure 68 : Séquences des NLS SV-40 et cMyc. Les résidus lysines et arginines sont indiqués en gras

La transfection de ces constructions dans des cellules incubées en présence ou en absence d'hydroxyurée pendant 24 h a conduit à l'observation systématique d'un signal nucléaire, quel que soit la séquence NLS utilisée, rendant impossible l'observation d'un signal γ -H2AX spécifique (Figure 69).

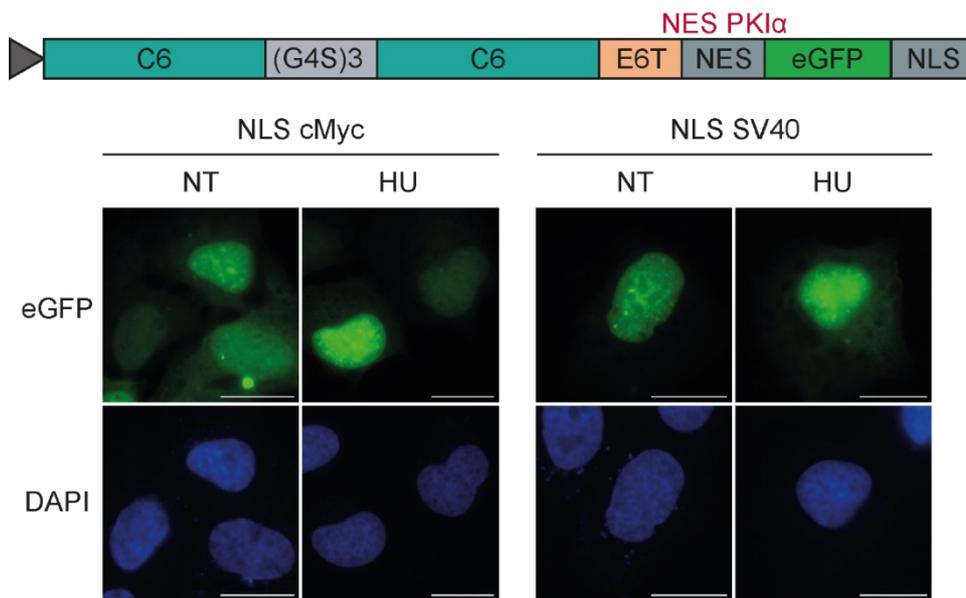


Figure 69 : Transfection des VHHs C6B-NESPKI α -NLS dans des cellules U2-OS et incubation de 40 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

3.5.3 Conclusions

Les expériences réalisées avec les séquences d'export et d'import nucléaire accessibles constitutivement sur les VHHs ne nous ont pas permis une visualisation spécifique de leur antigène nucléaire. Cette approche de relocalisation cytoplasmique des VHHs ne s'étant pas avérée fonctionnelle, nous nous sommes tournés vers l'utilisation du système LEXY permettant un export nucléaire inducible.

3.6 Le système LEXY

3.6.1 Description

Le protéine LEXY est système optogénétique permettant d'induire l'exposition d'une séquence d'export nucléaire en réponse à l'exposition de cette protéine à une lumière bleue (Niopek et al., 2016). Le système LEXY est basé sur le domaine LOV2 (Light Oxygen Voltage) de la phototropine-1 d'*Avena sativa*. Cette protéine possède en C-terminal une hélice α repliée contre le domaine LOV2 et cette hélice se déploie lorsqu'elle est exposée à une lumière bleue. Pour créer le système LEXY, l'équipe du professeur Di Ventura a modifié certains résidus de l'hélice α pour y intégrer une séquence NES. Cette construction permet de disposer d'un système d'export nucléaire inductible, la séquence NES n'étant exposée qu'en réponse à un stimulus (l'exposition à la lumière bleue) (Figure 70).

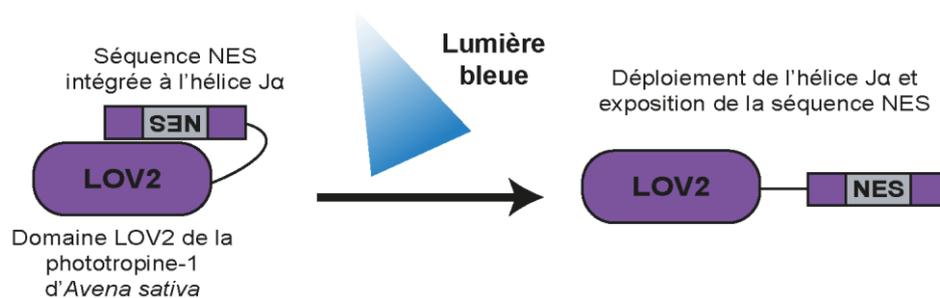


Figure 70 : Description du système d'export nucléaire optogénétique LEXY

Il a été montré que lorsque ce système est associé à des protéines se liant à une cible nucléaire, une partie d'entre elles restent localisées au noyau après l'induction de l'export, indiquant que les protéines liées au sein du compartiment nucléaire résistent à la relocalisation cytoplasmique. Ces observations nous ont permis d'envisager le système LEXY comme un moyen de relocaliser au cytoplasme les VHHs non liés ou liés de façon aspécifique, permettant ainsi de ne conserver à l'intérieur du noyau que les VHHs spécifiquement liés à γ -H2AX.

L'association d'un VHH anti- γ -H2AX au système LEXY a été développée pour pouvoir suivre l'apparition de γ -H2AX en temps réel sur des cellules vivantes. Lorsque des cellules transfectées avec cette construction sont soumises à un stress répliatif, l'induction de l'export des VHHs par le système LEXY doit permettre la rétention des seuls VHHs liés à γ -H2AX. La mesure du pourcentage de fluorescence nucléaire initiale restant après l'induction de l'export

donnant une appréciation du taux de H2AX phosphorylé par comparaison avec l'export mesuré dans les cellules non traitées. Le développement et la caractérisation du système LEXY associé au VHH C6B ont été réalisés par l'équipe du professeur Di Ventura. Nous avons cependant évalué si ce système pouvait être adapté pour une utilisation sur des cellules fixées en plus de la microscopie en temps réel.

3.6.1.1 Observations avec le système C6B-LEXY

La construction C6B-mCherry-LEXY a été transfectée dans des cellules H1299, traitées ou non avec de l'hydroxyurée pendant 40 h. A l'issue de cette incubation, les cellules ont été exposées à la lumière, afin d'activer l'export par le système LEXY ou bien conservées et fixées à l'obscurité afin de visualiser la localisation de la protéine en absence d'activation du système LEXY (Figure 71).

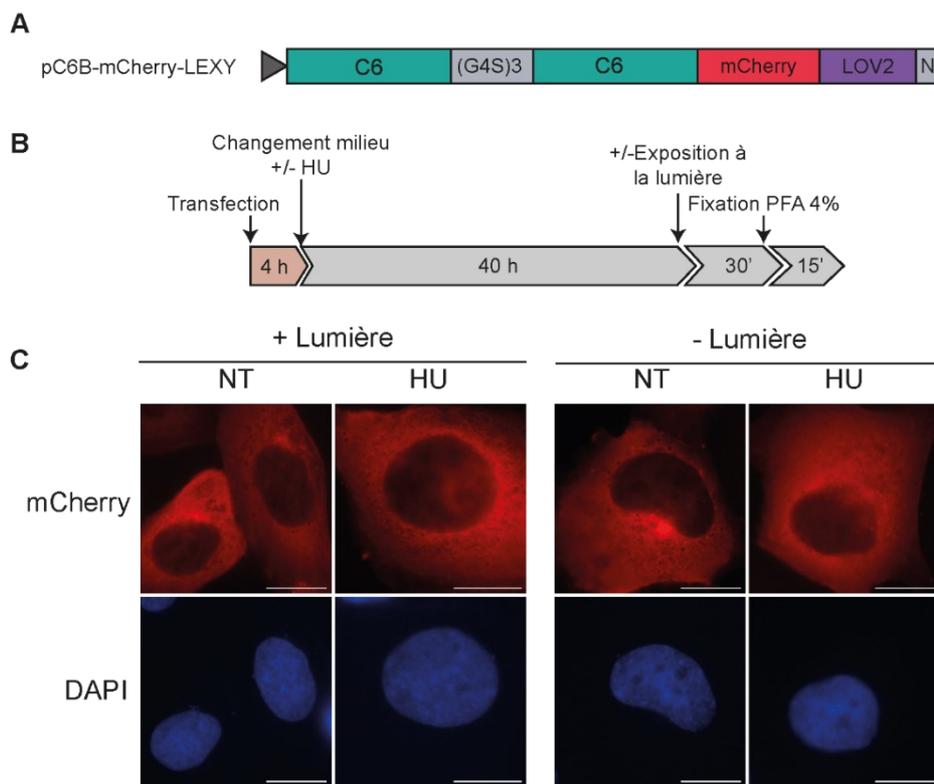


Figure 71 : Transfection du plasmide pC6B-mCherry-LEXY dans des cellules H1299 et incubation de 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

De façon surprenante, nous avons observé un export systématique de la protéine, en présence ou non de stress répliatif suite à l'activation du système LEXY, mais également

lorsque le système LEXY n'a pas été activé par l'exposition à la lumière. Ce résultat a également été observé dans des cellules U2-OS traitées avec le même protocole et l'équipe de l'université de Fribourg a obtenu des résultats similaires. Ces résultats indiquent qu'une accessibilité même faible de la séquence NES du système LEXY et ce après activation ou non du système par la lumière, conduit à un export de l'ensemble des VHHs. Cette conclusion nous a amené à intégrer une séquence NLS au sein du système LEXY, permettant ainsi un adressage préalable des VHHs au noyau avant leur relocalisation cytoplasmique.

3.6.1.2 Perméabilisation des cellules exprimant le système C6B-LEXY

Au cours d'une des expériences de caractérisation du plasmide pC6B-mCherry-LEXY, les cellules transfectées ont été perméabilisées par erreur avec 0,2% de Triton X-100 après exposition à la lumière et fixation 15 min au PFA 4% (Figure 72).

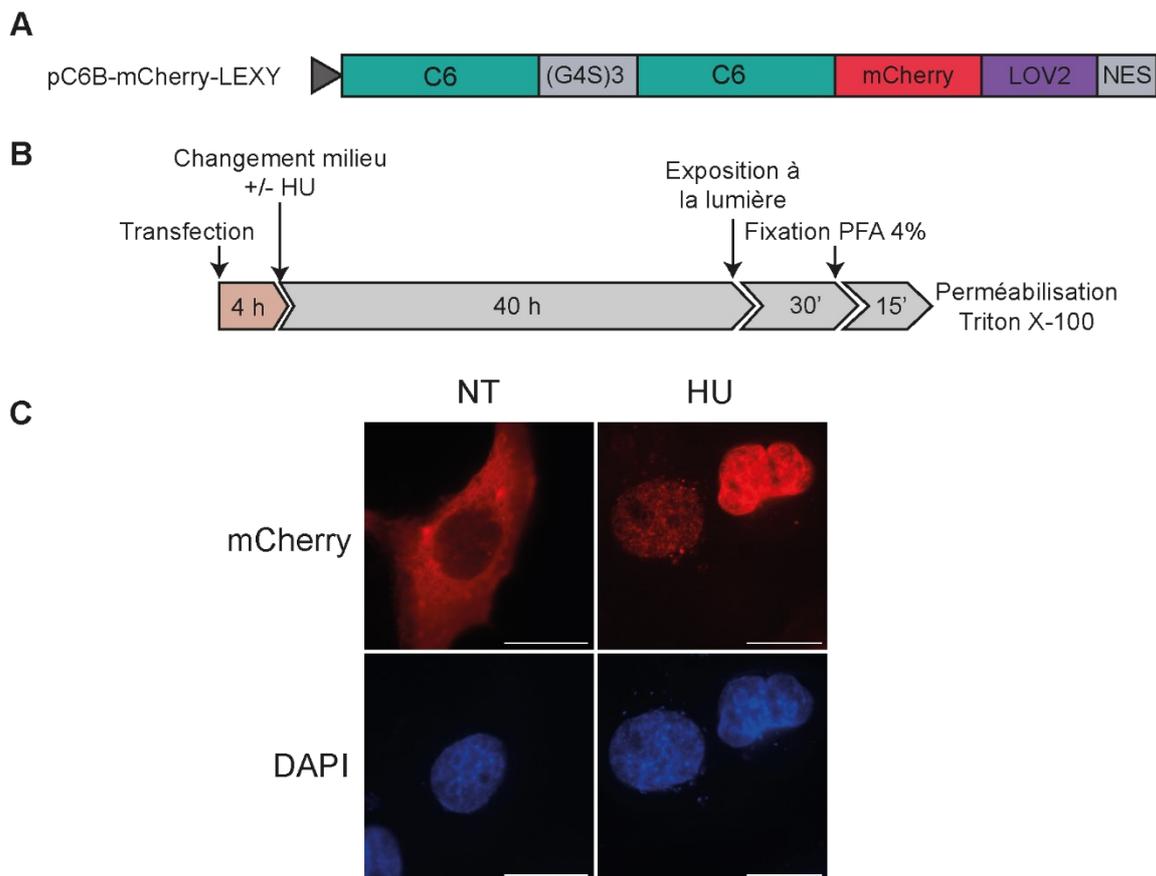


Figure 72 : Perméabilisation des cellules H1299 transfectées avec le plasmide pC6B-mCherry-LEXY et incubées 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

L'analyse de ces cellules en microscopie à fluorescence a permis l'observation des phénotypes idéalement attendus grâce au système LEXY. En effet la majorité des cellules non traitées présentaient un export nucléaire de la quasi-totalité des VHHs. Dans le cas des cellules traitées, un grand nombre présentaient un signal exclusivement nucléaire et l'organisation de ce signal était très proche du signal observé lors d'une immunofluorescence avec le VHH C6B de cellules traitées. En comparant ces résultats avec ceux obtenus précédemment, il a semblé que l'étape de perméabilisation ait permis cette observation. Cette expérience a donc été reconduite en testant 2 conditions de fixation différentes.

3.1.2.1 Influence du temps de fixation

Si l'étape de perméabilisation a permis aux VHHs C6B de reconnaître spécifiquement γ -H2AX, il est possible que les conditions de fixation utilisées n'aient pas été suffisantes pour immobiliser l'ensemble des protéines présentes au sein des cellules. Pour vérifier cette hypothèse, 2 temps de fixation au PFA 4% ont été testés : une fixation de 15 min et une fixation de 120 min (Figure 73).

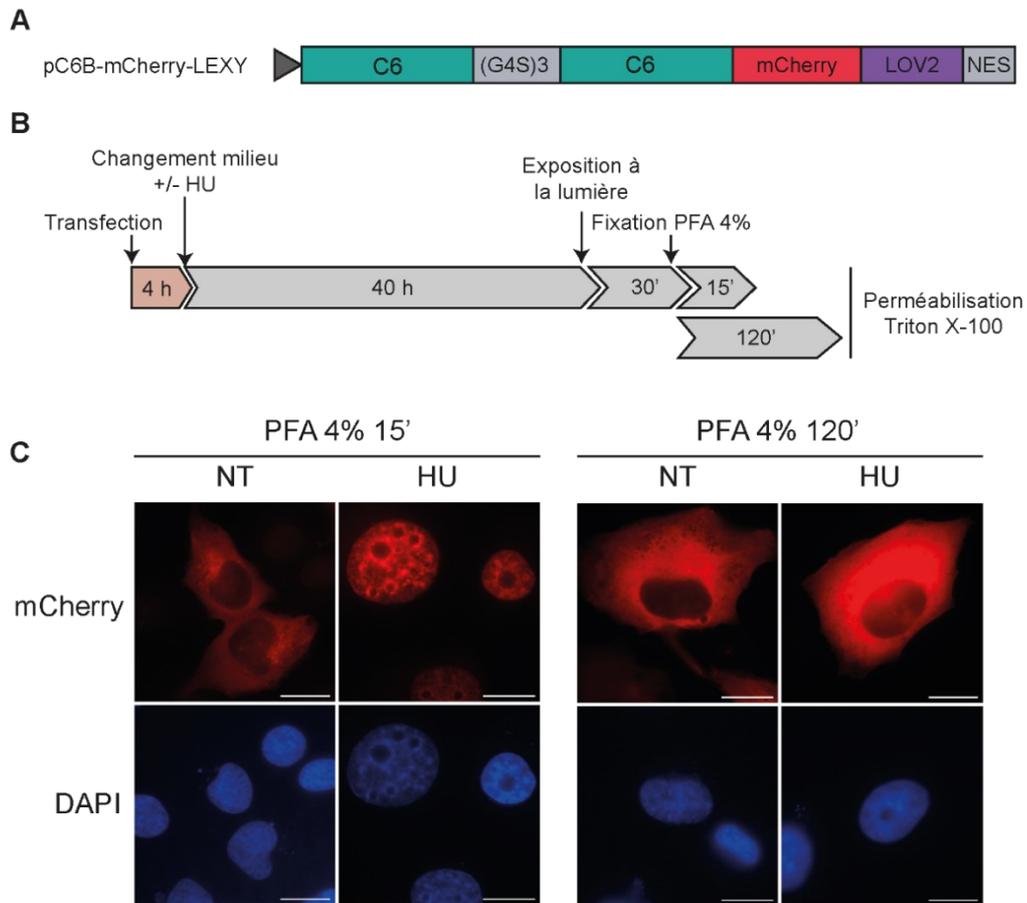


Figure 73 : Influence du temps de fixation sur la diffusion des VHHs. (A) Construction transfectée dans les cellules H1299. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Comme précédemment, une fixation de 15 min suivi d'une étape de perméabilisation a conduit à l'observation d'un phénotype similaire, à savoir export nucléaire des VHHs dans les cellules non traitées et marquage nucléaire dans les cellules traitées. En revanche après une fixation de 120 min le même phénotype qu'avec le plasmide pC6B-mCherry-LEXY en absence de perméabilisation a été observé. Ces résultats indiquent qu'après 15 min de fixation, l'ensemble des VHHs synthétisés dans les cellules ne sont probablement pas immobilisés et l'étape de perméabilisation permet alors leur diffusion. Une observation détaillée des lames de microscopie a révélé que les cellules soumises à un stress répliatif et présentant un marquage s'apparentant à γ -H2AX étaient pour la plupart localisées en périphérie d'une cellule surexprimant le VHH et dans laquelle un phénotype d'export nucléaire était observé (Figure 74A).

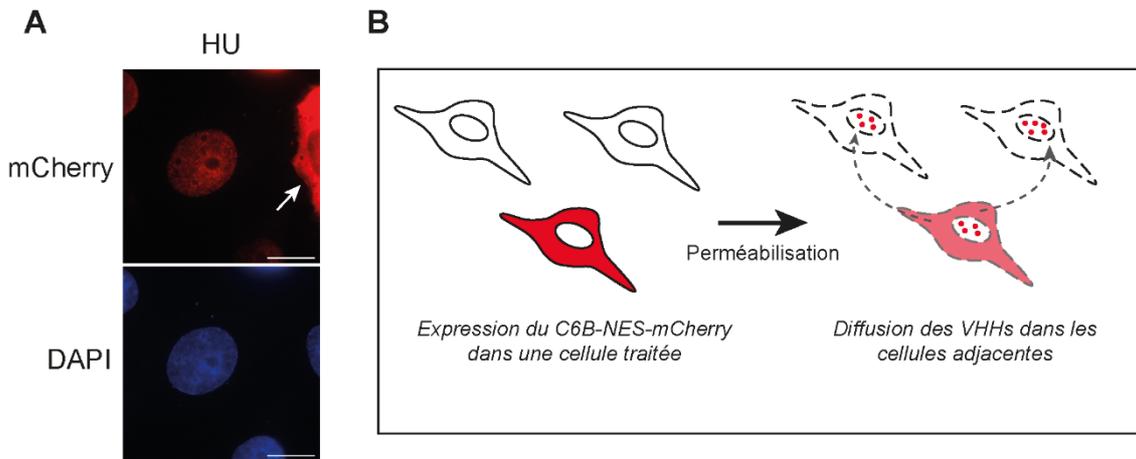


Figure 74 : Hypothèse permettant d'expliquer le marquage de γ -H2AX après un temps de fixation court. (A) Cellule avec marquage γ -H2AX au voisinage d'une cellule transfectée (cellules traitées à l'hydroxyurée). (B) Représentation schématique de la diffusion des VHHs consécutive de la perméabilisation des cellules.

Cette observation a permis de formuler l'hypothèse que les VHHs C6B surexprimés dans les cellules transfectées et exportés suite à la reconnaissance de la séquence NES par la protéine CRM1 peuvent, lorsqu'ils ne sont pas totalement immobilisés à l'issue de la fixation, diffuser dans les cellules situées à proximité. La perméabilisation des membranes permet également la reconnaissance de γ -H2AX dans le noyau de la cellule transfectée par les VHHs exportés (Figure 74B). Cette hypothèse est en accord avec les observations préalablement faites lors de l'utilisation du tampon CSK sur les cellules transfectées. Ces expériences avaient en effet montré qu'un nombre supérieur de cellules présentaient un signal nucléaire suite à la perméabilisation des membranes et à l'extraction des VHHs par le tampon CSK. Ainsi, il est possible de révéler γ -H2AX par immunofluorescence grâce à la diffusion des VHHs synthétisés dans une cellule transfectée avec leur séquence codante.

3.6.1.3 Observations avec le système NLS-C6B-LEXY

Du fait de l'export systématique des VHHs observés avec les plasmides pLEXY, une séquence NLS a été associée au système LEXY afin de permettre un adressage préalable des VHHs C6B au noyau avant leur export consécutif de l'exposition de la séquence NES. Nous avons analysé le comportement du système NLS-C6B-LEXY dans des cellules soumises ou non au stress répliatif (Figure 75).

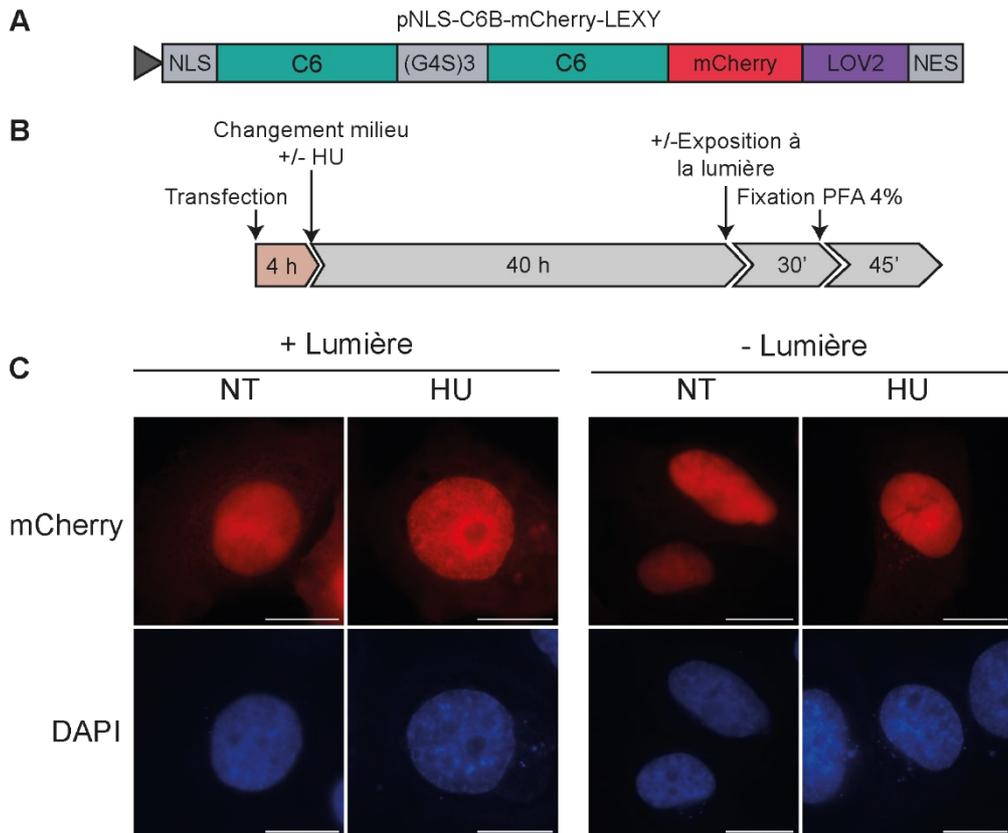


Figure 75 : Transfection du plasmide pNLS-C6B-mCherry-LEXY dans des cellules H1299 et incubation de 40 h. (A) Construction transfectée. (B) Protocole et temps d'incubations. (C) Observation en microscopie à fluorescence. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Dans toutes les conditions, le VHH C6B couplé au système NLS-LEXY a montré une localisation très majoritairement nucléaire. Dans les cellules incubées à l'obscurité, le signal nucléaire observé est homogène. Dans le cas des cellules où le système LEXY a été activé, un très faible signal cytoplasmique est détectable, indiquant l'export d'une fraction des VHHs. Dans le cas des cellules non traitées, le signal nucléaire observé est homogène, en revanche dans les cellules soumises à un stress réplcatif, ce signal nucléaire semble organisé en une multitude de foci suggérant une possible réorganisation des VHHs suite à la reconnaissance de γ -H2AX. Ces observations, réalisées sur des cellules transfectées avec le VHH C6B couplé au système NLS-LEXY et fixées, ne permettent pas de distinguer qualitativement les cellules traitées des cellules non traitées, ces dernières présentant toujours un signal nucléaire.

3.6.1.4 Conclusions

Ces observations, réalisées sur des cellules transfectées avec le VHH C6B couplé au système NLS-LEXY et fixées, n'ont pas permis de distinguer qualitativement les cellules traitées des cellules non traitées. Ces observations sont néanmoins à nuancer car les expériences réalisées avec ce système dans notre laboratoire l'ont été sur des populations de cellules fixées, ne renseignant pas sur la dynamique des processus en jeu. De plus l'utilisation de méthodes de transfections transitoires, ne permettant pas de contrôle des niveaux d'expression n'ont pas rendu possible la quantification des signaux nucléaire du fait de la grande disparité observée au sein de la population cellulaire. Cependant, les données acquises en microscopie en temps réel ont pu mettre en évidence une augmentation de la rétention nucléaire du VHH C6B lorsque les cellules sont soumises au stress réplicatif (Figures 6 et S4 de l'article n°2).

3.7 Marquage du VHH C6 pour l'imagerie temps réel

Nous avons également exploré la possibilité d'utiliser un VHH marqué transduit dans les cellules pour observer la dynamique de la phosphorylation de H2AX sur les cellules vivantes. Le marquage du VHH avec un fluorochrome permet sa détection directe et ne nécessite pas de fixer les cellules. L'utilisation d'un tel réactif dans les conditions de transduction établies précédemment pourrait permettre d'observer la dynamique du marquage γ -H2AX pan-nucléaire.

3.7.1 Conjugaison du VHH C6B avec des Alexa-488-NHS

La première stratégie retenue pour le marquage du VHH C6B a été la conjugaison de ce VHH avec un fluorochrome Alexa-488 activé avec un groupement NHS (N-Hydroxysuccinimide). Les groupement NHS peuvent réagir avec l'amine ϵ des résidus lysine permettant ainsi la conjugaison du fluorochrome sur ces résidus. Le VHH C6 comporte 3 résidus lysine situés dans la région FR3, soit 6 pour la version bivalente.

Le VHH C6B a été conjugué avec des Alexa-488-NHS suivant le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. Cette stratégie de marquage a permis d'obtenir des VHHs utilisables en immunofluorescence mais ne permettant la détection d'aucun signal après leur transduction dans les cellules. Les 3 lysines présentes dans la séquence du VHH C6 se trouvent toutes dans la région FR3. Du fait de la nature hydrophobe des fluorochromes Alexa, leur

conjugaison à des résidus proches les uns des autres a pu entraîner une augmentation locale de l'hydrophobicité aboutissant à l'agrégation des VHHs marqués. Cette hypothèse nous a amené à tester le couplage des VHHs avec des fluorochromes activés avec des groupements maléimides.

3.7.2 Conjugaison du VHH C6B avec des Alexa-488-maléimide

Les groupements maléimide peuvent se conjuguer aux groupements sulfhydryles portés par les résidus cystéines. Afin de procéder au marquage du VHH C6 avec des fluorochromes activés avec des groupements maléimides, des versions du VHH C6 modifiées par l'intégration de 1, 2 ou 3 cystéines (C61C, C62C et C63C respectivement) ainsi que leurs versions bivalentes (C6B1C, C6B2C et C6B3C) ont été créées selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes.

Les différentes étapes de mises au point ont permis de déterminer que les meilleurs résultats étaient obtenus lors du marquage du VHH C6B1C avec les Alexa-488-maleimide en utilisant un ratio équimolaire d'une molécule d'Alexa par cystéine disponible et une incubation à température ambiante. La mesure du degré de marquage (D.O.L.), valeur indiquant le nombre de fluorochromes par protéine, nous a indiqué que 40% des VHHs récupérés à l'issue de la réaction de marquage étaient conjugués à un Alexa (D.O.L. = 0,4).

Cette préparation a été utilisée en transduction et le tag E6 a été révélé par immunofluorescence à l'issue de l'incubation des cellules (Figure 76). Alors qu'un marquage γ -H2AX est observable lors de la détection du tag E6, l'observation du signal Alexa-488 n'a pas permis de révéler γ -H2AX. Cette absence de correspondance entre le signal Alexa-488 et le signal du tag E6 indique que les VHHs conjugués à un Alexa ne sont pas fonctionnels après transduction dans les cellules.

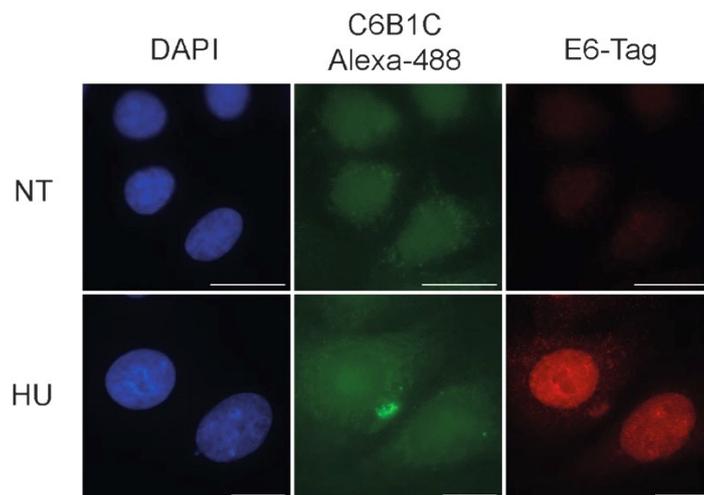


Figure 76 : Transduction du VHH C6B1C conjugué à l'Alexa-488-maléimide dans des cellules HeLa et traitement pendant 48 h. 3 µg/transduction ; NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 µm.

3.7.3 Conjugaison du VHH C6B avec des Sulfo-Cyanine3-maléimide

Les résultats obtenus avec les fluorochromes Alexa-488, nous ont amenés à tester la conjugaison du VHH C6B avec un fluorochrome plus soluble dans l'eau, la Sulfo-Cyanine3.

Le marquage avec les Sulfo-Cyanine3-maléimide a été réalisé sur le VHH C6B1C dans les conditions préalablement établies. Ce protocole de marquage a permis d'obtenir une population de VHHs présentant un D.O.L. faible de 0,34, indiquant que seulement 1/3 des VHHs étaient conjugués.

Cette préparation a permis de détecter de γ -H2AX dans les cellules traitées lors de son utilisation en immunofluorescence (Figure 77).

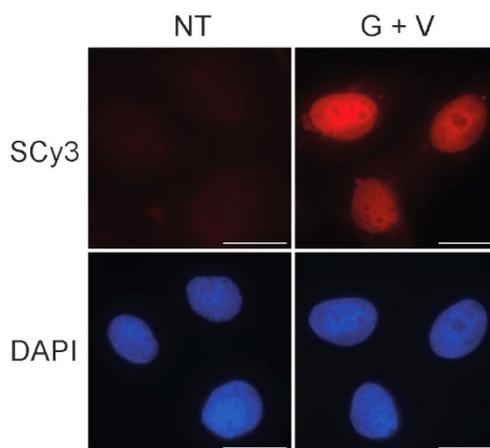


Figure 77 : IF avec le VHH C6B1C couplé à la Sulfo-Cyanine3-maléimide (10 ng/ml) sur des cellules U2-OS traitées 24 h. NT : non traité ; G + V : gemcitabine + VE-821. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 µm.

Lors de son utilisation en transduction cette préparation a permis d'observer l'induction forte de γ -H2AX suite à un traitement des cellules à l'hydroxyurée pendant 48 h (Figure 78).

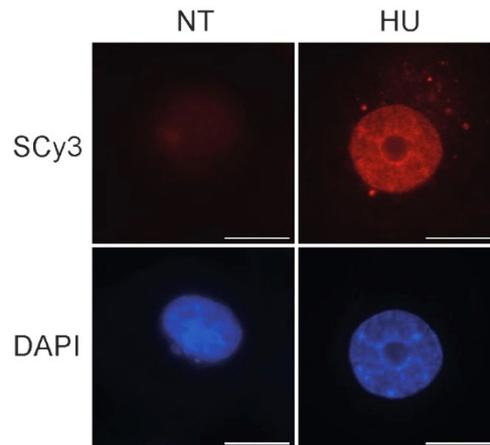


Figure 78 : Transduction du VHH C6B1C conjugué à la Sulfo-Cyanine3-maléimide dans des cellules H1299 et traitement pendant 48 h. $2 \mu\text{g}/10^5$ cellules. NT : non traité ; HU : hydroxyurée. Grossissement 630x, barre d'échelle : $20 \mu\text{m}$

Les conditions de marquages des VHHs à l'aide de fluorochromes ont montré que l'ajout d'une cystéine dans la séquence des VHHs permet d'obtenir un réactif adapté à la détection directe de γ -H2AX et vectorisable dans les cellules. Nous avons également mis en évidence que la nature de la molécule fluorescente utilisée est un paramètre important pour disposer d'un réactif soluble dans le milieu intracellulaire. Ce réactif fonctionnel dans les cellules vivantes peut être utilisé pour visualiser en temps réel la dynamique du marquage γ -H2AX pan-nucléaire.

4 Conclusions

Le VHH dirigé contre γ -H2AX isolé et caractérisé dans notre laboratoire est une des premières descriptions de la reconnaissance spécifique d'une MPT par un VHH *in vitro* et *in cellulo*. Comme de nombreux VHHs décrits dans la littérature, ce VHH est soluble et fonctionnel après sa vectorisation ou sa synthèse après transfection de sa séquence codante dans les cellules vivantes.

Nous avons mis au point un test rapide pour évaluer la robustesse de l'interaction entre le VHH et son antigène nucléaire grâce à l'extraction de protéines en utilisant le tampon CSK sur des cellules transfectées. Ce test nous a fait suspecter que l'affinité des VHHs monovalents

était insuffisante pour la mise au point d'un système permettant leur utilisation *in cellulo* par relocalisation des VHHs non liés ou ceux liés faiblement à leur antigène.

La création d'une version bivalente du VHH C6 s'est montrée capable, grâce à l'avidité apportée par la bivalence, de résister à une telle extraction. Cependant, bien que la bivalence du VHH C6 permette d'augmenter la stabilité de son interaction avec γ -H2AX et la capacité de ce VHH à détecter de faibles niveaux de γ -H2AX (foci), elle a aussi généré une reconnaissance d'un autre antigène nucléaire (liaison aspécifique). Dans les expérimentations *in vitro*, cette reconnaissance aspécifique a pu être minimisée grâce aux différentes étapes de lavage ainsi que par le contrôle de la quantité de VHHs utilisée.

La vectorisation par électroporation de ce VHH bivalent dans les cellules vivantes a permis de détecter l'induction pan-nucléaire de γ -H2AX. La fenêtre de spécificité réduite du VHH C6B n'a en revanche pas permis, après vectorisation du C6B dans les cellules vivantes, de distinguer l'induction faible de γ -H2AX (foci) du signal résiduel présent dans les cellules non traitées. Davantage de mises au point sont requises pour parvenir à distinguer clairement les foci de γ -H2AX consécutifs d'un stress répliatif modéré dans ces conditions.

La fonctionnalité du VHH après transfection de sa séquence codante a permis de développer une méthodologie permettant de relocaliser les VHHs non liés à γ -H2AX vers le cytoplasme. Grâce à cette approche, nous avons mis en évidence une augmentation de la rétention nucléaire des VHHs dans les cellules soumises au stress répliatif. Cependant les approches utilisant l'expression constitutive d'une séquence d'export nucléaire ne se sont pas avérées efficaces.

Enfin, nous avons montré que le VHH C6 peut être modifié par l'ajout d'une cystéine en position C-terminale permettant ainsi le couplage de ce VHH avec un fluorochrome, rendant possible son utilisation en transduction sur cellules vivantes ainsi qu'en immunofluorescence en une étape.

Quantification de γ -H2AX pour évaluer la létalité de traitements généotoxiques

1 Introduction

L'ensemble des résultats recueillis lors de la caractérisation du VHH C6 nous ont montré que ce réactif est adapté à la détection de γ -H2AX *in vitro*. La facilité de production de ce réactif en système procaryote associée à la possibilité de marquer ce VHH avec des fluorochromes nous ont permis d'envisager le développement d'une méthodologie permettant de détecter γ -H2AX par immunofluorescence en une étape. Nous avons précédemment montré que la détection d'un marquage γ -H2AX pan-nucléaire et de forte intensité est associée à un stress répliatif létal suite au traitement de cellules cancéreuses avec des inhibiteurs de la RnR (article n°1). En utilisant Le VHH C6 marqué, un criblage de molécules génotoxiques a été réalisé afin de déterminer si γ -H2AX peut être un indicateur de la létalité induite par le traitement de cellules cancéreuses avec d'autres familles de molécules génotoxiques.

2 Utilisation du VHH C6 pour la détection *in vitro* de γ -H2AX en une étape

En amont de la réalisation du criblage de molécules génotoxiques, les conditions de marquage du VHH C6, initialement établies pour disposer d'un réactif adapté à l'observation *in cellulo*, ont été affinées.

2.1 Test du marquage du C6 monovalent avec le protocole MLB

Jusqu'alors, les réactions de marquage du VHH C6 avec des fluorochromes activés avec des groupements maléimides avaient été réalisées dans du PBS à un pH compris entre 7 et 7,5 selon les recommandations du fabricant. Dans la littérature, certaines publications décrivent un protocole de conjugaison dans lequel les VHHs sont placés un pH légèrement acide (6,4) à l'aide d'un tampon de marquage maléimide (Maleimide Labeling Buffer, MLB). Le pH étant ensuite neutralisé à 7,5 juste après l'ajout du fluorochrome (Klein et al., 2018). Cette méthodologie a été comparée au marquage en PBS sur le VHH C6 monovalent intégrant 3 cystéines (C63C) en utilisant des fluorochromes Alexa-568-maleimide.

La détermination du D.O.L. ainsi que de la concentration protéique à l'issue de la réaction de conjugaison montre que ce protocole permet d'augmenter la quantité de VHHs récupérés ainsi que le nombre moyen de fluorochromes par VHH (Table 8).

Protocole	C63C MLB	C63C PBS
D.O.L.	0,7	0,52
Concentration (mg/ml)	0,82	0,53

Table 8 : D.O.L et concentration des VHHs obtenus avec les différents protocoles

Ces 2 VHHs marqués ont été évaluée par immunofluorescence (Figure 79). Les 2 VHHs se sont montrés capables de révéler la phosphorylation de H2AX dans les cellules traitées, avec toutefois l'observation d'un signal plus intense dans le cas des VHHs marqués avec le protocole MLB.

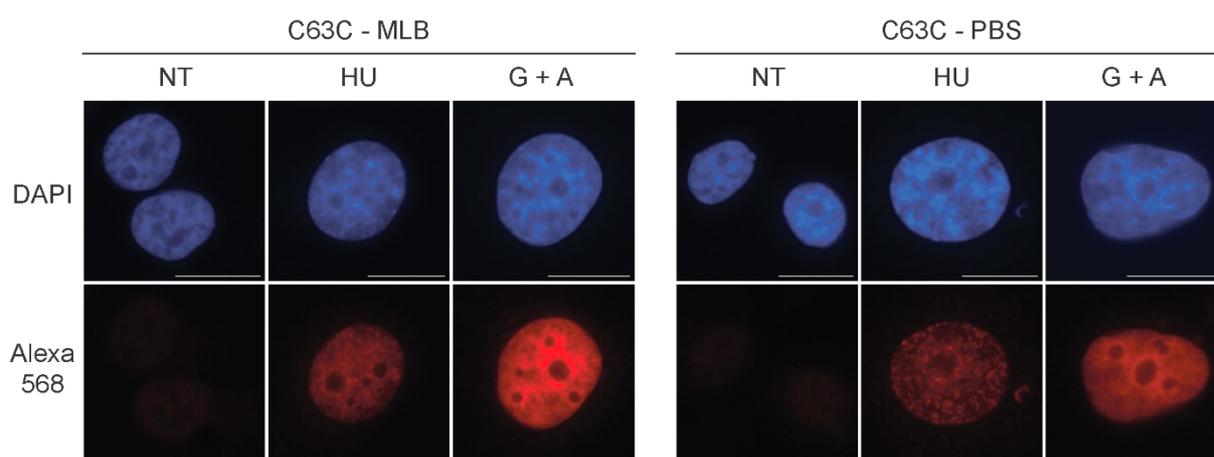


Figure 79 : IF avec les VHHs C63C couplés à l'Alexa-568-maléimide (200 ng/ml) sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Cette observation a été confirmée avec la quantification du signal nucléaire moyen obtenu après immunofluorescence dans les 2 conditions (Figure 80). Les données obtenues montrent que le VHH marqué avec le protocole MLB permet d'obtenir un signal plus intense dans les cellules présentant une induction forte de γ -H2AX.

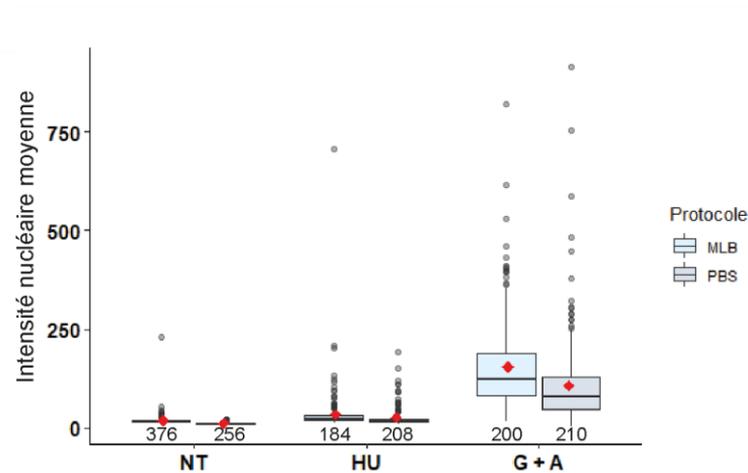


Figure 80 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C63C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

A l'issue de cette expérience, le VHH C6 monovalent intégrant 1 cystéine (C61C) a lui aussi été conjugué à un Alexa-568-maléimide en utilisant le protocole MLB. Ce protocole a permis d'obtenir une population de VHHs avec un D.O.L. de 0,72 (contre 0,10 lors du marquage PBS). Le C61C ainsi marqué a été comparé au VHH C63C marqué avec le protocole MLB par quantification du signal nucléaire obtenu (Figure 81). L'analyse des rapports signal/bruit de fond (S/BF) montre que les 2 VHHs permettent de révéler l'induction forte γ -H2AX dans les cellules traitées avec toutefois un signal aspécifique supérieur dans le cas du VHH C63C (S/BF = 1,85 contre 2,72 pour le C61C).

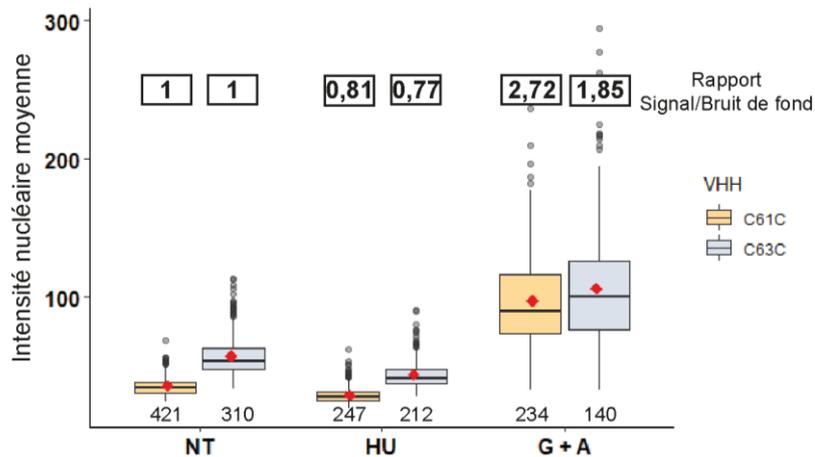


Figure 81 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C61C et C63C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Ces résultats montrent également que ces VHHs monovalents ne permettent pas la détection d'une induction faible de γ -H2AX (traitement de 24 h avec l'hydroxyurée, induisant majoritairement un marquage en foci). Ainsi, les rapports S/BF obtenus dans ces conditions sont inférieurs à 1, indiquant la détection d'un signal inférieur au bruit de fond mesuré dans les cellules non traitées.

Ces observations nous ont amené à évaluer l'efficacité du VHH C6B marqué avec un Alexa 568 comme réactif pour la détection de γ -H2AX en une étape. En effet, bien que présentant une cross-réactivité, ce réactif peut permettre une détection de plus faibles niveaux de γ -H2AX, du fait de son interaction plus stable avec γ -H2AX.

2.2 L'importance de la bivalence pour la détection des foci de γ -H2AX

Le VHH C6B1C a été conjugué à un Alexa-568-maléimide en utilisant le protocole MLB mis au point précédemment. L'analyse du D.O.L. a permis de déterminer que 93 % des VHHs étaient conjugués à un Alexa à l'issue de la réaction de conjugaison. Pour comparer l'efficacité du C6 bivalent comparé au monovalent, tous les 2 ont été utilisés en immunofluorescence dans les mêmes conditions que précédemment et le signal nucléaire obtenu a été quantifié (Figure 82).

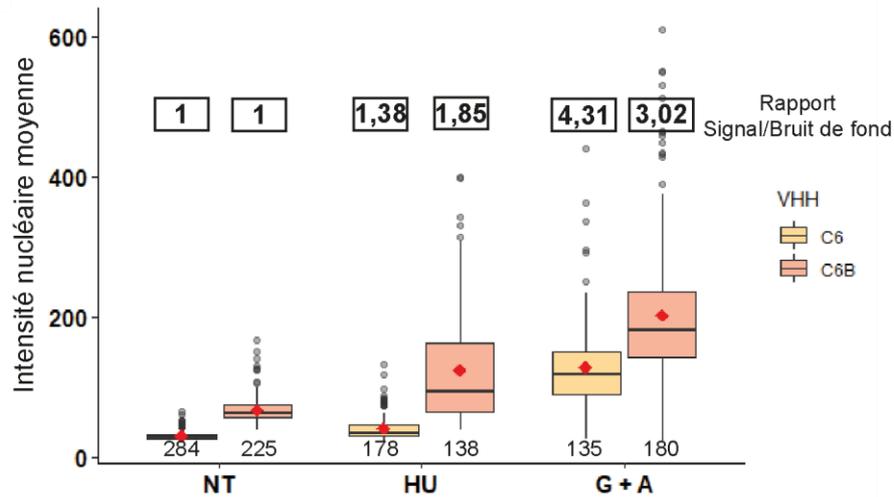


Figure 82 : Quantification des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C61C et C6B1C sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les résultats obtenus lors de cette expérience montrent que la bivalence rend le VHH C6 plus efficace pour révéler l'induction faible de γ -H2AX consécutive d'un traitement de 24 h à l'hydroxyurée (Rapport S/BF = 1,85 contre 1,38 pour le C61C). Bien que générant un bruit de fond supérieur dans les cellules non traitées, à l'origine d'un rapport S/BF moins favorable dans la condition G + A, le C6B apparaît dès lors comme l'outil le plus adapté pour la détection *in vitro* de γ -H2AX. Cette observation a été confirmée lors de la comparaison de ces 2 réactifs et de l'anticorps monoclonal 3F4 sur des cellules traitées avec des concentrations croissantes de cisplatine (Figure 83).

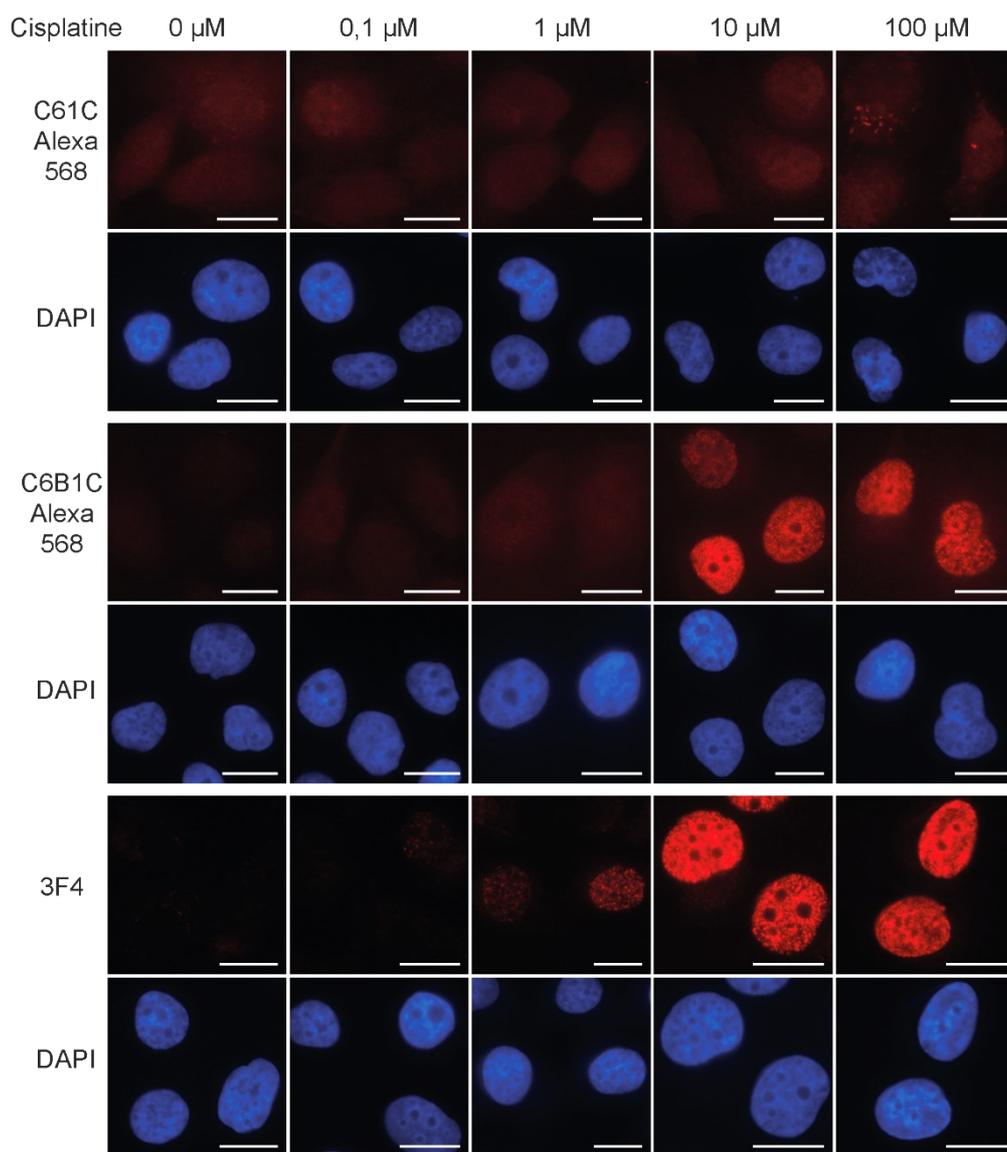


Figure 83 : IF avec les VHHs C61C, C6B1C (marqués avec un Alexa-568) ou l'anticorps 3F4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de cisplatine. Grossissement 630x, barre d'échelle : 20 μ m.

Lors de cette expérience, le VHH C6 monovalent n'a pas permis de mettre en évidence l'induction de γ -H2AX dans les cellules traitées avec 10 ou 100 μ M de cisplatine. Le C6B quant à lui a permis de mettre en évidence cette induction de façon comparable à l'anticorps 3F4. Il est à noter que l'induction la plus faible observée dans les cellules traitées avec 1 μ M de cisplatine n'a pu être révélée qu'avec l'anticorps 3F4.

2.3 VHH C6B fusionné à la mCherry comme alternative au VHH C6B marqué

En parallèle du développement du VHH C6B conjugué à un Alexa-568, le VHH C6B fusionné à la mCherry a été produit en système procaryote et caractérisé pour son utilisation en

immunofluorescence par une étudiante de Master I, Danbao Ma. Cette protéine de fusion s'est révélée performante en immunofluorescence et les quantifications des signaux nucléaires obtenus avec le VHH C6B marqué, le VHH C6B fusionné à la mCherry et l'anticorps 3F4 sur des cellules H1299 traitées 24 h sont présentés dans la Figure 84.

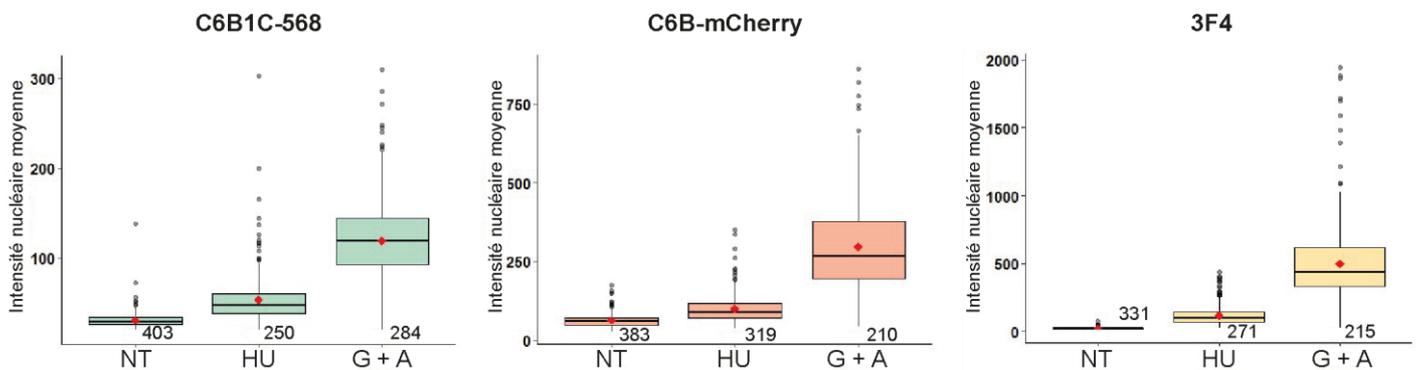


Figure 84 : Quantification des intensité nucléaire moyennes obtenues après IF avec les VHHs C6B1C couplés à l'Alexa568, C6B fusionné à la mCherry et l'anticorps 3F4 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les profils obtenus avec ces 3 réactifs sont similaires indiquant que le VHH C6B fusionné à la mCherry peut constituer une alternative à l'utilisation du VHH C6B marqué pour la détection de γ -H2AX en immunofluorescence.

2.4 Conclusions

L'utilisation du protocole MLB a permis d'augmenter l'efficacité du couplage des Alexa-568-maléimide aux VHHs pourvus de cystéines accessibles comme en attestent les D.O.L. supérieurs obtenus avec ce protocole. Les expériences de mises au point ont également montré que le VHH C6 monovalent bien que spécifique de la forme phosphorylée de H2AX n'est pas un réactif assez sensible pour révéler l'induction faible de γ -H2AX. Nous avons donc choisi d'utiliser le VHH C6B marqué pour réaliser le criblage des molécules génotoxiques. En effet bien que présentant une reconnaissance aspécifique d'un autre antigène, ce VHH présente une sensibilité adaptée à la détection de γ -H2AX même lorsqu'il est faiblement induit.

3 Criblage de produits géotoxiques

A l'aide du VHH C6B marqué, nous avons réalisé une analyse de l'induction de γ -H2AX consécutive au traitement de cellules avec différents produits géotoxiques. Cette analyse a été réalisée en premier lieu dans des cellules H1299, une lignée de cellules de cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC) déficiente pour la protéine p53. La même analyse a ensuite été conduite dans les cellules U2-OS, possédant une protéine p53 fonctionnelle afin d'évaluer l'impact du statut de la protéine p53 sur la réponse cellulaire aux différents traitements.

3.1 Mises au point initiales

3.1.1 Transformation logarithmique

Les quantifications du signal γ -H2AX ont jusqu'ici été représentées sous forme de « boxplots » en utilisant les valeurs brutes acquises en microscopie. Cette représentation permet une visualisation aisée de l'induction de γ -H2AX (Figure 85, graphique de gauche). Cependant, les données brutes obtenues ne sont pas distribuées selon une loi normale et les valeurs correspondant aux intensités γ -H2AX les plus fortes apparaissent comme des valeurs aberrantes. Ceci conduit à une distribution asymétrique des populations observées dans chaque condition. Afin de normaliser les résultats obtenus, la fonction logarithme de base 10 a été appliquée à l'ensemble des observations des valeurs d'intensité du signal γ -H2AX (Figure 85, graphique de droite). Les données acquises dans la suite du criblage des produits géotoxiques seront exprimées avec cette transformation logarithmique.

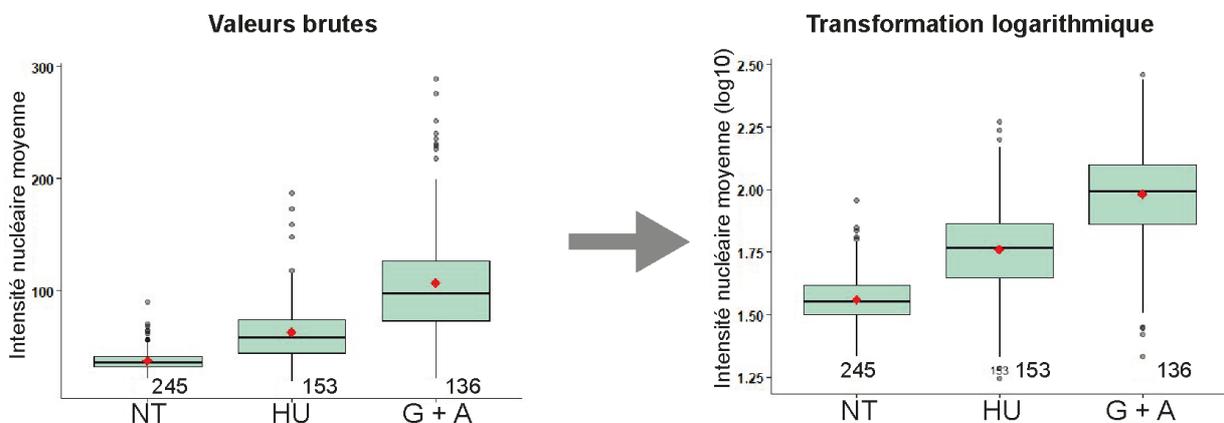


Figure 85 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec les VHHs C6B1C couplés à l'Alexa568 sur des cellules

H1299 traitées pendant 24 h. NT : non traité ; HU : hydroxyurée ; G + A : gemcitabine + AZD-7762. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

3.1.2 Détermination des concentrations létales

En plus des molécules génotoxiques utilisées dans les études présentées précédemment, le potentiel génotoxique de 2 autres inhibiteurs de la RnR utilisés en clinique a été évalué : la triapine et la clofarabine, seuls ou en combinaison avec l'inhibiteur de Chk1.

En parallèle des inhibiteurs de la RnR d'autres classes de molécules utilisés en chimiothérapie ont été évaluées, il s'agit d'inhibiteurs de la topoisomérase I (camptothécine, CPT), de la topoisomérase II (épirubicine, EPI et étoposide, ETO) et des sels de platine (cisplatine, CIS et oxaliplatine, OXA). Le cisplatine et l'étoposide sont utilisés en clinique dans le traitement de NSCLC (Wang et al., 2012). Notre objectif étant de déterminer si γ -H2AX peut être utilisé pour prédire la létalité d'un traitement génotoxique, les concentrations létales de ces différentes molécules ont été déterminées. Pour cela une méthode d'évaluation de la densité cellulaire après traitement par coloration au cristal violet a été utilisée, cette technique nous permettant d'estimer aisément la concentration cytotoxique d'un produit (Figure 86). Une concentration a été estimée comme cytotoxique dès lors que la densité cellulaire des cellules traitées est inférieure à 20% de la densité cellulaire observée dans les cellules non traitées.

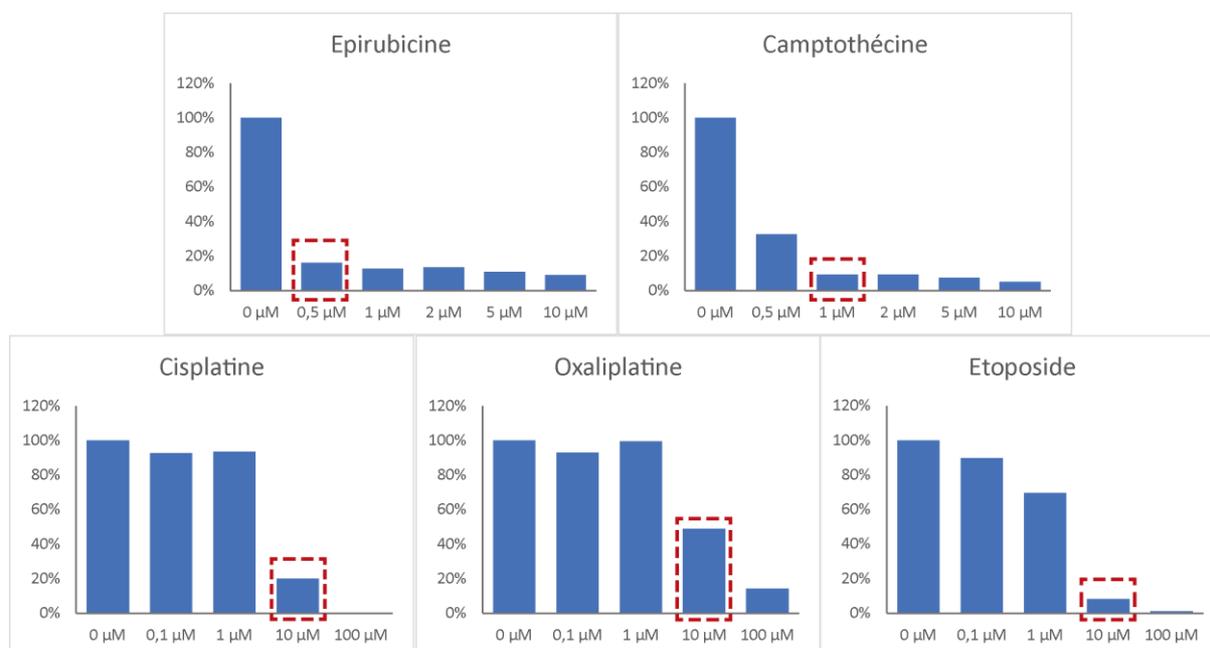


Figure 86 : Analyse de la densité cellulaire par coloration au Cristal Violet et lecture de la densité optique. Cellules H1299 traitées pendant 24 h puis incubées pendant 72 h. En encadré rouge sont présentées les concentrations utilisées pour le criblage.

Les résultats obtenus nous ont permis de déterminer que l'EPI est cytotoxique dans les cellules H1299 à la concentration de 0,5 µM. La concentration minimale cytotoxique de la CPT est de 1 µM. Le CIS et l'ETO sont cytotoxiques à la concentration de 10 µM. Dans le cas de l'OXA, la concentration de 10 µM a été retenue bien que 50% de la population cellulaire semble survivre après ce traitement. Ceci dans le but d'étudier la différence en termes de survie et d'induction de γ -H2AX de 2 produits appartenant à la même classe d'agents génotoxiques mais présentant des différences en termes de cytotoxicité.

3.1.3 Persistance de γ -H2AX

Afin de déterminer à quels temps acquérir le signal γ -H2AX, nous avons étudié sa dynamique après un traitement court avec des inhibiteurs de la RnR. Pour cela nous avons analysé l'évolution du signal γ -H2AX après un traitement à l'hydroxyurée, inhibant la RnR de façon réversible et la gemcitabine inhibant la RnR de façon irréversible par liaison covalente dans son site actif. Des cellules H1299 ont été traitées avec de l'hydroxyurée ou de la gemcitabine combinée à l'inhibiteur de Chk1 (H + A et G + A, respectivement) pendant 8 h puis incubées en absence des molécules pendant 4 jours. La phosphorylation de H2AX et la survie des cellules ont été analysées à l'issue du traitement puis toutes les 24 h (Figure 87 et Figure 88).

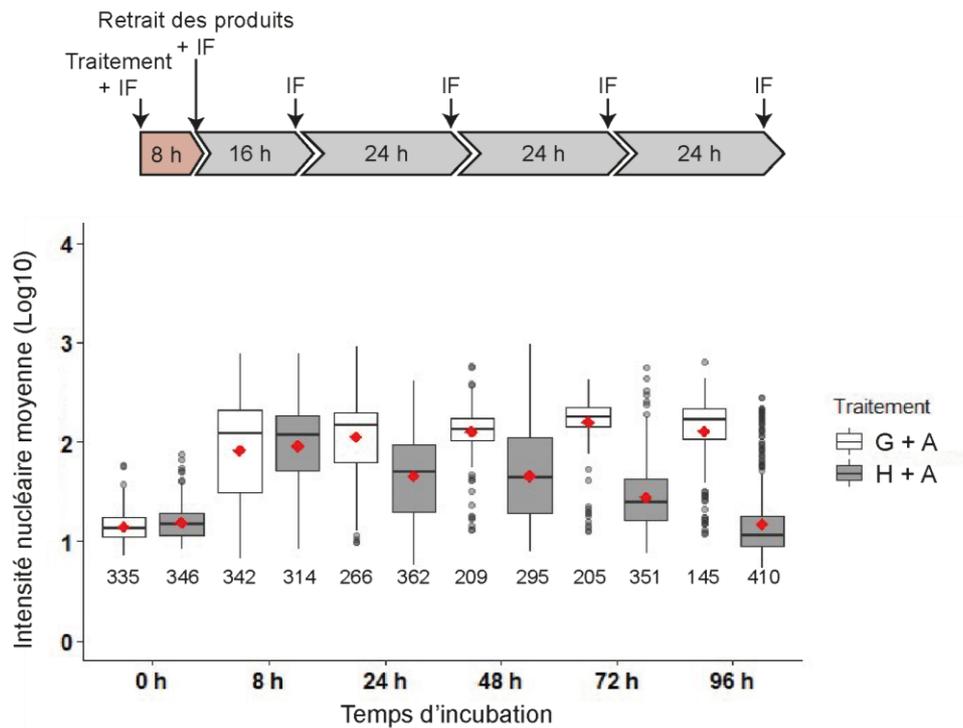


Figure 87 : Analyse de la persistance de γ -H2AX après traitement de cellules H1299 pendant 8 h. Quantification des intensités nucléaires moyennes (\log_{10}) obtenues après IF avec l'anticorps 3F4. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

La quantification de γ -H2AX montre qu'à l'issue du traitement, les 2 populations cellulaires présentent une intensité du signal γ -H2AX comparable. Cependant, alors que dans les cellules traitées avec la combinaison H + A le signal γ -H2AX décroît progressivement, ce signal persiste dans les cellules traitées avec la combinaison G + A.

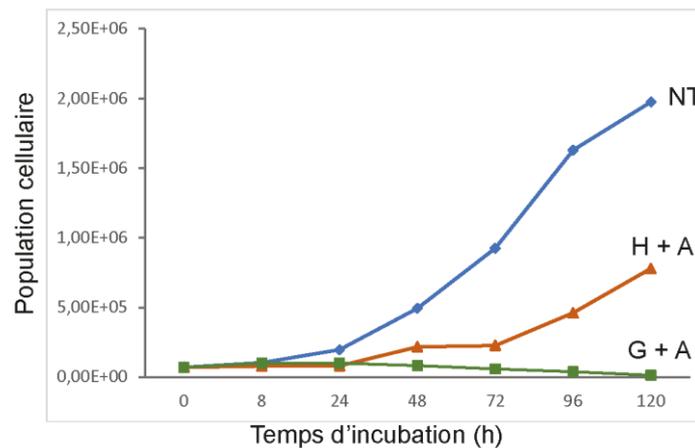


Figure 88 : Evolution de la population cellulaire des cellules H1299 traitées pendant 8 h ou non traitées. NT : non traité ; H + A : hydroxyurée + AZD-7762 ; G + A : gemcitabine + AZD-7762.

L'analyse de la survie cellulaire montre que les cellules traitées avec la combinaison H + A reprennent leur croissance tandis que dans le cas des cellules traitées avec la combinaison G + A, la croissance cellulaire est stoppée et la population diminue (Figure 88). Ainsi, la persistance de γ -H2AX entre 2 et 4 jours après l'arrêt du traitement fournit des informations quant à la survie des cellules et peut révéler une non-réversibilité du traitement avec certaines molécules.

3.1.4 Liste des traitements utilisés

L'ensemble des conditions de traitement avec les molécules ou les combinaisons de molécules génotoxiques utilisées pour le criblage sont présentées en Table 9

Abréviations	Molécules et concentrations utilisées	Famille de molécule
NT	Non traité	N/A
A	AZD-7762 0,1 μ M	Inhibiteur RDA
H/HU	Hydroxyurée 2 mM	Inhibiteur RnR
HA/H+A	Hydroxyurée 2 mM + AZD-7762 0,1 μ M	Inhibiteur RnR + Inhibiteur RDA
G	Gemcitabine 0,1 μ M	Inhibiteur RnR
GA/G+A	Gemcitabine 0,1 μ M + AZD-7762 0,1 μ M	Inhibiteur RnR + Inhibiteur RDA
C	Clofarabine 0,3 μ M	Inhibiteur RnR
CA/C+A	Clofarabine 0,3 μ M + AZD-7762 0,1 μ M	Inhibiteur RnR + Inhibiteur RDA
T	Triapine 2 μ M	Inhibiteur RnR
TA/T+A	Triapine 2 μ M + AZD-7762 0,1 μ M	Inhibiteur RnR + Inhibiteur RDA
CPT	Camptothécine 1 μ M	Inhibiteur topoisomérase I
EPI	Epirubicine 0,5 μ M	Inhibiteur topoisomérase II
ETO	Etoposide 10 μ M	
CIS	Cisplatine 10 μ M	Sel de platine
OXA	Oxaliplatine 10 μ M	

Table 9 : Liste des traitements utilisés lors du criblage

3.2 Evaluation de la survie cellulaire : tests de clonogénicité

Pour évaluer l'effet cytotoxique des différentes molécules utilisées dans le criblage, la survie cellulaire a été évaluée par des tests de clonogénicité. Ces tests permettent d'évaluer la capacité des cellules traitées à former des colonies et permettent ainsi d'évaluer plus

précisément la létalité induite par les produits génotoxiques. Ces tests ont été réalisés en traitant les cellules pendant 24 h avec les différentes molécules ou combinaisons de molécules et le protocole utilisé est détaillé dans la section Matériel et Méthodes. Les essais clonogéniques ont permis de quantifier la fraction survivante des populations cellulaires traitées avec les différents produits génotoxiques.

3.2.1 H1299 :

Les fractions survivantes (proportion des cellules capables de former des colonies) obtenues avec les cellules H1299 sont présentées en Figure 89.

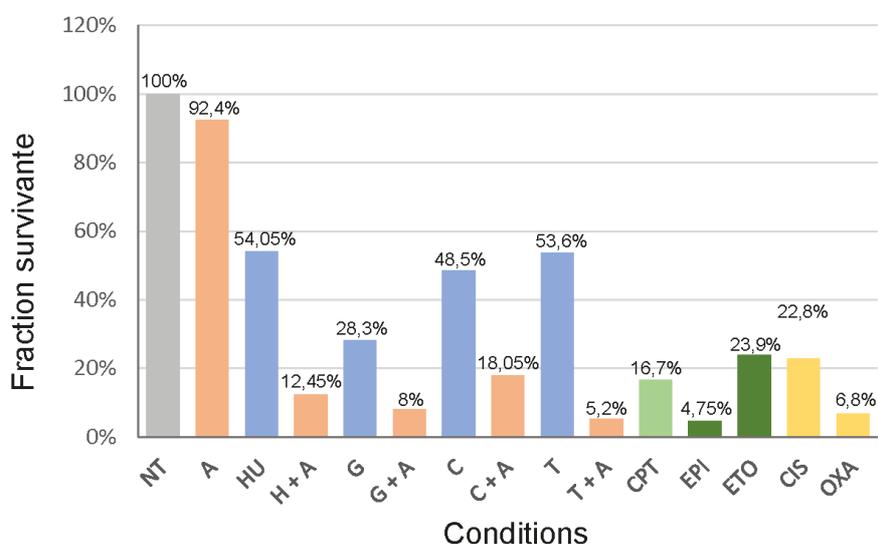


Figure 89 : Fraction survivante des cellules H1299 obtenue après un traitement des cellules pendant 24 h avec les différents produits génotoxiques.

Les résultats fournis par les tests de clonogénicité montrent que le traitement des cellules H1299 avec l'inhibiteur de Chk1 seul a un faible effet sur la survie des cellules (fraction survivante de 92,4%). L'ajout de cet inhibiteur lors du traitement des cellules avec un inhibiteur de la RnR induit une forte diminution de la survie cellulaire (de 54,05% à 12,45% pour HU ; de 28,3% à 8% pour G ; de 48,5% à 18,05% pour C et de 53,6% à 5,2% pour T). Ceci est en accord avec les résultats présentés dans l'article n°1 qui avaient mis en évidence une augmentation de la létalité du stress répliatif lors de la combinaison d'un inhibiteur de Chk1 ou d'ATR à un inhibiteur de la RnR. L'ensemble des autres familles de molécules ont eu un impact important sur la survie cellulaire, notamment l'EPI (fraction survivante de 4,75%) et

l'OXA (fraction survivante de 6,8%). L'effet cytotoxique important observé avec l'OXA était inattendu compte tenu des expériences préliminaires réalisées avec ce produit (Figure 86).

3.2.2 U2-OS :

Les fractions survivantes obtenues avec les cellules U2-OS sont présentées en Figure 90.

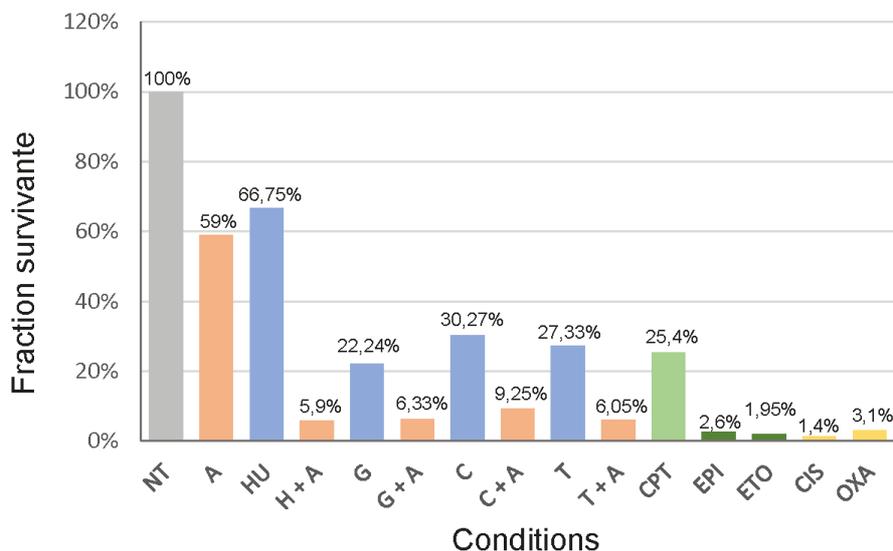


Figure 90 : Fraction survivante des cellules U2-OS obtenue après un traitement des cellules pendant 24 h avec les différents produits génotoxiques.

Contrairement à ce qui a été observé avec les cellules H1299, le traitement des cellules U2-OS avec l'inhibiteur de Chk1 seul a un effet notable sur la survie des cellules (fraction survivante de 59%). L'ajout de cet inhibiteur lors du traitement des cellules avec un inhibiteur de la RnR induit, comme pour les cellules H1299, une forte diminution de la survie cellulaire (de 66,75% à 5,9% pour HU ; de 22,24% à 6,33% pour G ; de 30,27% à 9,25% pour C et de 27,33% à 6,05% pour T). Comme pour les cellules H1299, l'ensemble des autres familles de molécules ont eu un impact important sur la survie cellulaire, avec une fraction survivante de 25,4% pour la CPT et une fraction survivante inférieure ou égale à 3,1% pour les autres molécules.

3.3 Acquisition du signal γ -H2AX

3.3.1 Protocole suivi

Lors du criblage, le signal γ -H2AX à l'issue du traitement ainsi que sa persistance après 24 h supplémentaires d'incubation ont été analysés. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec les différentes molécules et l'acquisition du signal a été réalisée par microscopie sur un

échantillon de cellules traitées dans chaque condition. L'ensemble des analyses par immunofluorescence ont également été réalisées avec l'anticorps 3F4 pour valider les données obtenues

3.3.2 Induction de γ -H2AX dans les cellules H1299

En premier lieu, la phosphorylation de H2AX dans des populations cellulaires exposées aux différents traitements a été quantifiée.

3.3.2.1 Signal γ -H2AX à 24 h

La valeur de fluorescence mesurée dans les cellules H1299 après 24 h d'incubation dans les différentes conditions sont présentées en Figure 91.

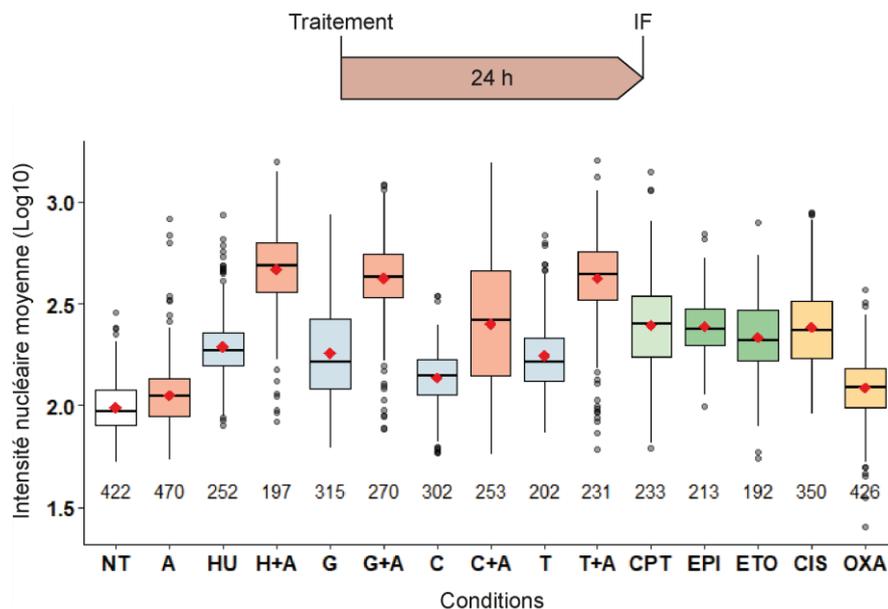


Figure 91 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les résultats obtenus montrent une induction de γ -H2AX dans pratiquement toutes les conditions, cette induction est faible dans les conditions A et OXA. Dans tous les cas, la combinaison d'un inhibiteur de Chk1 à un inhibiteur de la RnR conduit à une augmentation du signal γ -H2AX mesuré. Le traitement des cellules avec des inhibiteurs de topoisomérase (I et II) ou le CIS induit également une phosphorylation importante de H2AX. Il est à noter que l'induction de la phosphorylation de H2AX n'est pas uniforme au sein des populations

cellulaires en réponse au traitement avec des produits génotoxiques. Par exemple, les cellules traitées avec la condition C+A présente une étendue importante, traduisant l'hétérogénéité du signal γ -H2AX acquis sur ces cellules.

3.3.2.2 Signal γ -H2AX à 48 h

Les valeurs de fluorescence mesurées dans les cellules H1299 après 24 h d'incubation à l'issue du traitement sont présentées en Figure 92.

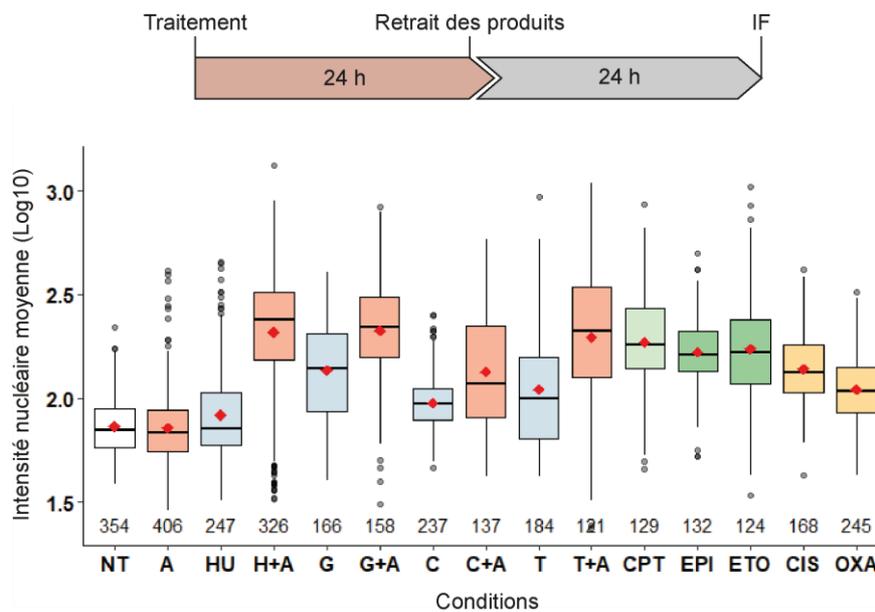


Figure 92 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules H1299 traitées pendant 24 h et incubées pendant 24 h à l'issue du traitement. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les intensités de fluorescence obtenues sur les cellules H1299 incubées pendant 24 h après l'arrêt du traitement ont un profil comparable à celui obtenu à l'issue du traitement, ce qui indique une persistance de la phosphorylation de H2AX après le retrait des produits génotoxiques. Les différences notables avec les valeurs obtenues précédemment sont une intensité de fluorescence plus faible dans le cas des cellules traitées avec le HU et une augmentation de la fluorescence dans le cas des cellules traitées à l'OXA. L'ensemble des données qui ont été acquises dans ces 2 expériences de quantification ont servi à l'étude de la corrélation pouvant exister entre γ -H2AX et la survie cellulaire.

3.2.2.1 Comparaison des valeurs obtenues avec le VHH C6B marqué et l'anticorps 3F4.

Afin de confirmer la spécificité du signal obtenu lors des immunofluorescences réalisées avec le VHH C6B marqué, les moyennes des signaux γ -H2AX acquis à l'issue du traitement des cellules ont été comparées avec celles obtenues avec l'anticorps 3F4 dans les mêmes conditions. Un test de corrélation de Spearman a été réalisé sur ces données (Figure 93).

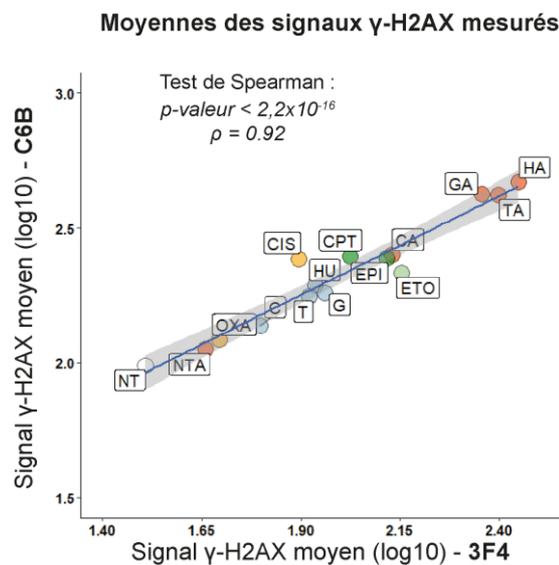


Figure 93 : Représentation graphique des signaux γ -H2AX moyens mesurés avec le VHH C6B en fonction des signaux γ -H2AX moyens mesurés avec l'anticorps 3F4 à l'issue d'un traitement des cellules H1299 pendant 24 h.

La représentation graphique de ces signaux met en évidence une relation linéaire entre le signal mesuré avec le VHH C6B marqué et le signal mesuré avec l'anticorps 3F4 sur les cellules H1299 traitées 24 h. La réalisation d'un test de corrélation de Spearman sur les 2 jeux de données a permis de déterminer un coefficient de corrélation (ρ de Spearman) de 0,92 et une p -valeur inférieure à $2,2 \times 10^{-16}$, permettant d'accepter l'hypothèse de la corrélation avec un risque d'erreur très faible. Ce test a permis de confirmer la spécificité du VHH C6B pour γ -H2AX par l'obtention de résultats identiques à ceux obtenus avec l'anticorps 3F4 et ceci confirme la capacité de ce réactif à être utilisé pour le criblage de produits génotoxiques.

3.3.3 Induction de γ -H2AX dans les cellules U2-OS

L'induction de γ -H2AX en réponse aux différents traitements a été quantifiée dans les cellules U2-OS suivant le même protocole que les cellules H1299

3.3.3.1 Signal γ -H2AX à 24 h

La valeurs de fluorescence mesurées dans les cellules U2-OS après 24 h d'incubation dans les différentes conditions sont présentées en Figure 94.

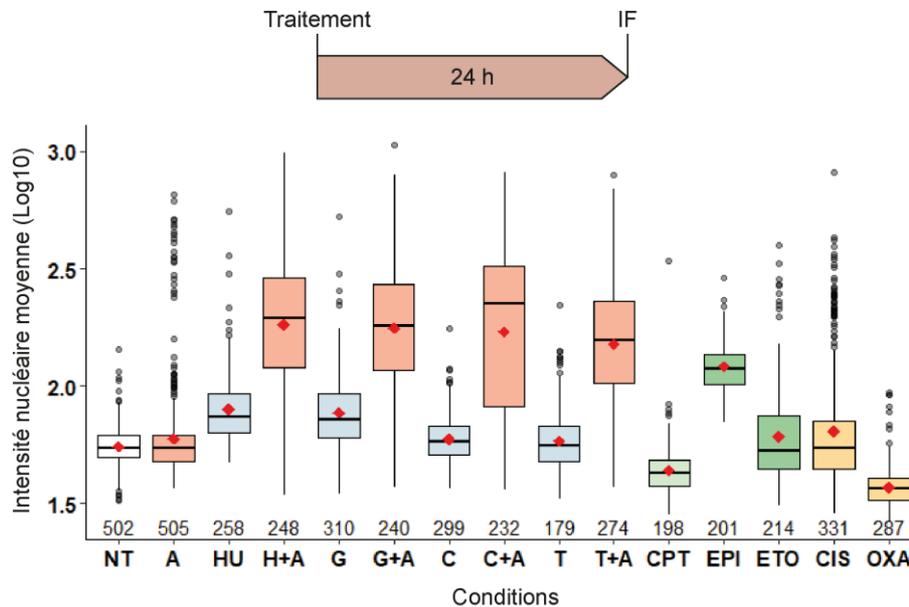


Figure 94 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules U2-OS traitées pendant 24 h. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les profils d'intensité de fluorescence obtenus sur les cellules U2-OS à l'issue d'un traitement de 24 h montrent que comme pour les cellules H1299, le traitement des cellules avec la combinaison d'un inhibiteur de la RnR et d'un inhibiteur de Chk1 conduit à une forte induction la phosphorylation de H2AX. Contrairement aux cellules H1299, les cellules traitées avec la C, la T, la CPT ou l'OXA ne présentent pas d'induction importante de γ -H2AX, avec un signal plus faible que dans les cellules non traitées observé dans le cas de l'OXA. Une différence d'intensité du signal γ -H2AX est également observée avec les 2 inhibiteurs de topoisomérase II, avec une induction très supérieure de γ -H2AX dans le cas de l'EPI comparé à l'ETO. Dans le cas du traitement des cellules U2-OS avec le seul inhibiteur de Chk1, seule une petite proportion de la population présente une induction de γ -H2AX, apparaissant comme des valeurs aberrantes. Ceci est en accord avec de précédentes observations réalisées dans notre laboratoire où nous avons observé que ces conditions de traitement pouvaient induire un marquage γ -H2AX important dans une petite fraction des cellules traitées. Un profil similaire a été obtenu lors du traitement avec le CIS.

3.3.3.2 Signal γ -H2AX à 48 h

La valeurs de fluorescence mesurées dans les cellules U2-OS après 24 h d'incubation à l'issue du traitement sont présentées en Figure 95.

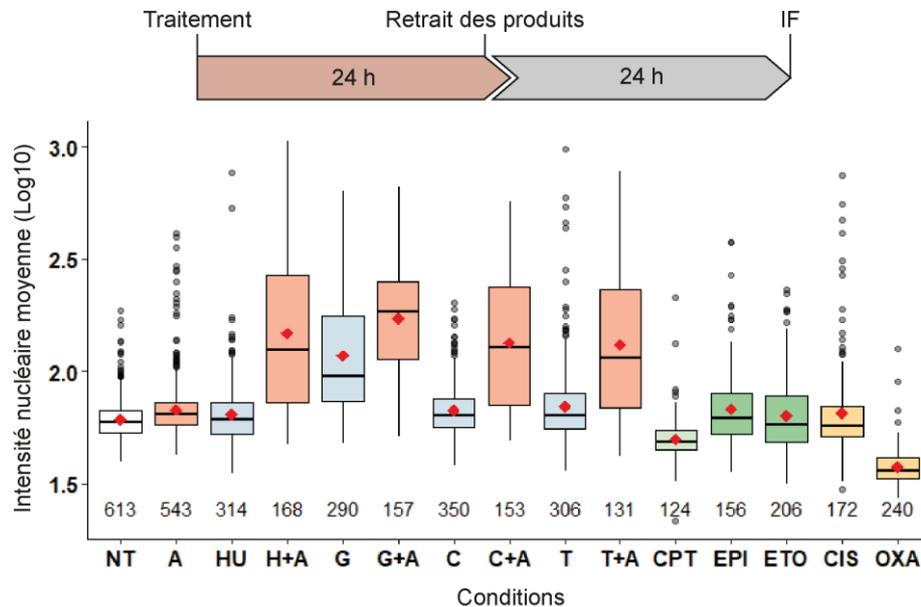


Figure 95 : Quantification et transformation logarithmique des intensités nucléaires moyennes obtenues après IF avec le VHH C6B1C couplé à l'Alexa568 sur des cellules U2-OS traitées pendant 24 h et incubées pendant 24 h à l'issue du traitement. Les nombres en dessous des boxplots correspondent au nombre de cellules analysées. La moyenne est représentée par un point rouge.

Les cellules U2-OS incubées 24 h après l'arrêt du traitement présentent dans l'ensemble des profils de fluorescence similaires à ceux observés à l'arrêt du traitement. Ainsi, l'intensité du signal γ -H2AX dans les cellules traitées avec la G est supérieur à celui observé à l'arrêt du traitement. En revanche, les cellules traitées avec le HU ou l'EPI présentent une diminution globale du signal γ -H2AX observé.

3.4 Détermination d'un seuil de γ -H2AX

L'ensemble des mesures effectuées dans les cellules traitées a ensuite été mise en relation avec la survie cellulaire déterminée par les tests de clonogénicité. Dans chaque condition, la proportion de cellules positives pour le signal γ -H2AX a été déterminée. Pour ce faire, un seuil d'intensité de γ -H2AX à partir duquel les cellules sont considérées comme positives a été déterminé. La condition témoin des cellules non traitées a été choisie en utilisant le 90^e percentile comme valeur seuil, c'est-à-dire la première valeur des 10% des valeurs d'intensité

les plus élevées. Toutes les cellules dont l'intensité du marquage γ -H2AX dépasse cette valeur étant alors considérées comme positives.

3.4.1 Cellules H1299

En appliquant cette méthodologie, le pourcentage de cellules H1299 positives dans chacune des conditions de traitement a été déterminé (Figure 96).

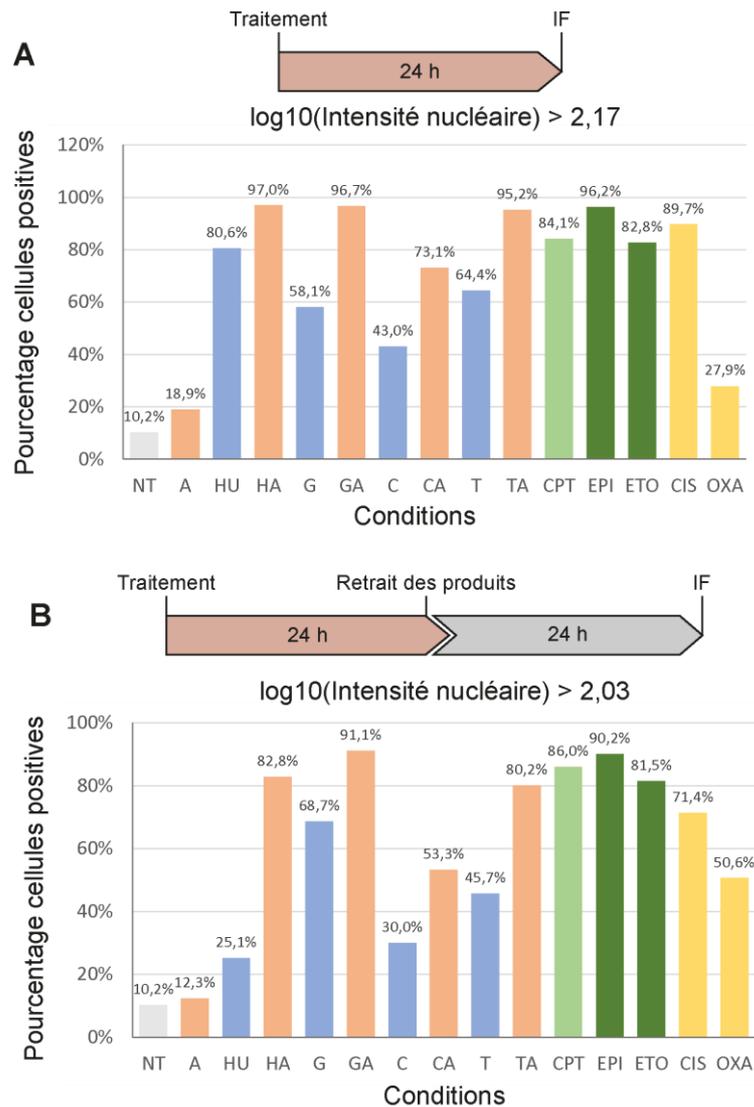


Figure 96 : Détermination du nombre de cellules H1299 traitées pendant 24 h et positives pour γ -H2AX à l'issue d'un traitement de 24 h (A) ou après 24 h d'incubation à l'issue du traitement (B). La valeur seuil utilisée est indiquée au-dessus de l'histogramme.

Ces pourcentages de cellules positives dans chaque condition ont ensuite été mis en relation avec les fractions survivantes des cellules pour chaque condition de traitement (Figure 97).

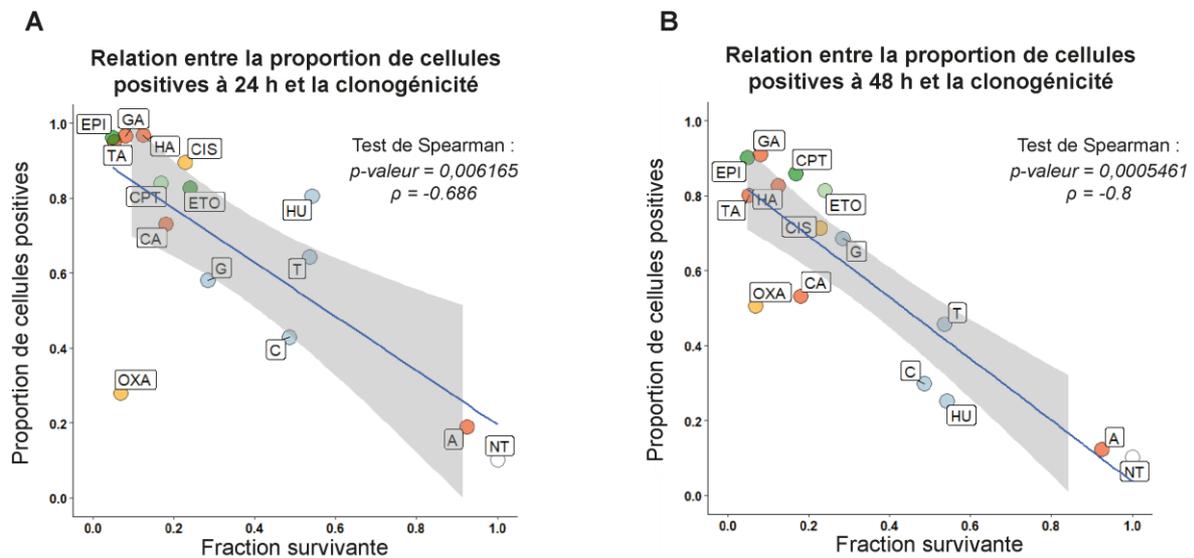


Figure 97 : Relations entre le nombre de cellules H1299 traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité. (A) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX à l'issue du traitement (24 h). (B) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

La mise en relation du nombre de cellules positives à l'issue du traitement de 24 h avec les fractions survivantes montre qu'une relation linéaire semble exister entre ces 2 paramètres, cependant une forte dispersion des valeurs est observée (Figure 97A). Ceci est confirmé par les résultats du test de corrélation de Spearman ($\rho = -0.686$, p-valeur = 0.006165), amenant à rejeter l'hypothèse d'une corrélation entre ces 2 paramètres. En revanche, les données obtenus lors de l'analyse de γ -H2AX suite à une incubation supplémentaire de 24 h après l'arrêt du traitement (Figure 97B) met en évidence une relation de corrélation entre la fraction de cellules positives pour γ -H2AX et la fraction survivante déterminé par les tests clonogéniques avec un coefficient de corrélation de -0,8 et une p-valeur de 0,0005461 permettant d'accepter l'hypothèse de la corrélation entre ces 2 paramètres. Ainsi, dans les cellules H1299 une relation existe entre la persistance d'un signal γ -H2AX 24 h après l'arrêt du traitement et la létalité cellulaire.

3.4.2 Cellules U2-OS

La même méthodologie utilisée pour les cellules H1299 a été appliquée aux cellules U2-OS. Les proportions de cellules positives pour γ -H2AX sont présentées dans la Figure 98.

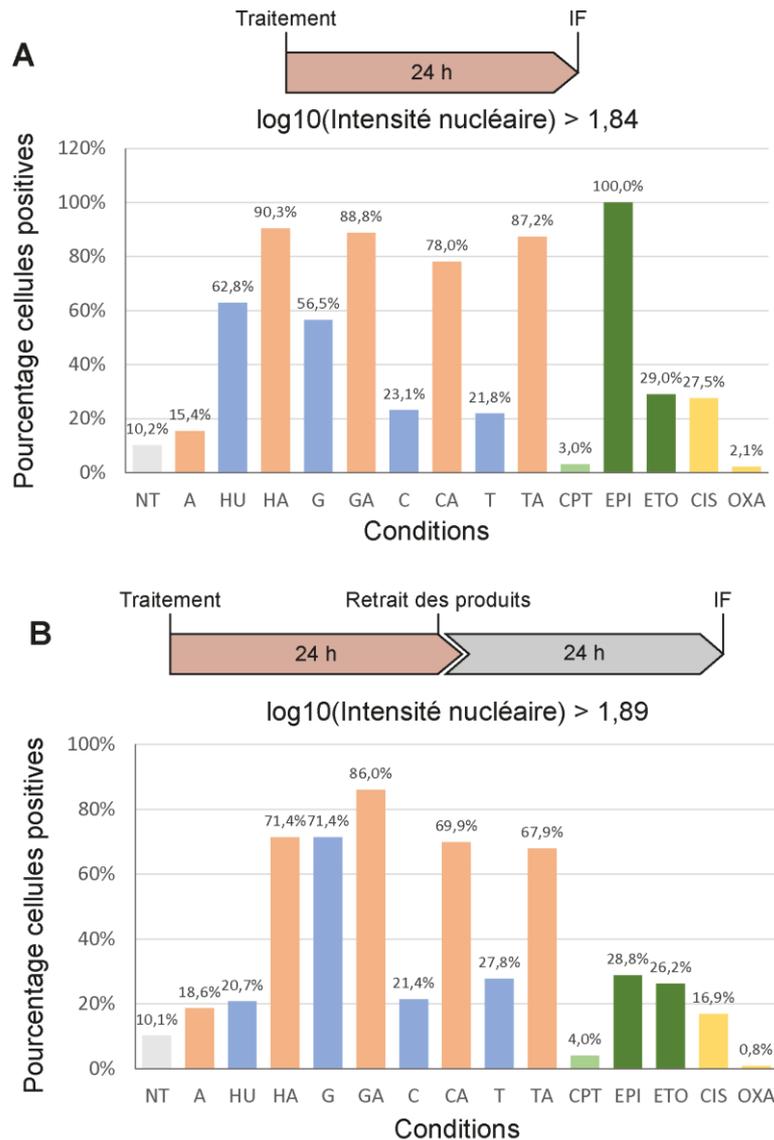


Figure 98 : Détermination du nombre de cellules U2-OS traitées pendant 24 h et positives pour γ -H2AX à l'issue d'un traitement de 24 h (A) ou après 24 h d'incubation à l'issue du traitement (B). La valeur seuil utilisée est indiquée au-dessus de l'histogramme.

De façon surprenante, la totalité des cellules U2-OS traitées avec l'EPI sont positives pour γ -H2AX directement à l'issue du traitement et seulement 28,8% des cellules sont positives après une incubation supplémentaire de 24 h. Une telle variation n'a pas été observée dans le cas du traitement à l'ETO où la proportion de cellules positives varie peu entre l'issue du traitement (29 %) et l'incubation supplémentaire de 24 h (26,2%). Les pourcentages de cellules positives pour γ -H2AX ont été mis en relation avec les fractions survivantes afin de déterminer une corrélation entre ces 2 paramètres (Figure 99).

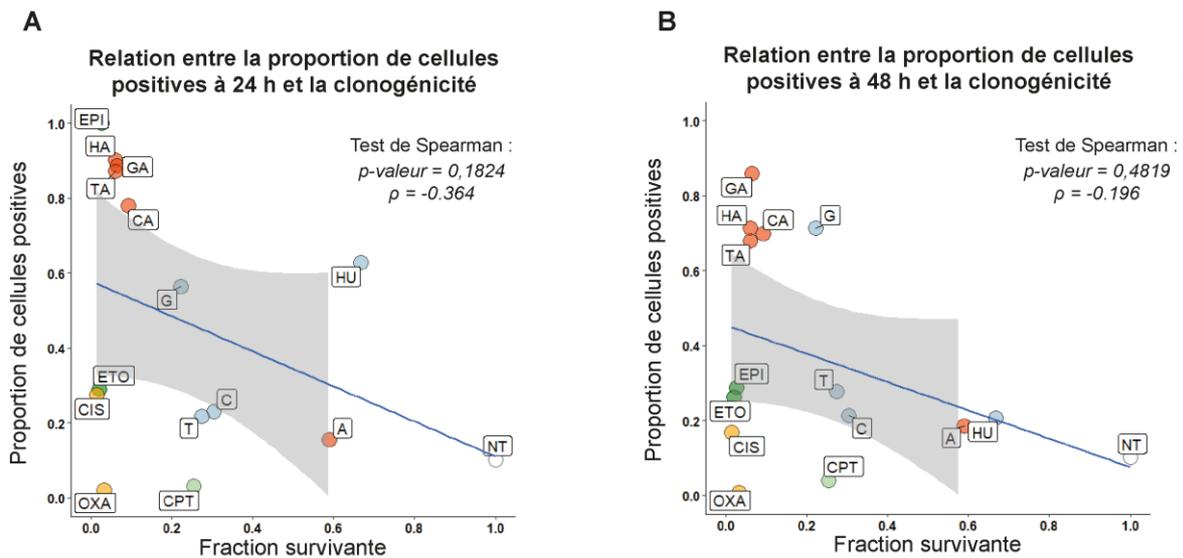


Figure 99 : Relations entre le nombre de cellules U2-OS traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité. (A) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX à l'issue du traitement (24 h). (B) Proportion de cellules positives pour γ -H2AX après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

Contrairement aux résultats obtenus avec les cellules H1299, la mise en relation du la proportion de cellules positives pour γ -H2AX avec le potentiel clonogénique des cellules montre que ces 2 variables ne sont pas liées par une relation linéaire, il n'y pas de corrélation apparente entre ces 2 variables. Les valeurs des tests de corrélation confirment ce résultat ($\rho = -0,364$, p-valeur = 0,1824 à 24 h et $\rho = -0,196$ et p-valeur = 0,4819 à 48 h) rejetant ainsi l'hypothèse d'une corrélation entre ces 2 variables.

De façon intéressante, les produits génotoxiques peuvent être séparés en 2 groupes : d'une part les traitements induisant un signal positif dans une forte proportion de cellules associé à une faible fraction survivante (inhibiteurs de la RnR associés à l'inhibiteur de Chk1). D'autre part, les traitements induisant une grande diminution de la fraction survivante sans que ceci ne soit associé à la détection d'une grande proportion de cellules positives pour γ -H2AX (sels de platine et inhibiteurs de topoisomérase).

4 Conclusions

Ces expériences de criblage utilisant le VHH C6B marqué avec un fluorochrome ont montré que ce réactif est parfaitement adapté à la détection de γ -H2AX, avec des résultats obtenus corrélés à ceux obtenus avec l'anticorps 3F4. De plus, ce réactif marqué permet de détecter γ -H2AX en une étape, ce qui est adaptable à une méthodologie de criblage haut-débit.

L'utilisation de γ -H2AX comme indicateur de la létalité de traitements génotoxiques a montré, dans le cas des cellules H1299 que la détermination d'une proportion de cellules avec un signal γ -H2AX « positif » permet d'établir une corrélation entre γ -H2AX et la létalité induite par les produits génotoxiques. La plus forte corrélation entre γ -H2AX et la diminution de la fraction survivante a été établie en évaluant la persistance de la phosphorylation de H2AX 24 h après l'arrêt des traitements génotoxiques. Il semblerait donc que la persistance de γ -H2AX dans ces cellules soit importante pour déterminer le caractère létal d'un traitement génotoxique. Les cellules « positives » pour γ -H2AX ont été déterminées en utilisant le 90^e percentile des valeurs d'intensité mesurées dans les cellules non traitées, c'est-à-dire des valeurs extrêmes obtenues dans des cellules n'ayant pas été exposée à un stress répliatif exogène.

De façon surprenante, des résultats très différents ont été obtenus dans les cellules U2-OS. Avec cette lignée cellulaire il n'a pas été possible de déterminer un lien entre l'intensité du marquage γ -H2AX et la létalité des traitements génotoxiques. Dans le premier article, nous avons mis en évidence que les inhibiteurs de la RnR, générant du stress répliatif, utilisés seuls ou en combinaison avec un inhibiteur des kinases ATR ou Chk1 étaient capables d'induire γ -H2AX dans cette lignée cellulaire, ce qui a également été observé lors de ce criblage. En revanche les autres molécules génotoxiques utilisées à des concentrations létales (inhibiteurs de topoisomérases I et II et sels de platine) n'ont pas induit une forte phosphorylation de H2AX (hormis l'étoposide à l'issue du traitement) et n'ont pas permis de détecter un grand nombre des cellules « positives » pour γ -H2AX 24 h après l'arrêt du traitement. Le retrait de ces produits des analyses de corrélation permet d'apercevoir qu'une corrélation existe entre la persistance de γ -H2AX et la perte de clonogénicité dans le cas des traitements ciblant la RnR et générant du stress répliatif (Figure 100).

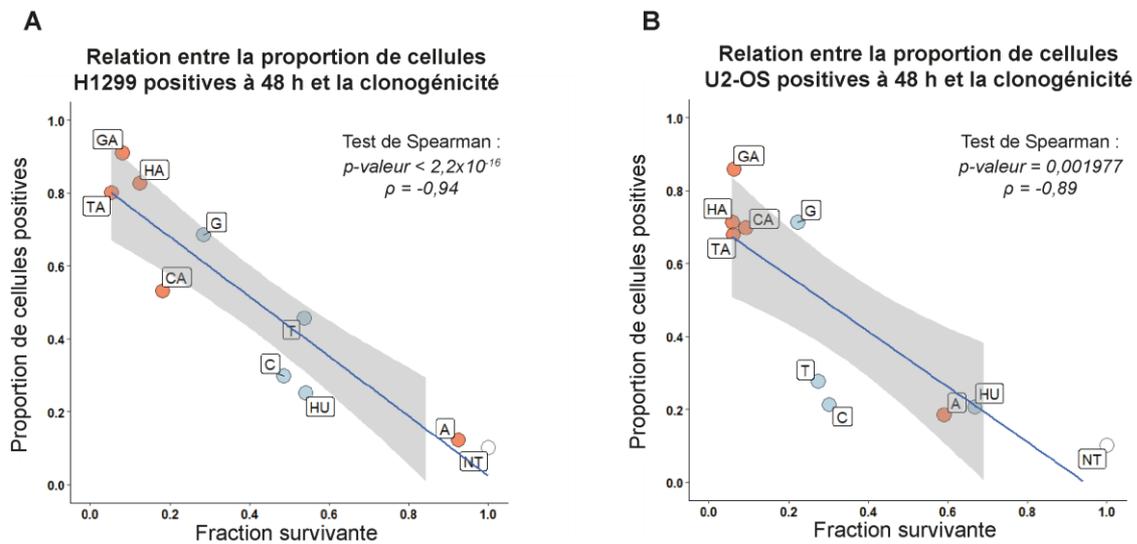


Figure 100 : Relations entre le nombre de cellules H1299 (A) ou U2-OS (B) traitée positives pour γ -H2AX et les fractions survivantes déterminées par les tests de clonogénicité après une incubation de 24 h à l'issue du traitement (48 h).

L'analyse de la corrélation entre la persistance de γ -H2AX et les fractions survivantes dans le cas du traitement des cellules avec des inhibiteurs de la RnR associés ou non à l'inhibiteur de Chk1 confirme les résultats obtenus dans les cellules H1299 ($\rho = -0,94$, p-valeur < $2,2 \times 10^{-16}$). Cette condition permet également de s'approcher d'une corrélation dans les cellules U2-OS ($\rho = -0,89$, p-valeur = 0,001977). Ces résultats confirment que γ -H2AX pourrait être utilisé comme indicateur pour quantifier le stress réplcatif provoqué par des produits génotoxiques ciblant directement le processus de réplication comme les inhibiteurs de la RnR. Ces observations seraient à confirmer dans d'autres lignées cellulaires. L'absence d'induction de γ -H2AX observée dans les cellules U2-OS traitées avec les inhibiteurs de topoisomères ou les sels de platine est peut-être relation avec la présence de la protéine p53 fonctionnelle dans cette lignée cellulaire. Les hypothèses formulées suite à ces observations seront développées dans la partie discussion.

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie sont des résultats préliminaires devant être confirmés par le reproduction de ces expériences.

Discussion et perspectives

1 La phosphorylation de H2AX provoquée par le stress réplicatif

Au cours de mon travail de thèse, notre équipe a étudié la phosphorylation de l'histone H2AX en réponse au stress réplicatif induit par des molécules génotoxiques et en particulier par les inhibiteurs de la RnR. Nous avons ainsi pu confirmer que cette phosphorylation est observable lors de l'induction du stress réplicatif et ce dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (HeLa, H1299, U2-OS, HEK-293T, HL-60R). Nous nous sommes particulièrement intéressés à la phosphorylation de H2AX étendue à l'ensemble du noyau (γ -H2AX pan-nucléaire) et avons établi un lien entre cette phosphorylation étendue et la létalité du stress réplicatif. En particulier, nous avons établi que lorsque des cellules soumises à un stress réplicatif présentent majoritairement un phénotype γ -H2AX pan-nucléaire, ceci est associé à une perte de la viabilité cellulaire. L'association d'inhibiteurs des kinases ATR et/ou Chk1 aux inhibiteurs de la RnR nous a permis d'observer dans ces conditions une augmentation du niveau de stress réplicatif. Ceci confirme l'importance du rôle de ces kinases dans la réponse au stress réplicatif, leur inhibition rendant léthal le stress réplicatif auquel sont soumis les cellules (Forment and O'Connor, 2018).

Nous avons ainsi voulu étudier le rôle fonctionnel que joue γ -H2AX dans la réponse au stress réplicatif. Nos résultats obtenus avec des cellules où le gène de H2AX a été inactivé indiquent que ce variant d'histone ne semble pas jouer de rôle essentiel dans la capacité des cellules à récupérer du stress réplicatif. Nous avons identifié que la kinase DNA-PK, impliquée très probablement dans la réparation des CDBs par NHEJ, est responsable de l'extension de la phosphorylation de H2AX à l'ensemble du noyau. La perte du phénotype pan-nucléaire lors de l'inhibition de cette kinase n'a pas d'impact sur la survie cellulaire, ce qui semble indiquer que l'extension de γ -H2AX à l'ensemble du compartiment nucléaire n'est pas directement impliquée dans l'induction d'un processus de mort cellulaire. Enfin, l'observation de γ -H2AX pan-nucléaire n'est pas liée à la présence de multiples CDBs sur l'ensemble du génome consécutives par exemple de la fragmentation de l'ADN observée lors de l'apoptose.

Il apparaît dès lors que cette extension de γ -H2AX à l'ensemble du compartiment nucléaire est la conséquence du blocage généralisé du processus de réplication et de l'hyperactivation de la réponse aux dommages à l'ADN, en particulier de la kinase DNA-PK, comme le confirme l'hyperphosphorylation sur les sérines 4 et 8 de RPA pan-nucléaire, une autre cible de la kinase

DNA-PK (Liaw et al., 2011; Moeglin et al., 2019). Bien que ce marquage γ -H2AX pan-nucléaire ne possède apparemment pas de fonction biologique, il nous est apparu comme un indicateur du stress répliatif létal, pouvant ainsi permettre de prédire la létalité de traitements génotoxiques.

1.1 γ -H2AX comme marqueur pour la détection du stress répliatif létal

Afin de tester la viabilité de γ -H2AX comme indicateur du stress répliatif létal, nous avons réalisé un criblage de différentes molécules génotoxiques dans 2 lignées cellulaires : les cellules H1299 (p53 négatives) et les cellules U2-OS (p53 positives). Nous avons évalué la capacité de molécules interférant directement le processus de réplication (inhibiteurs de la RnR) ainsi que de molécules endommageant l'ADN et pouvant ainsi bloquer la progression des fourches de réplication (inhibiteurs de topoisomérase et sels de platine) à induire γ -H2AX lorsqu'elles sont utilisés à des doses létales. De plus, nous avons choisi de mesurer l'induction γ -H2AX à l'issue du traitement ou après une période de récupération de 24 h, ceci afin d'évaluer si la persistance de γ -H2AX peut être un bon indicateur de la sévérité des dommages à l'ADN (Siddiqui et al., 2015).

Les résultats obtenus lors de ce criblage ont confirmé que dans le cas du traitement des cellules cancéreuses avec des inhibiteurs de la RnR, seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs de Chk1, la persistance de γ -H2AX 24 h après l'arrêt du traitement est corrélée avec la létalité cellulaire. Ceci a été observé dans les 2 lignées cellulaires et confirme les résultats obtenus dans le premier article. En revanche, le traitement des cellules avec des doses létales d'inhibiteurs de topoisomérase ou de sels de platine a conduit à l'observation de résultats différents dans les 2 lignées cellulaires. Dans les cellules H1299, la létalité cellulaire observée avec ces produits est corrélée avec la persistance de γ -H2AX, permettant d'envisager l'utilisation de γ -H2AX comme indicateur de la létalité des traitements génotoxiques. A contrario, dans les cellules U2-OS, la létalité observée avec ces produits n'est pas accompagnée d'une induction ou d'une persistance de γ -H2AX. Ces 2 lignées cellulaires diffèrent notamment par le statut de la protéine p53 et ceci pose la question de l'implication de cette protéine dans les réponses cellulaires observées.

1.1.1 La protéine p53 et l'induction de γ -H2AX

La protéine p53 est activée suite à la détection de stress répliatif ou de dommages à l'ADN et il est décrit que la sévérité des dommages auxquels une cellule est exposée oriente l'action de la protéine p53 vers une réponse en faveur de la survie par la réparation des dommages ou en faveur de la mort cellulaire par apoptose ou de la senescence lorsque qu'un seuil de dommages est atteint (Roos et al., 2015). Ainsi, dans les cellules U2-OS où cette protéine est active, il est possible que les doses létales d'inhibiteurs de topoisomérases ou de sels de platine utilisées déclenchent la réponse pro-apoptotique de la protéine p53. Une étude récente a montré que l'induction de l'apoptose dans des cellules p53 positives s'accompagnait d'une perte du signal γ -H2AX observé (Khoury et al., 2020). Ainsi, dans les cellules p53 positives, l'absence de signal γ -H2AX pourrait être un indicateur de l'induction de l'apoptose et la détection de marqueurs de l'apoptose dans ces conditions, comme le clivage de la protéine PARP-1 (Ewald et al., 2007), pourrait confirmer cette hypothèse. Dans les cellules H1299 où la protéine p53 n'est pas présente, lors du traitement avec les inhibiteurs de topoisomérases ou les sels de platine, l'observation de la persistance de γ -H2AX est peut-être due à l'absence d'induction de l'apoptose et l'accumulation de dommages à l'ADN conduisant à la mort cellulaire par une autre voie que l'apoptose. Ainsi, les résultats obtenus lors du traitement des cellules U2-OS avec l'étoposide pourraient être expliqués par la déphosphorylation de H2AX induite par l'activité de la protéine p53.

1.1.2 Conclusions

Nos résultats indiquent que γ -H2AX peut permettre de détecter la létalité du stress répliatif induit par les inhibiteurs de la RnR agissant de façon ciblée sur la progression des ADN polymérases et ce indépendamment du statut de la protéine p53. Les autres molécules génotoxiques utilisées dans ce criblage peuvent interférer avec la réplication par leur action directe sur la molécule d'ADN, par la création de pontages intra et inter-brins dans le cas de sels de platine ou par la création de complexes ternaires ancrés sur l'ADN dans le cas des inhibiteurs de topoisomérases. Cependant, il est possible que la cytotoxicité observée avec ces molécules soit également due à leur capacité à interférer avec d'autres processus cellulaires, comme la transcription (Hande, 2008; Vesela et al., 2017), et que dans ce cas la pertinence de γ -H2AX comme indicateur de la létalité est questionnable.

Il serait intéressant d'évaluer la capacité de ces molécules à induire γ -H2AX dans les cellules U2-OS lorsqu'elles utilisées à des concentrations non cytotoxiques, pour permettre de renforcer l'hypothèse de la perte du signal γ -H2AX lors de l'induction de l'apoptose.

Enfin les cellules U2-OS et H1299 diffèrent notamment par le statut de la protéine p53, mais ces cellules proviennent de types de cancers différents (ostéosarcome pour les U2-OS et NSCLC pour les H1299). Elles présentent certainement d'autres différences, notamment dans les protéines impliquées dans la RDA, ce qui limite l'interprétation des résultats obtenus.

Afin d'étudier la seule incidence de la protéine p53 sur les réponses observées, l'utilisation d'une lignée de cellule cancéreuses comme les HCT116 pour lesquelles existe une version où la protéine p53 a été inactivée (Abu el Maaty et al., 2017) permettrait de confirmer que ces différences sont bien le fait de l'activité de la protéine p53.

1.2 La dynamique de la phosphorylation de H2AX

Dans l'article n°1, la phosphorylation de H2AX sous forme de foci et sa progression vers la phosphorylation pan-nucléaire ont été observés sur des cellules fixées (Figure 101A). Nous n'avons pas pu étudier la vitesse d'apparition des foci en réponse au stress répliatif, ni celle de l'extension de la phosphorylation de H2AX à l'ensemble du compartiment nucléaire. Ainsi, les cinétiques d'induction de γ -H2AX et de son extension pan-nucléaire diffèrent peut-être entre les différentes molécules, notamment lors de l'inhibition du checkpoint du stress répliatif (Bertoli et al., 2013b) mais ce paramètre n'a pas pu être évalué. Il serait possible qu'en plus de l'intensité du signal γ -H2AX induit, la rapidité de cette induction soit un paramètre important pour évaluer la létalité du stress répliatif. Par ailleurs, nous n'avons pas pu étudier la dynamique de γ -H2AX au cours de la phase S. Nous avons utilisé des populations de cellules non synchronisées, en effet la synchronisation des cellules par blocage de la réplication engendre du stress répliatif et aurait compliqué l'interprétation des résultats (Banfalvi, 2011). Le suivi en temps réel de la dynamique de γ -H2AX ainsi que du cycle cellulaire, par exemple grâce au suivi de la protéine PCNA (Zerjatke et al., 2017), pourrait permettre d'observer la phosphorylation progressive de H2AX au cours de la phase S et par exemple d'identifier si l'évolution des foci vers le marquage pan-nucléaire se produit à un stade particulier de la phase S.

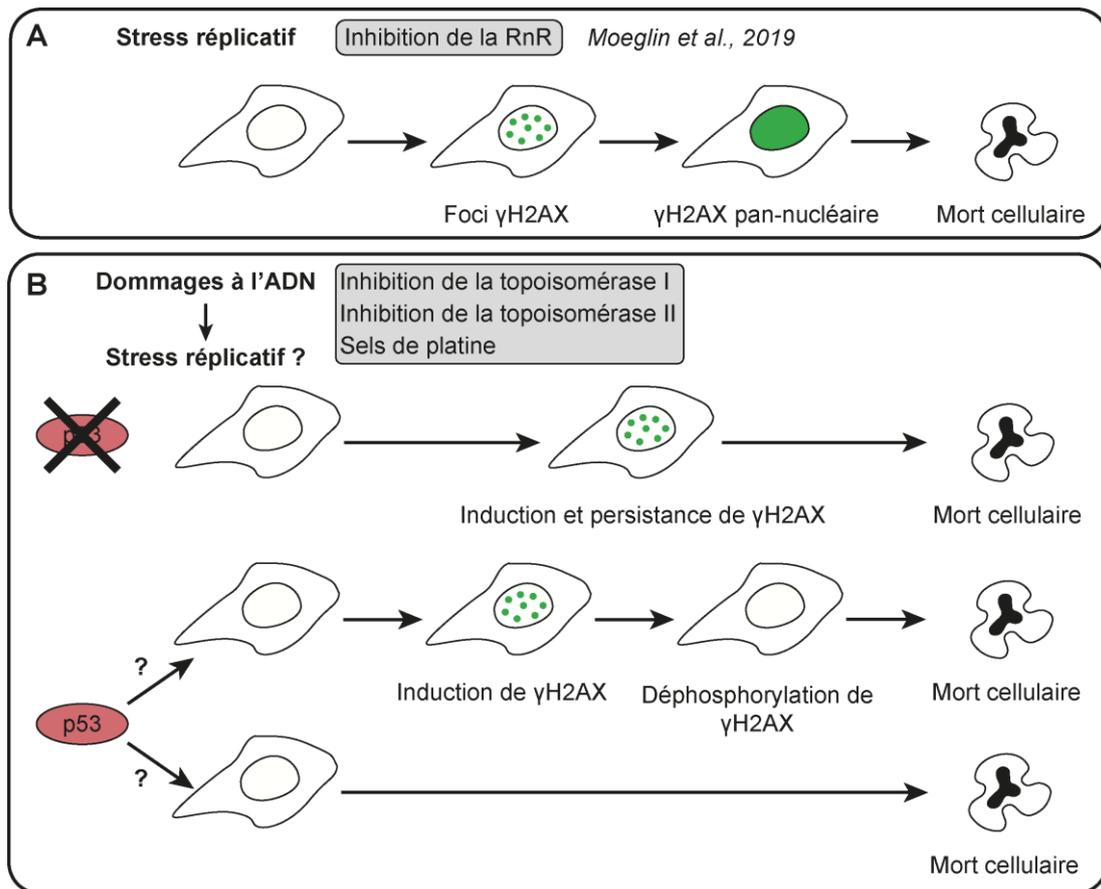


Figure 101 : La phosphorylation de H2AX lors de l'exposition à des agents génotoxiques. (A) Phosphorylation de H2AX en réponse au stress réplcatif. (B) Hypothèses sur la dynamique de γ -H2AX lors du traitement avec des agents provoquant des dommages à l'ADN.

L'étude en temps réel de la phosphorylation de H2AX pourrait également permettre d'apporter des réponse quant à l'absence de signal γ -H2AX observé dans les cellules p53 positives traitées avec des molécules endommageant l'ADN. En effet, nous ne savons si cette absence de signal est due à une absence d'induction ou à une déphosphorylation de γ -H2AX (Figure 101B) et des observations en temps réel pourraient permettre de répondre à cette question.

2 Génération d'un VHH dirigé contre γ -H2AX

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai développé un outil de type VHH adapté à la détection de γ -H2AX en temps réel dans les cellules vivantes. Pour pouvoir identifier précisément γ -H2AX dans les cellules vivantes, cet outil devait se montrer capable de révéler toute l'étendue des signaux entre l'absence de γ -H2AX et la phosphorylation pan-nucléaire.

2.1 La génération de VHHs dirigés contre un peptide linéaire phosphorylé

L'immunisation de 3 animaux avec le peptide C-terminal phosphorylé de H2AX a permis la génération d'anticorps dirigés contre ce peptide dans tous les animaux, cependant des VHHs n'ont pu être isolés qu'à partir d'un seul animal. De plus, l'analyse des séquences de ces VHHs a montré qu'ils dérivent tous d'une même cellule B progénitrice. Ces observations indiquent que la réponse immunitaire qui a suivi l'immunisation des animaux avec le peptide a favorisé la génération d'anticorps conventionnels probablement car ils sont plus adaptés à la reconnaissance d'épitopes linéaires en comparaison avec les HcAbs. Ceci est confirmé par le faible nombre de VHHs dirigés contre des épitopes linéaires décrits dans la littérature (Pardon et al., 2014). Notre équipe a eu la chance de pouvoir isoler des cellules B circulantes codant pour des HcAbs dirigés contre γ -H2AX. Il est cependant possible qu'un répertoire plus varié de cellules B codant pour des HcAbs existe à l'intérieur des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, inaccessibles à moins de prélever ces organes comme lors de la génération d'anticorps monoclonaux de souris. Nous avons ainsi été limités à la caractérisation de VHHs ne différant que par 2 résidus au sein du CDR3 et possédant des CDR2, impliqués dans la reconnaissance de la sérine phosphorylée, identiques. L'utilisation d'une banque synthétique « naïve » aurait pu nous donner accès à davantage de variabilité dans les séquences CDR et FR, sans toutefois garantir l'obtention d'un VHH suffisamment affin pour γ -H2AX (Rothbauer, 2018).

2.2 L'accumulation nucléaire des VHHs

De façon surprenante, après expression intracellulaire sous la forme de chromobodies, nous avons observé pour tous les VHHs une localisation nucléaire préférentielle du signal observé. Une des hypothèses permettant d'expliquer cette accumulation nucléaire des VHHs est leur fusion à une protéine fluorescente. Il a en effet été décrit que l'eGFP seule peut présenter naturellement une accumulation nucléaire (Seibel et al., 2007). Le même phénotype a été observé avec les VHHs fusionnés à la mCherry. Une autre explication pour cette localisation nucléaire pourrait être la présence de 3 arginines dans le CDR3 (RYTRR) pouvant être reconnues par l'importine et constituer de ce fait une pseudo-séquence NLS. Cependant le remplacement de 2 de ces arginines dans les versions mutées du VHH C6 n'a pas supprimé le phénotype d'accumulation nucléaire, permettant ainsi d'exclure cette hypothèse. Nous ne

pouvons expliquer ce comportement des VHHs que nous avons isolés et cette caractéristique représente une difficulté supplémentaire pour l'observation de γ -H2AX dans les cellules vivantes. D'autres VHHs décrits dans la littérature semblent également s'accumuler dans le compartiment nucléaire lorsqu'ils sont produits dans les cellules (Keller et al., 2018). Cette accumulation est peut-être ainsi une caractéristique inhérente aux VHHs.

2.3 La bivalence et l'équilibre subtil entre sensibilité et aspécificité.

Comme cela a été mis en évidence lors de la caractérisation, le VHH C6 monovalent est spécifique de la forme phosphorylée mais n'est pas capable de révéler efficacement les foci lors de son utilisation en immunofluorescence. De plus, il ne possède pas une interaction suffisamment forte avec γ -H2AX pour que cette liaison résiste à une force contraire telle que l'export nucléaire médié par la protéine CRM1. L'avidité apportée par la combinaison de 2 VHHs C6 nous est alors apparue comme la solution pour générer un réactif suffisamment affin pour détecter de faible quantité de γ -H2AX et disposer d'une interaction forte avec γ -H2AX. Malheureusement, bien que la bivalence ait permis d'augmenter la force de l'interaction entre le VHH et γ -H2AX (comme le montrent les résultats de résonance plasmonique de surface et les tests avec le tampon CSK), elle a également été à l'origine d'une reconnaissance aspécifique d'un antigène nucléaire. Cette cross-réactivité peut être évitée *in vitro* par le contrôle de la quantité de VHHs utilisés et l'élimination des VHHs faiblement liés grâce aux lavages. De ce fait le VHH C6B est apparu comme le meilleur compromis pour l'utilisation *in vitro* en raison du gain de sensibilité consécutif de la bivalence, permettant la détection des foci de γ -H2AX. Pour cette raison, ce réactif a été retenu pour réaliser un criblage de la létalité de molécules génotoxiques. La fenêtre de spécificité très réduite du VHH C6B a en revanche grandement compliqué la mise au point des d'une méthodologie pour l'observation de γ -H2AX *in cellulo*.

2.4 La visualisation de γ -H2AX *in cellulo*

La vectorisation des VHHs par électroporation permet de contrôler la quantité de VHHs introduits dans les cellules et d'ajuster cette quantité à la quantité d'antigène. Cependant, il n'a pas été possible avec cette technique de mettre au point des conditions permettant de visualiser une faible induction de γ -H2AX sans signal aspécifique dans les cellules non traitées.

Les VHHs peuvent être utilisés *in cellulo* après transfection de leur séquence codante dans le cytoplasme des cellules. Cependant, la transfection transitoire d'une protéine ne permet pas de contrôler la quantité de VHHs exprimés ni la quantité de VHHs présents dans l'environnement intracellulaire qui est un paramètre critique pour la reconnaissance spécifique de γ -H2AX par le VHH C6B. La génération d'une lignée cellulaire stable dans laquelle la séquence du VHH est intégrée au génome peut permettre, par la sélection de cellules exprimant faiblement le VHH, de contrôler le niveau d'expression du VHH. Cette méthode n'a pas été retenue pour le VHH C6B car les expériences de transduction ont montré qu'un signal aspécifique est observable même lorsque de très faibles quantités de ce VHH sont introduites dans les cellules. Ainsi, il est apparu évident que pour que le VHH C6B puisse être utilisé après expression dans les cellules il devait être associé à un système permettant une régulation de sa localisation nucléaire. L'utilisation d'un promoteur inducible par le stress réplicatif aurait pu permettre de déclencher la synthèse du VHH en réponse au traitement avec des molécules génotoxiques offrant ainsi un contrôle temporel sur la synthèse du VHH sans toutefois permettre de contrôler le nombre de VHHs synthétisés. Des méthodes permettant d'induire la dégradation des VHHs non liés par leur adressage au protéasome ont été décrites (Keller et al., 2018), cependant l'existence d'une interaction entre le VHH C6B et un antigène aspécifique ne garantit pas qu'un tel système permette la suppression du signal aspécifique. Pour ces raisons, nous avons opté pour une stratégie permettant de relocaliser le signal aspécifique par l'export nucléaire des VHHs non liés à γ -H2AX. Nous avons établi que l'export constitutif des VHHs n'était pas une stratégie fonctionnelle et nous avons recherché un système d'export inducible, comme le système LEXY.

2.4.1 La relocalisation des VHHs avec le système LEXY

L'association du VHH C6B au système LEXY a permis d'observer une rétention nucléaire supérieure des VHHs lorsqu'une grande quantité de γ -H2AX est présente dans le noyau du fait d'un stress réplicatif intense (article n°2). Nous avons également montré que pour qu'un tel système soit fonctionnel, les VHHs doivent préalablement être adressés au noyau grâce à une séquence NLS. Le système LEXY a pu être développé car γ -H2AX est un antigène ancré (non soluble) présent au sein d'un compartiment cellulaire défini et facilement identifiable en microscopie, le noyau, et pour lequel les mécanismes d'import et d'export sont caractérisés. Le système LEXY n'a cependant pas permis une relocalisation de l'ensemble VHHs en absence

de γ -H2AX et il n'a, pour l'instant, pas été possible de visualiser distinctement les foci de γ -H2AX résultant d'un stress réplicatif modéré. Ainsi la stratégie du système LEXY a permis un contrôle dynamique de la visualisation des VHHs spécifiquement liés à γ -H2AX mais ce système ne permet pas en l'état une détection fine de l'induction de γ -H2AX. Plusieurs paramètres peuvent expliquer cela et peuvent constituer des points d'améliorations possible du système. Toutes les constructions utilisés sont sous contrôle du promoteur CMV, un promoteur fort, conduisant à l'expression de très nombreuses copies du VHHs pouvant saturer le système d'export médié par CRM1 (Niopek et al., 2016). D'autre part, l'équilibre entre l'import nucléaire via la séquence NLS et l'export via la séquence NES pourrait être amélioré en modifiant les résidus consensus afin de diminuer l'affinité du NLS pour l'importine ou d'augmenter l'affinité du NES pour la protéine CRM1. L'amélioration de ces différents points pourrait très certainement permettre, à l'avenir, de disposer d'un outil adapté à la visualisation de la dynamique de γ -H2AX en temps réel.

Le couplage du système LEXY au VHH C6B a montré la viabilité de ce concept et laisse entrevoir de nouvelles possibilité d'immunociblage dans les cellules vivantes. Ainsi, cette stratégie de relocalisation des VHHs non liés pourrait permettre la visualisation d'autres antigènes nucléaires ancrés ainsi que d'antigènes cytoplasmiques ancrés comme des protéines membranaires à l'aide du système d'import nucléaire inductible LINuS. Dans le cas de protéines nucléaires solubles, ce système pourrait permettre la relocalisation conditionnelle de ces protéines et d'étudier l'impact biologique de cette relocalisation. Cette stratégie a été étudiée dans la publication présentant le système LEXY. Cependant, comme dans le cas de la fusion d'une protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente, La fusion d'une protéine d'intérêt avec le système LEXY suppose d'éditer le génome des cellules et ne garantit pas que la protéine d'intérêt reste fonctionnelle. Le couplage d'un VHH dirigé contre la protéine d'intérêt avec le système LEXY permet d'utiliser ce système sur une protéine endogène fonctionnelle, le VHH jouant un rôle d' « adaptateur » entre le système LEXY et la protéine.

2.5 Perspectives d'utilisation du VHH C6

Mon travail de thèse a permis de valider l'utilisation du VHH C6B *in cellulo*. Son utilisation en transduction a permis, tout comme avec le Fab 3F4, de détecter sans ambiguïté la phosphorylation pan-nucléaire de γ -H2AX. Pour son utilisation après expression dans les cellules vivantes, les résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de Fribourg sur le

système LEXY sont prometteurs quant à l'établissement d'une méthodologie adaptée à visualisation de la dynamique de la phosphorylation de H2AX. Lors de son utilisation *in vitro* en immunofluorescence, le VHH C6B marqué s'est montré aussi performant que l'anticorps 3F4 pour quantifier l'induction de γ -H2AX sur des cellules traitées avec différentes molécules génotoxiques. Ce réactif marqué présente l'avantage de pouvoir être utilisé dans un protocole d'immunofluorescence en une étape qui peut être adapté au criblage haut-débit. De plus, la production aisée de ce VHH en système procaryote permet une production et une purification avec des équipements facilement accessibles au sein des laboratoires de recherche. Cette production en système procaryote présente également l'avantage d'éviter le recours à des souris pour la génération d'anticorps. Le VHH C6B marqué pourrait être utilisé en microscopie à haute résolution où il pourrait permettre de visualiser avec précision les foyers γ -H2AX, la taille réduite des VHHs permettant de localiser le fluorochrome au plus près de l'antigène, évitant ainsi le « linkage error » observé lors d'utilisation d'anticorps conventionnels (Traenkle and Rothbauer, 2017). Enfin, afin de confirmer les résultats de l'article n°1 qui ont montré que la perte de H2AX n'influe pas sur le devenir des cellules, des expériences de masquage de γ -H2AX par le VHH C6B sont en cours de réalisation dans notre laboratoire. Notre objectif est d'étudier si la perte des interaction entre le γ -H2AX et ses interactants (comme MDC1 ou les différentes phosphatases) à une influence sur la survie cellulaire.

Conclusion générale

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de γ -H2AX dans le contexte d'atteintes génotoxiques létales pour les cellules. Nous avons pu montrer que la phosphorylation de H2AX peut être utilisée comme indicateur de la létalité du stress réplicatif. Ainsi, la persistance d'un signal γ -H2AX dans une population cellulaire exposée au stress réplicatif est un indicateur de la létalité de ce dernier. En revanche, les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que γ -H2AX n'est pas un indicateur universel de la létalité des atteintes génotoxiques. Ce résultat était inattendu mais soulève d'intéressantes questions biologiques, notamment concernant l'implication de la protéine p53 dans la mort cellulaire consécutive aux dommages à l'ADN. Mes travaux de thèse n'ont pas pu aboutir à la mise au point définitive d'une méthodologie adaptée à l'observation temps réel de γ -H2AX. Une telle méthodologie pourrait permettre d'observer la dynamique de γ -H2AX en réponse à divers traitements génotoxiques, létaux ou non. Les résultats que nous avons obtenus pourraient être appliqués à la découverte de nouvelles molécules générant du stress réplicatif comme des inhibiteurs de la RnR ou de la RDA. Nous espérons que l'utilisation de γ -H2AX comme indicateur de la létalité puisse trouver une application en clinique, en permettant d'évaluer l'efficacité des protocoles de chimiothérapie directement sur des cellules extraites de patients. Cependant, les protocoles de chimiothérapie combinent plusieurs familles de molécules génotoxiques et nos résultats ne permettent pas pour l'instant d'affirmer que γ -H2AX serait un indicateur efficace de la létalité cellulaire dans ce contexte.

Mes travaux de thèse ont permis d'aboutir au développement d'un VHH reconnaissant γ -H2AX fonctionnel *in vitro* et *in cellulo*. Ce VHH est une des premières descriptions d'un VHH capable de reconnaître spécifiquement un peptide linéaire porteur d'une MPT, un VHH reconnaissant la forme tyrosinée de l' α -tubuline ayant été décrit dans la littérature (Kesarwani et al., 2020). Le travail réalisé a permis de confirmer la viabilité d'une stratégie d'export nucléaire des VHHs non liés ou liés aspécifiquement pour la visualisation d'un antigène nucléaire. Le système que nous avons développé pourrait ainsi à terme permettre de suivre la phosphorylation de H2AX en temps réel et pourrait permettre de répondre aux différentes questions qui ont été

formulées précédemment. L'utilisation de ce système pourrait être à l'avenir appliquée à l'observation d'autres antigène nucléaires et notamment d'autres MPTs.

Références bibliographiques

- Abu el Maaty, M.A., Strassburger, W., Qaiser, T., Dabiri, Y., and Wölfel, S. (2017). Differences in p53 status significantly influence the cellular response and cell survival to 1,25-dihydroxyvitamin D₃-metformin cotreatment in colorectal cancer cells. *Mol. Carcinog.* *56*, 2486–2498.
- Achour, I., Cavelier, P., Tichit, M., Bouchier, C., Lafaye, P., and Rougeon, F. (2008). Tetrameric and Homodimeric Camelid IgGs Originate from the Same IgH Locus. *J. Immunol.* *181*, 2001–2009.
- Altintas, I., Heukers, R., Van Der Meel, R., Lacombe, M., Amidi, M., Van Bergen En Henegouwen, P.M.P., Hennink, W.E., Schiffelers, R.M., and Kok, R.J. (2013). Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells. *J. Control. Release* *165*, 110–118.
- Arbabi-Ghahroudi, M. (2017). Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Front. Immunol.* *8*, 1–8.
- Audia, J.E., and Campbell, R.M. (2016). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *8*, 1–32.
- Balliano, A.J., and Hayes, J.J. (2015). Base excision repair in chromatin: Insights from reconstituted systems. *DNA Repair (Amst.)* *36*, 77–85.
- 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.
- Banfalvi, G. (2011). Overview of Cell Synchronization. *Methods Mol. Biol.* *761*, 1–23.
- Bannas, P., Hambach, J., and Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front. Immunol.* *8*, 1603.
- Beghein, E., and Gettemans, J. (2017). Nanobody technology: A versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Front. Immunol.* *8*, 1–14.
- Behdani, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, H., Schoonooghe, S., Aslemarz, A., Seyed, N., Moazami-Godarzi, R., Baniahmad, F., Habibi-Anbouhi, M., et al. (2013). Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *N. Biotechnol.* *30*, 205–209.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., and De Bruin, R.A.M. (2013a). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 518–528.
- Bertoli, C., Klier, S., McGowan, C., Wittenberg, C., and De Bruin, R.A.M. (2013b). Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr. Biol.* *23*, 1629–1637.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* *145*, 435–446.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* *66*, 801–817.
- Braun, M.B., Traenkler, B., Koch, P.A., Emele, F., Weiss, F., Poetz, O., Stehle, T., and Rothbauer, U. (2016). Peptides in headlock – a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody

for proteomics and microscopy. *Sci. Rep.* *6*, 19211.

Brown, J.A.L., Eykelenboom, J.K., and Lowndes, N.F. (2012). Co-mutation of histone H2AX S139A with Y142A rescues Y142A-induced ionising radiation sensitivity. *FEBS Open Bio* *2*, 313–317.

Buschbeck, M., and Hake, S.B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*.

Carter, R.J., and Parsons, J.L. (2016). Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 1426–1437.

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* *26*, 52–64.

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* (80-.). *296*, 922–927.

Cha, H., Lowe, J.M., Li, H., Lee, J., Belova, G.I., Bulavin, V., and Jr, A.J.F. (2011). Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *70*, 4112–4122.

Chagin, V.O., Stear, J.H., and Cardoso, M.C. (2010). Organization of DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, 1–13.

Chen, W.-T., Alpert, A., Leiter, C., Gong, F., Jackson, S.P., and Miller, K.M. (2013). Systematic identification of functional residues in mammalian histone H2AX. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 111–126.

Chiarella, P., and Fazio, V.M. (2008). Mouse monoclonal antibodies in biological research: Strategies for high-throughput production. *Biotechnol. Lett.* *30*, 1303–1310.

Chiu, M.L., Goulet, D.R., Teplyakov, A., and Gilliland, G.L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* *8*, 55.

Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* *20*, 801–809.

Ciardo, D., Goldar, A., and Marheineke, K. (2019). On the interplay of the DNA replication program and the Intra-S phase checkpoint pathway. *Genes (Basel)*. *10*.

Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 616–627.

Clouaire, T., and Legube, G. (2015). DNA double strand break repair pathway choice: A chromatin based decision? *Nucleus* *6*, 107–113.

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*, 591–596.

Corvi, R., and Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced? *Food Chem. Toxicol.* *106*, 600–608.

Coster, G., and Goldberg, M. (2010). The cellular response to DNA damage: A focus on MDC1 and its interacting proteins. *Nucleus* *1*, 166–178.

Courtête, J., Sibler, A.P., Zeder-Lutz, G., Dalkara, D., Oulad-Abdelghani, M., Zuber, G., and Weiss, E. (2007). Suppression of cervical carcinoma cell growth by intracytoplasmic codelivery

of anti-oncoprotein E6 antibody and small interfering RNA. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 1728–1735.

D’Huyvetter, M., Vincke, C., Xavier, C., Aerts, A., Impens, N., Baatout, S., De Raeve, H., Muyldermans, S., Caveliers, V., Devoogdt, N., et al. (2014). Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics* *4*, 708–720.

Desplancq, D., Rinaldi, A.S., Stoessel, A., Sibler, A.P., Busso, D., Oulad-Abdelghani, M., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2011). Single-chain Fv fragment antibodies selected from an intrabody library as effective mono- or bivalent reagents for in vitro protein detection. *J. Immunol. Methods* *369*, 42–50.

Desplancq, D., Freund, G., Conic, S., Sibler, A.-P., Didier, P., Stoessel, A., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Wagner, J., Mély, Y., et al. (2016). Targeting the replisome with transduced monoclonal antibodies triggers lethal DNA replication stress in cancer cells. *Exp. Cell Res.* *342*, 145–158.

Dietsch, F., Donzeau, M., Cordonnier, A.M., Weiss, E., Chatton, B., and Vigneron, M. (2017). A fast method for analyzing essential protein mutants in human cells. *Biotechniques* *62*, 80–82.

Dmitriev, O.Y., Lutsenko, S., and Muyldermans, S. (2016). Nanobodies as Probes for Protein Dynamics in Vitro and in Cells. *J. Biol. Chem.* *291*, 3767–3775.

Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G.B.G., Xu, X., and Lees-Miller, S.P. (2010). Protein Phosphatase 6 Interacts with the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit and Dephosphorylates γ -H2AX. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1368–1381.

Duggan, S. (2018). Caplacizumab: First Global Approval. *Drugs* *78*, 1639–1642.

Ewald, B., Sampath, D., and Plunkett, W. (2007). H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. *Mol Cancer Ther* *6*, 1239–1248.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: The histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. *3*, 959–967.

Fernandez-Vidal, A., Vignard, J., and Mirey, G. (2017). Around and beyond 53BP1 Nuclear Bodies. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 2611.

Forment, J. V., and O’Connor, M.J. (2018). Targeting the replication stress response in cancer. *Pharmacol. Ther.* *188*, 155–167.

Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 360–374.

Franken, N. a P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* *1*, 2315–2319.

Freund, G., Sibler, A.P., Desplancq, D., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Gannon, J., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2013). Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *MAbs* *5*, 518–522.

Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 104–120.

Fu, S.C., Fung, H.Y.J., Cağatay, T., Baumhardt, J., and Chook, Y.M. (2018). Correlation of CRM1-NES affinity with nuclear export activity. *Mol. Biol. Cell* *29*, 2037–2044.

- Fung, H.Y.J., Fu, S.C., Brautigam, C.A., and Chook, Y.M. (2015). Structural determinants of nuclear export signal orientation in binding to exportin CRM1. *Elife* 4, 1–19.
- Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 276–289.
- Ganai, R.A., and Johansson, E. (2016). DNA Replication-A Matter of Fidelity. *Mol. Cell* 62, 745–755.
- Geißler, D., Wegmann, M., Jochum, T., Somma, V., Sowa, M., Scholz, J., Fröhlich, E., Hoffmann, K., Niehaus, J., Roggenbuck, D., et al. (2019). An automatable platform for genotoxicity testing of nanomaterials based on the fluorometric γ -H2AX assay reveals no genotoxicity of properly surface-shielded cadmium-based quantum dots. *Nanoscale* 11, 13458–13468.
- Georgoulis, A., Vorgias, C., Chrousos, G., and Rogakou, E. (2017). Genome Instability and γ H2AX. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1979.
- Goldman, E.R., Liu, J.L., Zabetakis, D., and Anderson, G.P. (2017). Enhancing stability of camelid and shark single domain antibodies: An overview. *Front. Immunol.* 8, 1–11.
- Goodwin, J.F., and Knudsen, K.E. (2014). Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. *Cancer Discov.* 4, 1126–1139.
- Grugan, K.D., Dorn, K., Jarantow, S.W., Bushey, B.S., Pardinias, J.R., Laquerre, S., Moores, S.L., and Chiu, M.L. (2017). Fc-mediated activity of EGFR x c-Met bispecific antibody JNJ-61186372 enhanced killing of lung cancer cells. *MAbs* 9, 114–126.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hande, K.R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update Cancer Ther.* 3, 13–26.
- Helma, J., Cardoso, M.C., Muyldermans, S., and Leonhardt, H. (2015). Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J. Cell Biol.* 209, 633–644.
- 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.
- Hevener, K.E., Verstak, T.A., Lutat, K.E., Riggsbee, D.L., and Mooney, J.W. (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* 8, 844–861.
- Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 910–916.
- Huang, H., Lin, S., Garcia, B.A., and Zhao, Y. (2015). Quantitative Proteomic Analysis of Histone Modifications. *Chem. Rev.* 115, 2376–2418.
- Hydbring, P., Malumbres, M., and Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 280–292.

- Iacovoni, J.S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., and Legube, G. (2010). High-resolution profiling of γ H2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* *29*, 1446–1457.
- Iezzi, M.E., Policastro, L., Werbach, S., Podhajcer, O., and Canziani, G.A. (2018). Single-Domain Antibodies and the Promise of Modular Targeting in Cancer Imaging and Treatment. *Front. Immunol.* *9*, 1–11.
- 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*, 7028–7040.
- Iwasaki, W., Miya, Y., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tachiwana, H., Shibata, T., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2013). Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes. *FEBS Open Bio* *3*, 363–369.
- Jamnani, F.R., Rahbarizadeh, F., Shokrgozar, M.A., Ahmadvand, D., Mahboudi, F., and Sharifzadeh, Z. (2012). Targeting high affinity and epitope-distinct oligoclonal nanobodies to HER2 over-expressing tumor cells. *Exp. Cell Res.* *318*, 1112–1124.
- Ji, J., Zhang, Y., Redon, C.E., Reinhold, W.C., Chen, A.P., Fogli, L.K., Holbeck, S.L., Parchment, R.E., Hollingshead, M., Tomaszewski, J.E., et al. (2017). Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PLoS One* *12*, 1–18.
- Jones, R.M., and Petermann, E. (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem. J.* *443*, 13–26.
- Jovčevska, I., and Muyldermans, S. (2020). The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs* *34*, 11–26.
- Jullien, D., Vignard, J., Fedor, Y., Béry, N., Olichon, A., Crozatier, M., Erard, M., Cassard, H., Ducommun, B., Salles, B., et al. (2016). Chromatibody, a novel non-invasive molecular tool to explore and manipulate chromatin in living cells. *J. Cell Sci.* *129*, 2673–2683.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. *Natl. Institutes Heal. Bethesda, MD 5th ed.*, 688–696.
- Kakarougkas, A., and Jeggo, P.A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *Br. J. Radiol.* *87*.
- Kang, S., Kang, M.S., Ryu, E., and Myung, K. (2018). Eukaryotic DNA replication: Orchestrated action of multi-subunit protein complexes. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* *809*, 58–69.
- Keller, B.-M., Maier, J., Secker, K.-A., Egetemaier, S.-M., Parfyonova, Y., Rothbauer, U., and Traenkle, B. (2018). Chromobodies to quantify changes of endogenous protein concentration in living cells. *Mol. Cell. Proteomics* *17*, 2518–2533.
- Kesarwani, S., Lama, P., Chandra, A., Reddy, P.P., Jijumon, A.S., Bodakuntla, S., Rao, B.M., Janke, C., Das, R., and Sirajuddin, M. (2020). Genetically encoded live-cell sensor for tyrosinated microtubules. *J. Cell Biol.* *219*.
- Khoury, L., Zalko, D., and Audebert, M. (2013). Validation of High-Throughput Genotoxicity Assay Screening Using γ H2AX In-Cell Western Assay on HepG2 Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*

54, 737–746.

Khoury, L., Zalko, D., and Audebert, M. (2020). Evaluation of the genotoxic potential of apoptosis inducers with the γ H2AX assay in human cells. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 852, 503165.

Klein, A., Hank, S., Raulf, A., Joest, E.F., Tissen, F., Heilemann, M., Wieneke, R., and Tampé, R. (2018). Live-cell labeling of endogenous proteins with nanometer precision by transduced nanobodies. *Chem. Sci.* 7835–7842.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.

Kolkman, J.A., and Law, D.A. (2010). Nanobodies - From llamas to therapeutic proteins. *Drug Discov. Today Technol.* 7, e139–e146.

Kopp, B., Audebert, M., and Khoury, L. (2019). Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment : a review. *Arch. Toxicol.*

Kunos, C.A., and Ivy, S.P. (2018). Triapine radiochemotherapy in advanced stage cervical cancer. *Front. Oncol.* 8, 1–7.

Kunz, P., Ortale, A., Mücke, N., Zinner, K., and Hoheisel, J.D. (2019). Nanobody stability engineering by employing the ΔT_m shift; a comparison with apparent rate constants of heat-induced aggregation. *Protein Eng. Des. Sel.* 1–9.

Labrijn, A.F., Meesters, J.I., de Goeij, B.E.C.G., van den Bremer, E.T.J., Neijssen, J., van Kampen, M.D., Strumane, K., Verploegen, S., Kundu, A., Gramer, M.J., et al. (2013). Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 5145–5150.

Lecona, E., and Fernández-Capetillo, O. (2014). Replication stress and cancer: It takes two to tango. *Exp. Cell Res.* 329, 26–34.

Lefranc, M.P. (2001). Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 161–174.

Lefranc, M.P. (2001). Nomenclature of the Human Immunoglobulin Lambda (IGL) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.* 18, 242–254.

Lemmens, B., and Lindqvist, A. (2019). DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 218, 3892–3902.

Li, T., Vandesquille, M., Koukoulis, F., Dudeffant, C., Youssef, I., Lenormand, P., Ganneau, C., Maskos, U., Czech, C., Grueninger, F., et al. (2016). Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Control. Release* 243, 1–10.

Liaw, H., Lee, D., and Myung, K. (2011). DNA-PK-dependent RPA2 hyperphosphorylation facilitates DNA repair and suppresses sister chromatid exchange. *PLoS One* 6, 1–10.

Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.* 46, 258–268.

Liu, J.K.H. (2014). The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann. Med. Surg.* 3, 113–116.

- Liu, T., and Huang, J. (2016). DNA End Resection: Facts and Mechanisms. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* *14*, 126–130.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., and O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clin. Oncol.* *25*, 578–585.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 330–338.
- Lu, C., Zhu, F., Yong-Yeon, C., Cho, Y.Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W. ya, Bode, A.M., and Dong, Z. (2006). Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation, but Not for the Activation of Caspase-3. *Mol. Cell* *23*, 121–132.
- Lujan, S.A., Williams, J.S., and Kunkel, T.A. (2016). DNA Polymerases Divide the Labor of Genome Replication. *Trends Cell Biol.* *26*, 640–654.
- Maass, D.R., Sepulveda, J., Pernthaler, A., and Shoemaker, C.B. (2007). Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods* *324*, 13–25.
- Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *10*, 425–448.
- Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma* *123*, 225–237.
- Magdalou, I., Lopez, B.S., Pasero, P., and Lambert, S.A.E. (2014). The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* *30*, 154–164.
- Maier, J., Traenkle, B., and Rothbauer, U. (2015). Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Nat. Publ. Gr.* 1–13.
- Makkerh, J.P.S., Dingwall, C., and Laskey, R.A. (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* *6*, 1025–1027.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.
- Martin, R.M., Ter-Avetisyan, G., Herce, H.D., Ludwig, A.K., Lättig-Tünnemann, G., and Cardoso, M.C. (2015). Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus* *6*, 314–325.
- Martins-Teixeira, M.B., and Carvalho, I. (2020). Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem* 933–948.
- Massa, S., Xavier, C., De Vos, J., Caveliers, V., Lahoutte, T., Muyldermans, S., and Devoogdt, N. (2014). Site-specific labeling of cysteine-tagged camelid single-domain antibody-fragments for use in molecular imaging. *Bioconjug. Chem.* *25*, 979–988.
- Matsuda, F., and Honjo, T. (1997). Organization of the human immunoglobulin heavy-chain variable region locus. *Adv. Immunol.* *62*, 1–29.
- Mattiroli, F., Vissers, J.H.A., Van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., Marteijn, J.A., and Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* *150*, 1182–1195.

- Mazouzi, A., Velimezi, G., and Loizou, J.I. (2014). DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res.* *329*, 85–93.
- Meselson, M., and Stahl, F.W. (1958). The Replication Of DNA in Escherichia Coli. *PNAS* *44*, 671–682.
- Mitchell, L.S., and Colwell, L.J. (2018). Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *86*, 697–706.
- Moeglin, E., Desplancq, D., Conic, S., Oulad-Abdelghani, M., Stoessel, A., Chiper, M., Vigneron, M., Didier, P., Tora, L., and Weiss, E. (2019). Uniform Widespread Nuclear Phosphorylation of Histone H2AX Is an Indicator of Lethal DNA Replication Stress. *Cancers (Basel)*. *11*, 355.
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 775–797.
- Nakada, S. (2016). Opposing roles of RNF8/RNF168 and deubiquitinating enzymes in ubiquitination-dependent DNA double-strand break response signaling and DNA-repair pathway choice. *J. Radiat. Res.* *57*, i33–i40.
- Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a γ H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep.* *9*, 1019–1026.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol. Immunol.* *36*, 515–524.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2000). Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.* *19*, 921–930.
- Niopek, D., Wehler, P., Roensch, J., Eils, R., and Di Ventura, B. (2016). Optogenetic control of nuclear protein export. *Nat. Commun.* *7*, 10624.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- OCDE (2014). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Ed. OCDE, Paris.
- Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 93–115.
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., and Lieber, M.R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *293*, 10512–10523.
- Papadopoulos, K.P., Isaacs, R., Bilic, S., Kentsch, K., Huet, H.A., Hofmann, M., Rasco, D., Kundamal, N., Tang, Z., Cooksey, J., et al. (2015). Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *75*, 887–895.
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S.G.F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W.G.J., Kobilka, B.K., and Steyaert, J. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* *9*, 674–693.
- Pellegrino, S., Michelena, J., Teloni, F., Imhof, R., and Altmeyer, M. (2017). Replication-Coupled Dilution of H4K20me2 Guides 53BP1 to Pre-replicative Chromatin. *Cell Rep.* *19*, 1819–1831.

- Pennycook, B.R., Vesela, E., Peripolli, S., Singh, T., Barr, A.R., Bertoli, C., and de Bruin, R.A.M. (2020). E2F-dependent transcription determines replication capacity and S phase length. *Nat. Commun.* *11*.
- Pérez-Martínez, D., Tanaka, T., and Rabbitts, T.H. (2010). Intracellular antibodies and cancer: New technologies offer therapeutic opportunities. *BioEssays* *32*, 589–598.
- Perruchini, C., Pecorari, F., Bourgeois, J.P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., and Lafaye, P. (2009). Llama VHH antibody fragments against GFAP: Better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol.* *118*, 685–695.
- Piquet, S., Le Parc, F., Bai, S.K., Chevallier, O., Adam, S., and Polo, S.E. (2018). The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage. *Mol. Cell* *72*, 888-901.e7.
- Pleiner, T., Bates, M., Trakhanov, S., Lee, C.T., Schliep, J.E., Chug, H., Böhning, M., Stark, H., Urlaub, H., and Görlich, D. (2015). Nanobodies: Site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope- mapping and native protein complex isolation. *Elife* *4*, 1–21.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: Camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 789–802.
- Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2019). A genetically-encoded toolkit of functionalized nanobodies against fluorescent proteins for visualizing and manipulating intracellular signalling. *BMC Biol.* *17*–41.
- Qiu, Z., Oleinick, N.L., and Zhang, J. (2017). ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother. Oncol.*
- Ravetch, J. V, and Bolland, S. (2001). IgG Fc Receptors. *Annu Rev Immunol* *19*, 275–290.
- Redon, C.E., Weyemi, U., Parekh, P.R., Huang, D., Burrell, A.S., and Bonner, W.M. (2012). γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1819*, 743–756.
- Rhind, N., and Gilbert, D.M. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*, 1–26.
- Rinaldi, A.S., Freund, G., Desplancq, D., Sibler, A.P., Baltzinger, M., Rochel, N., Mély, Y., Didier, P., and Weiss, E. (2013). The use of fluorescent intrabodies to detect endogenous gankyrin in living cancer cells. *Exp. Cell Res.* *319*, 838–849.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., and Kaina, B. (2015). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 20–33.
- Rothbauer, U. (2018). Speed up to find the right ones: Rapid discovery of functional nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 199–201.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M.C., et al. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* *3*, 887–889.
- Rybak, P., Waligórska, A., Bujnowicz, Hoang, A., and Dobrucki, J.W. (2015). Activation of new replication foci under conditions of replication stress. *Cell Cycle* *14*, 2634–2647.
- Sanjiv, K., Hagenkort, A., Calderón-Montaño, J.M., Koolmeister, T., Reaper, P.M.M., Mortusewicz, O., Jacques, S.A., Kuiper, R. V., Schultz, N., Scobie, M., et al. (2016). Cancer-

Specific Synthetic Lethality between ATR and CHK1 Kinase Activities. *Cell Rep.* *14*, 298–309.

Saredi, G., Huang, H., Hammond, C.M., Alabert, C., Bekker-Jensen, S., Forne, I., Reverón-Gómez, N., Foster, B.M., Mlejnkova, L., Bartke, T., et al. (2016). H4K20me0 marks post-replicative chromatin and recruits the TONSL–MMS22L DNA repair complex. *Nature* *534*, 714–718.

Sawasdichai, A., Chen, H.T., Hamid, N.A., Jayaraman, P.S., and Gaston, K. (2010). In situ subcellular fractionation of Adherent and non-adherent mammalian cells. *J. Vis. Exp.* *6*, 1–5.

Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 167–202.

Schroeder, H.W.J., and Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41–S52.

Schumacher, D., Helma, J., Schneider, A.F.L., Leonhardt, H., and Hackenberger, C.P.R. (2018). Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* *57*, 2314–2333.

Seibel, N.M., Eljouni, J., Nalaskowski, M.M., and Hampe, W. (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* *368*, 95–99.

Sellmann, C., Doerner, A., Knuehl, C., Rasche, N., Sood, V., Krah, S., Rhiel, L., Messemer, A., Wesolowski, J., Schuette, M., et al. (2016). Balancing selectivity and efficacy of bispecific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) x c-MET antibodies and antibody-drug conjugates. *J. Biol. Chem.* *291*, 25106–25119.

Shaloam, D., and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* *740*, 364–378.

Shao, J., Zhou, B., Chu, B., and Yen, Y. (2006). Ribonucleotide Reductase Inhibitors and Future Drug Design. *Curr. Cancer Drug Targets* *6*, 409–431.

Sharma, N., Zhu, Q., Wani, G., He, J., Wang, Q.E., and Wani, A.A. (2014). USP3 counteracts RNF168 via deubiquitinating H2A and γ H2AX at lysine 13 and 15. *Cell Cycle* *13*, 106–114.

Sibler, A.P., Nordhammer, A., Masson, M., Martineau, P., Trav??, G., and Weiss, E. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals. *Exp. Cell Res.* *286*, 276–287.

Sibler, A.P., Courtête, J., Muller, C.D., Zeder-Lutz, G., and Weiss, E. (2005). Extended half-life upon binding of destabilized intrabodies allows specific detection of antigen in mammalian cells. *FEBS J.* *272*, 2878–2891.

Siddiqui, M.S., François, M., Fenech, M.F., and Leifert, W.R. (2015). Persistent ??H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* *766*, 1–19.

Singh, A., and Xu, Y.J. (2016). The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes (Basel)*. *7*.

Singh, S., Tank, N.K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., and Chugh, V.K. (2018). Monoclonal antibodies. A review. *Curr. Clin. Pharmacol.* *13*, 85–99.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (80-.)*. *228*, 1315–1317.

- Sone, K., Piao, L., Nakakido, M., Ueda, K., Jenuwein, T., Nakamura, Y., and Hamamoto, R. (2014). Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for γ -H2AX production and DNA repair. *Nat. Commun.* *5*, 5691.
- De Sousa Cavalcante, L., and Monteiro, G. (2014). Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur. J. Pharmacol.* *741*, 8–16.
- Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J. Cell Biol.* *181*, 227–240.
- Srivastava, N., Gochhait, S., de Boer, P., and Bamezai, R.N.K. (2009). Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *681*, 180–188.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). Ig heavy chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol.* *193*, 5370–5378.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Office* *26*, 261–292.
- Sundberg, E.J. (2009). Structural Basis of Antibody–Antigen Interactions. *Methods Mol. Biol.* *524*, 23–36.
- Takeiri, A., Matsuzaki, K., Motoyama, S., Yano, M., Harada, A., Katoh, C., Tanaka, K., and Mishima, M. (2019). High-content imaging analyses of γ H2AX-foci and micronuclei in TK6 cells elucidated genotoxicity of chemicals and their clastogenic/aneugenic mode of action. *Genes Environ.* *41*, 1–15.
- Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 535–550.
- Teixeira, S.F., de Azevedo, R.A., Silva, A.C., Braga, R.C., Jorge, S.D., Barbuto, J.A.M., Andrade, C.H., and Ferreira, A.K. (2016). Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. *Biomed. Pharmacother.* *84*, 1019–1028.
- Theile, D. (2017). Under-reported aspects of platinum drug pharmacology. *J. Lipid Res.* *58*, 529–542.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., et al. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* *527*, 389–393.
- Tijink, B.M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-Van Walsum, M., Dreier, T., De Haard, H.J., Leemans, C.R., and Van Dongen, G.A.M.S. (2008). Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: Taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2288–2297.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2014). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *156*, 374.
- Traenkle, B., and Rothbauer, U. (2017). Under the Microscope: Single-Domain Antibodies for

- Live-Cell Imaging and Super-Resolution Microscopy. *Front. Immunol.* 8, 1–8.
- Tripputi, P., Emanuel, B.S., Croce, C.M., Green, L.G., Stein, G.S., and Stein, J.L. (1986). Human histone genes map to multiple chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3185–3188.
- Ubhi, T., and Brown, G.W. (2019). Exploiting DNA replication stress for cancer treatment. *Cancer Res.* 79, 1730–1739.
- Uckelmann, M., and Sixma, T.K. (2017). Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* 56, 92–101.
- Vaisman, A., and Woodgate, R. (2017). Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 52, 274–303.
- Vaneycken, I., D’huyvetter, M., Hernot, S., de Vos, J., Xavier, C., Devoogdt, N., Caveliers, V., and Lahoutte, T. (2011). Immuno-imaging using nanobodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 877–881.
- Vesela, E., Chroma, K., Turi, Z., and Mistrik, M. (2017). Common chemical inductors of replication stress: Focus on cell-based studies. *Biomolecules* 7.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama V(H) sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* 34, 1121–1131.
- Wang, L., Wu, S., Ou, G., Bi, N., Li, W., Ren, H., Cao, J., Liang, J., Li, J., Zhou, Z., et al. (2012). Randomized phase II study of concurrent cisplatin/etoposide or paclitaxel/carboplatin and thoracic radiotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 77, 89–96.
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D.L., King, K., and Nema, S. (2007). Antibody Structure, Instability, and Formulation WEI. *J. Pharm. Sci.* 96.
- Watson, C.T., and Breden, F. (2012). The immunoglobulin heavy chain locus: Genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun.* 13, 363–373.
- Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 317–327.
- Weiss, R.A., and Verrips, C.T. (2019). Nanobodies that neutralize HIV. *Vaccines* 7, 1–14.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., and Taylor, S.S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463–473.
- 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, Y.J., Dougan, M., Jailkhani, N., Ingram, J., Fang, T., Kummer, L., Momin, N., Pishesha, N., Rickelt, S., Hynes, R.O., et al. (2019). Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2019) 116:7624-7631)Doi:10.1073/pnas.1817147116). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 16656.
- Yap, T.A., Plummer, R., Azad, N.S., and Helleday, T. (2019). The DNA Damaging Revolution: PARP Inhibitors and Beyond. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* 185–195.
- Yu, M., Liu, K., Mao, Z., Luo, J., Gu, W., and Zhao, W. (2016). USP11 is a negative regulator to

γH2AX ubiquitylation by RNF8/RNF168. *J. Biol. Chem.* 291, 959–967.

Yuan, G., and Zhu, B. (2012). Histone variants and epigenetic inheritance. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819, 222–229.

Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 841, 43–48.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9.

Zerjatke, T., Gak, I.A., Glauche, I., Mansfeld, J., Zerjatke, T., Gak, I.A., Kirova, D., Fuhrmann, M., Daniel, K., and Gonciarz, M. (2017). Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification Resource Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. 1953–1966.

Zhang, J., Dai, Q., Park, D., and Deng, X. (2016). Targeting DNA Replication Stress for Cancer Therapy. *Genes (Basel)*. 7, 51.

Zhang, Y., Lu, C., Cao, Y., Luo, Y., Bao, R., Yan, S., Xue, M., Zhu, F., Wang, Z., and Duan, L. (2012). Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells in vitro via caspase-3/Mst1 pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 551–557.

Zhenchuk, A., Lotfi, K., Juliusson, G., and Albertioni, F. (2009). Mechanisms of anti-cancer action and pharmacology of clofarabine. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1351–1359.

Zhou, V.W., Goren, A., and Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18.

Ciblage de la Réponse aux Dommages à l'ADN avec des Nanobodies

Résumé

La réponse aux dommages à l'ADN (RDA) regroupe l'ensemble des protéines et mécanismes impliqués dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. Cette RDA est notamment activée lorsque les cellules sont soumises au stress réplicatif, c'est-à-dire lorsque le processus de réplication est ralenti voir stoppé. Les cellules cancéreuses sont naturellement soumises à un stress réplicatif endogène du fait de la perte de certains mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. Certaines classes de molécules utilisées dans le traitement des cancers inhibent le processus de réplication avec comme objectif de générer un stress réplicatif létal. Plus récemment, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de protéines impliquées dans la RDA peut augmenter le niveau du stress réplicatif auquel est exposée une cellule, potentialisant ainsi l'effet des traitements de chimiothérapie. A l'heure actuelle, il n'existe pas de moyen pour quantifier le niveau de stress réplicatif auquel est soumise une cellule et en particulier il n'est pas possible de déterminer si ce stress réplicatif est létal. Mon travail de thèse s'est porté sur l'étude de la phosphorylation de l'histone H2AX, un variant de l'histone H2A, dans le contexte du stress réplicatif. H2AX phosphorylé (γ -H2AX) est un marqueur traditionnellement utilisé pour la détection des cassures double brin d'ADN. Des études ont également décrit la phosphorylation de H2AX en réponse à la détection d'ADN simple brin consécutif du blocage des fourches de réplication, faisant ainsi de γ -H2AX un indicateur du stress réplicatif. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence que la détection de la phosphorylation de H2AX étendue à l'ensemble du compartiment nucléaire est un indicateur de la létalité du stress réplicatif. En parallèle, mes travaux de thèse ont porté sur le développement d'un VHH, domaine de reconnaissance des anticorps à chaîne lourde des camélidés, dirigé contre γ -H2AX. L'objectif poursuivi a été de disposer d'un outil adapté au suivi de la dynamique de cette modification post-traductionnelle dans les cellules vivantes. Pour pouvoir analyser précisément l'induction de γ -H2AX dans les cellules vivantes, une stratégie de relocalisation conditionnelle des VHHs non-liés a été développée dans le cadre d'une collaboration. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent la viabilité de cette stratégie pour l'observation d'antigènes nucléaires et permettent d'envisager son application à d'autres cibles. Enfin, ce VHH a été utilisé pour développer une méthodologie de criblage de produits génotoxiques en une étape. Les résultats obtenus avec ce réactif recombinant confirment l'utilisation possible de VHHs comme alternative aux anticorps monoclonaux traditionnellement utilisés pour la détection des modifications post-traductionnelles.

Mots-clés : Cancer, Biotechnologie, Diagnostic, Anticorps, VHH, Immunociblage, Microscopie en temps réel, Stress réplicatif, H2AX, Modifications post-traductionnelles

Résumé en anglais

The DNA damage response (DDR) refers to the proteins and mechanisms involved in detection and repair of DNA damage. The DDR is activated when cells experience replicative stress, which refers to the slowing or stalling of the replication process. Cancer cells naturally experience endogenous replication stress because of the loss of some mechanisms involved in cell cycle control. Some molecules used in cancer therapy target and inhibit the replication process with the purpose of generating lethal replicative stress. More recently, it has been shown that the inhibition of proteins involved in the DDR can increase the replicative stress level experienced by a cell, thus potentiating the efficiency of therapeutic molecules. To date, there is no method to evaluate the severity of the replicative stress experienced by a cell and it is impossible to evaluate the lethality of this replicative stress. During my thesis, I studied the phosphorylation of H2AX, a histone H2A variant, during replicative stress. Phosphorylated H2AX (γ -H2AX) is traditionally used as a DNA double strand break marker. However, some studies described H2AX phosphorylation in response to the detection of single stranded DNA arising after replication fork stalling, thus making γ -H2AX an indicator of replicative stress. The work produced in this thesis shows that pan-nuclear detection of γ -H2AX is linked to replicative stress lethality. In parallel, I worked on the development of a VHH, the recognition domain of heavy chain antibodies from camelids, recognizing γ -H2AX. The purpose of this work was to track the dynamic of this post-translational modification in live cells. To precisely analyse γ -H2AX induction, a strategy allowing conditional relocalization of unbound VHHs was developed as part of a collaboration. The results obtained show the viability of this strategy to visualize nuclear antigens and allow to envision its use with other targets. Finally, this VHH was used to develop a one-step genotoxicity screening strategy. The results obtained confirm the use of VHHs to detect post-translational modifications as an alternative to monoclonal antibodies.

Keywords: Cancer, Biotechnology, Diagnostic, Antibody, VHH, Immunotargeting, Real-time microscopy, Replicative stress, H2AX, Post-translational modifications