



HAL
open science

Effets du rayonnement ultraviolet a sur la réplication de l'adn chez les eucaryotes supérieurs

Dany Graindorge

► **To cite this version:**

Dany Graindorge. Effets du rayonnement ultraviolet a sur la réplication de l'adn chez les eucaryotes supérieurs. Biologie moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T056 . tel-01124052

HAL Id: tel-01124052

<https://theses.hal.science/tel-01124052>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

de l'UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

Dany GRAINDORGE

EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET A SUR LA RÉPLICATION DE L'ADN CHEZ LES EUCARYOTES SUPÉRIEURS

Soutenue le 10 octobre 2012, devant la commission d'examen :

Président : Pr. Simon SAULE
Rapporteurs : Dr. Kathrin MARHEINEKE
Dr. Pablo RADICELLA
Examineur : Dr. Jean-Sébastien HOFFMANN

Directrice de thèse : Dr. Evelyne SAGE
Co-directeur de thèse : Dr. Pierre-Marie GIRARD

École doctorale de Cancérologie-Biologie-Médecine-Santé
Laboratoire de Biologie des Radiations (Institut Curie, CNRS-UMR3348)

*« On m'a appris que le chemin du
progrès n'était ni rapide ni facile »
Marie Curie*

UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI
Faculté de Médecine

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR
de l'UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI
Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

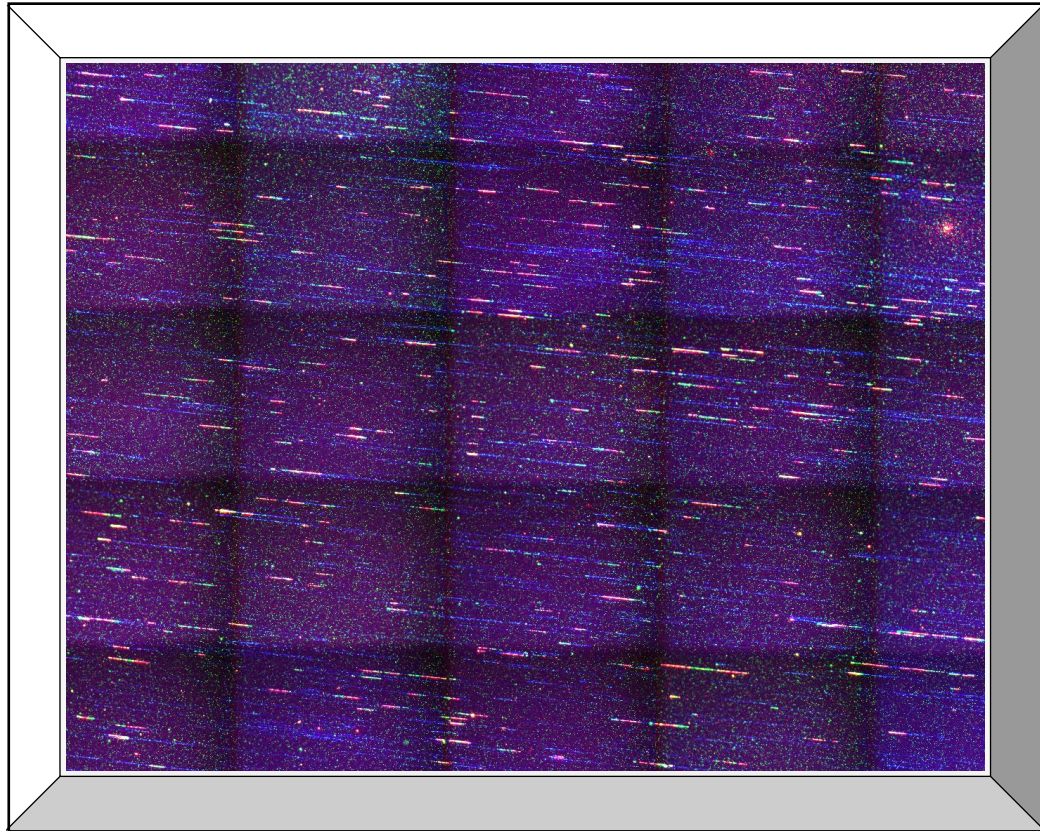
Présentée par

Dany GRAINDORGE

**EFFETS DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET A
SUR LA RÉPLICATION DE L'ADN
CHEZ LES EUCARYOTES SUPÉRIEURS**

Soutenue le 10 octobre 2012, devant la commission d'examen :

Président :	Pr. Simon SAULE
Rapporteurs :	Dr. Kathrin MARHEINEKE Dr. Pablo RADICELLA
Examineur :	Dr. Jean-Sébastien HOFFMANN
Directrice de thèse :	Dr. Evelyne SAGE
Co-directeur de thèse :	Dr. Pierre-Marie GIRARD



« Le nombre de constellations présentes dans cette fenêtre est égale au temps passé en secondes pour analyser les données de peignage. Qui est prêt à relever le défi ? »

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut Curie d'Orsay au sein de l'unité « Stress génotoxiques et Cancer » (UMR 3348), dirigée par le Docteur Mounira AMOR-GUÉRET. Je la remercie vivement de m'avoir accueilli au sein de son unité.

J'exprime ma gratitude au Docteur Evelyne SAGE qui a dirigé cette thèse et m'a donné les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail de recherche. Je suis extrêmement reconnaissante envers le Docteur Pierre-Marie GIRARD qui a encadré cette thèse et contribué à l'aboutissement de ce travail. Leur co-encadrement et la confiance qu'ils m'ont témoignée, m'ont conduit à tirer le meilleur de moi-même et cette expérience me sera sans aucun doute bénéfique pour mon avenir professionnel.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury : le Professeur Simon SAULÉ pour m'avoir fait l'honneur d'accepter « au pied levé » de présider le jury ; les Docteurs Kathrin MARHEINEKE, Pablo RADICELLA et Jean-Sébastien HOFFMANN pour la relecture détaillée de ce manuscrit (y compris les suggestions émises) et leur participation à ma soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse annuel : le Professeur Michelle DEBATISSE, les Docteurs Stefania FRANCESCONI, Sarah LAMBERT, Janet HALL et Laurence BERLINGUE-VERNIS pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'avancement de ce travail et pour leurs précieux conseils scientifiques.

Un grand merci à tous ceux qui ont collaboré, de près ou de loin, avec moi : le Docteur Jérôme GUITTON (CH de Lyon), le Docteur Jun KOMATSU & les autres membres du personnel de Genomic Vision, le Docteur Vincent PUECH et son « plasma maison » (Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas), le Docteur Lionel LARUE, les Docteurs Fabrice CORDELIÈRES & Pauline CHABOSSEAU (Plateforme d'imagerie), Sylvain (Génial, tu as réussi à relever le défi !), Agata et Leyya ; leur compétence et leur sympathie ont contribué au bon déroulement de mes 4 années de thèse.

Je remercie les autres membres de l'équipe : Angela, « C'est avec plaisir, que je souligne notre entraide mutuelle ! » Ludo, Esma et Yuliya et ceux de l'unité « Stress génotoxiques et Cancer », ainsi que le personnel administratif (Odile & Pascale), de la laverie (Christine & Isabelle), des services généraux & techniques (Denise, Stéphane, Jean-Jacques « Aïe Aïe mon vélo !!! ») et du service informatique qui m'ont permis de faciliter mon travail au quotidien.

J'adresse mes sincères remerciements au Domaine d'Intérêt Majeur Santé Environnement Toxicologie de l'Île-de-France et à la Ligue contre le Cancer pour leur soutien financier.

Merci à tous les doctorants et post-docs (passés et actuels) avec qui j'ai sympathisé et passé d'agréables moments scientifiques et amicaux : Jérémie, Pauline, Agata, Sébastien, Tiantian, Clémentine, Nicolas, Violena, Audrey, Ismail, Karim, Marie-Thérèse, Emilie, Maria, Géraldine, Mohammed, Monia, Morgane, Maria, Filippo, Ewa, Coralie, Flore, Amélie,

Merci à toutes les sportives du mardi midi et à Marie: « Hé oui, faire de la gym en votre compagnie fut une véritable bouffée d'oxygène ; sans oublier les fou rires, que de bons souvenirs ! ».

Merci à tous mes amis Normands et tout particulièrement à Paméla, Marianne, Sandrine et Nono pour tous les bons moments passés ensemble, et pour leur soutien.

Ces dernières lignes de remerciements je les dédie à ma famille : ma nièce Morgane et à ses éclats de rire (au cours de la rédaction), mon filleul Mathis, mon frère, mes grands-mères, mes cousins et cousines, mes oncles et tantes ; et mes parents « Merci, n'est certainement pas le mot approprié pour vous témoigner ma profonde reconnaissance, grâce à vous j'ai réussi à surmonter les obstacles, en effet vous vous êtes toujours rendus disponibles pour moi, ainsi votre soutien a énormément contribué à la réalisation de ces travaux de recherche ».

Résumé

Le rayonnement ultraviolet (UV) émis par le soleil et qui atteint la peau de chaque individu est composé majoritairement de photons UVA (λ de 315 à 400 nm), le reste (5 à 10 %) étant composé d'UVB les plus longs (λ de 300 à 315 nm), car les radiations de longueur d'onde < 300 nm, c'est-à-dire les plus toxiques en terme de santé humaine, sont absorbées par la couche d'ozone stratosphérique. Contrairement aux UVB, les radiations UVA sont faiblement absorbées par l'ADN et de fait, génèrent peu de dimères cyclobutaniques de pyrimidines. Néanmoins, un des problèmes majeurs posés par une exposition aux UVA tient à ce que ce rayonnement excite certains composés endogènes photosensibles, inducteurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent alors endommager les composants cellulaires tels que les lipides, les acides nucléiques et les protéines. De ce fait, si les UVB restent le facteur étiologique majeur contribuant à la cancérogenèse cutanée photoinduite, un rôle des UVA, *via* la production de ROS, semble également émerger. Des précédents travaux obtenus au laboratoire ont montré que le rayonnement UVA ralentit la réplication de l'ADN, indépendamment de l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les UVA, *via* l'oxydation des protéines, pouvaient altérer la machinerie de réplication. Mon travail de thèse a donc consisté à tenter de préciser le mécanisme qui gouverne ce retard de la réplication de l'ADN induit par les UVA dans les cellules de mammifères.

Pour étudier au niveau moléculaire les effets des UVA sur la réplication, nous avons tout d'abord mis en place et utilisé au laboratoire la technique du peignage moléculaire (DNA combing) qui permet de mesurer divers paramètres de la réplication. Ainsi, nous montrons que le rayonnement UVA inhibe immédiatement et transitoirement les vitesses de fourches alors que l'inhibition sur l'initiation des origines est plus prolongée. Dans le cadre d'une collaboration, nous montrons également que les radiations UVA induisent une diminution modeste et transitoire du pool de dNTPs intracellulaires. La complémentation en ribonucléosides ne semble pas suffisante pour restaurer une vélocité normale de fourches immédiatement après UVA, ni la réplication dans sa totalité. En parallèle, nous observons l'oxydation réversible de la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase impliquée dans la biosynthèse des dNTPs. Bien que cette oxydation ne puisse expliquer la baisse transitoire du pool de nucléotides après UVA, nous ne pouvons pas exclure que d'autres formes d'oxydation de la RNR puissent affecter son activité. La présence d'azide de sodium (NaN_3) au cours de l'irradiation UVA prévient le retard réplcatif, limite l'oxydation de la sous-unité R1 et la diminution du pool de dNTPs, ce qui démontre que ce retard de réplication est totalement dépendant des ROS, principalement de l'oxygène singulet généré pendant l'irradiation.

L'ensemble de nos résultats indiquent que les UVA affectent le processus de réplication en modifiant non seulement la vélocité des fourches mais également l'initiation des origines de réplication. Puisqu'une perturbation de la réplication est une cause majeure d'instabilité génétique, il reste à déterminer si, dans nos conditions expérimentales, les radiations UVA favorisent cette instabilité. Enfin, nous pensons que la ou les cibles des ROS induites par les UVA sont essentiellement cytosoliques et que le mécanisme conduisant à l'inhibition de la réplication n'est pas spécifique de ces ROS mais pourrait s'observer en utilisant d'autres types de stress oxydant.

Mots-clés : UVA, stress oxydant, réplication, élongation, initiation, dNTPs, ribonucléotide réductase.

SOMMAIRE

➤	Liste des figures _____	9
➤	Liste des tableaux _____	11
➤	Liste des abréviations _____	12
➤	Glossaire _____	14

INTRODUCTION _____ 15

I. Réplication chromosomique chez les eucaryotes _____ 16

A.	Processus moléculaire de la réplication _____	16
1.	Initiation _____	17
i.	Reconnaissance des origines de réplication _____	17
ii.	Activation des origines _____	24
2.	Elongation _____	27
3.	Terminaison _____	29
4.	Régulation spatio-temporelle de la réplication _____	31
B.	dNTPs, les précurseurs essentiels à la réplication _____	35
1.	La ribonucléotide réductase et la synthèse des dNTPs _____	35
2.	Synthèse de l'ADN <i>via</i> l'ADN polymérase _____	40
3.	Pool de dNTPs et instabilité génomique _____	41
C.	Les causes et les conséquences d'une réplication perturbée _____	42
1.	Les causes du stress réplicatif _____	42
i.	Sources exogènes _____	42
ii.	Sources endogènes _____	43
2.	Activation du point de contrôle intra-S _____	47
D.	Analyse de la dynamique de réplication par peignage moléculaire _____	50
1.	Principe du peignage moléculaire dynamique _____	50
i.	Ancrage de la molécule d'ADN à une surface solide _____	51
ii.	Elongation des fibres d'ADN _____	52
iii.	Points d'attaches de la molécule _____	53
2.	Application du peignage moléculaire à l'étude de la réplication de l'ADN _____	54
i.	Utilisation d'analogues de bases halogénées _____	54
ii.	Différents paramètres analysés : vitesse des fourches, asymétrie de fourches, distance inter-origines, densité de fourches et terminaison _____	57
iii.	Conclusion _____	59

II. Le rayonnement ultraviolet A _____ 60

A.	Le rayonnement UV _____	60
B.	Stress oxydatif généré par les radiations UVA _____	62
1.	La production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène <i>via</i> des photosensibilisateurs _____	62
2.	Les systèmes de détoxification _____	63
3.	La photoprotection exogène _____	65

C.	Effets des UVA sur les macromolécules biologiques _____	66
1.	Les dommages de l'ADN induits par les UVA _____	66
2.	L'oxydation des protéines _____	69
3.	Les dommages lipidiques _____	70
D.	Radiations UVA et cancer de la peau _____	71
III.	Préambule : la problématique de la thèse _____	73
	RÉSULTATS _____	76
I.	Analyse du retard global de réplication en réponse aux radiations UVA par cytométrie de flux _____	77
A.	Contexte _____	77
B.	Résultats _____	77
C.	Conclusion _____	85
II.	Etude de la vitesse de fourches en réponse aux radiations UVA _____	86
A.	Contexte _____	86
B.	Résultats _____	87
1.	Diminution instantanée de la vitesse de fourches _____	87
2.	Ralentissement transitoire de la vitesse de fourches _____	93
3.	Mesure de la symétrie/asymétrie _____	101
C.	Conclusion _____	103
III.	Evaluation du contenu intracellulaire en dNTPs après exposition aux UVA _____	104
A.	Contexte _____	104
B.	Résultats _____	104
1.	Mesure du niveau d'expression des dNTPs immédiatement après exposition aux UVA _____	104
2.	Diminution transitoire et modérée des dNTPs _____	106
3.	Effet de la complémentation en nucléosides sur le retard de réplication induit par les UVA _____	109
C.	Conclusion _____	111
IV.	Etude de la densité des fourches de réplication après irradiation aux UVA _____	112
A.	Contexte _____	112
B.	Résultats _____	118
C.	Conclusion _____	121
V.	Etude de l'expression et des modifications oxydatives des protéines de la réplication en réponse aux radiations UVA _____	122
A.	Contexte _____	122
B.	Résultats _____	123
1.	Ribonucléotide réductase _____	123
2.	Acteurs protéiques de la machinerie réplivative _____	125
C.	Conclusion _____	128

DISCUSSION & PERSPECTIVES	129
I. Discussion :	130
A. UVA et vélocité des fourches de réplication	131
B. UVA et activation des origines	136
II. Perspectives :	139
A. Isoler un facteur particulier dont la déficience pourrait expliquer l'inactivation des origines post-UVA	139
B. L'inactivation des origines est-elle liée à un remodelage de la chromatine post-UVA ?	140
C. Quel est le pattern spatio-temporel des foyers de réplication après exposition aux UVA ?	140
D. Stress oxydatif et retard réplcatif ?	141
E. UVA et instabilité génétique ?	142
MATÉRIEL & MÉTHODES	144
1. Culture cellulaire	145
2. Synchronisation cellulaire à l'aphidicoline (APC)	145
3. Traitements	145
i. Irradiation aux UVA	145
ii. Traitement avec les antioxydants	146
iii. Complémentation en ribonucléosides	146
4. Mesure de la viabilité cellulaire : test MTT	146
5. Cytométrie en flux	147
i. Cycle cellulaire	147
ii. Mesure des ROS	148
6. Préparation des extraits protéiques	148
7. Western-blot	149
8. Peignage moléculaire	152
i. Silanisation des lamelles	152
ii. Peignage	152
iii. Immunofluorescence	153
iv. Acquisition des images	154
9. Dosage des dNTPs par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)	155
i. Préparation des échantillons	155
ii. Dosage des dNTPs	155
iii. Dosage du BrdU et BrdUTP	155
10. Analyse des données brutes	156
i. Traitement des images par Image J	156
ii. Quantification des dNTPs	156
11. Test statistique	156
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	187

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les deux principales étapes de la réplication.	16
Figure 2 : Mise en place du complexe pré-réplicatif (pré-RC) est dépendante des CDK.	19
Figure 3 : Assemblage du complexe pré-réplicatif (pré-RC).	21
Figure 4 : Interaction d'ORC (sous-unités 1 à 6) avec Cdt1 et Cdc6.	22
Figure 5 : Régulation de Cdt1 médiée partiellement par la géminine.	23
Figure 6 : Conversion du complexe pré-RC en un complexe pré-IC.	24
Figure 7 : Activation des origines sous le contrôle des DDK et S-CDK.	26
Figure 8 : Modélisation d'une fourche de réplication eucaryote.	27
Figure 9 : Terminaison de la réplication.	29
Figure 10 : Mécanisme moléculaire de la réplication de l'ADN chez les mammifères.	30
Figure 11 : Régulation de la réplication <i>via</i> le cycle cellulaire.	31
Figure 12 : Modèle du « réplicon flexible ».	32
Figure 13 : Programme spatio-temporel de réplication.	34
Figure 14 : Régulation du pool de dNTPs après dommages à l'ADN.	37
Figure 15 : Voies de synthèse <i>de novo</i> des dNTPs.	39
Figure 16 : Incorporation de dNTPs dans l'ADN.	40
Figure 17 : Facteurs endogènes qui contribuent au stress réplcatif.	44
Figure 18 : Effets de la machinerie transcriptionnelle sur la progression des fourches de réplication.	46
Figure 19 : Activation du point de contrôle intra-S.	49
Figure 20 : Peignage moléculaire dynamique.	51
Figure 21 : Représentation schématique du peignage d'une molécule d'ADN.	52
Figure 22 : Représentation schématique d'une molécule d'ADN peignée sur une lamelle de verre.	53
Figure 23 : Structures réplcatives de l'ADN chez <i>Xenopus laevis</i>	55
Figure 24 : Analyse de la dynamique de réplication sur ADN peigné.	56
Figure 25 : Paramètres de la réplication de l'ADN et barrières de fourches.	58
Figure 26 : Le rayonnement UV et la peau.	61
Figure 27 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) <i>via</i> une réaction de type I ou II.	63
Figure 28 : Superposition du spectre d'absorption de l'ADN et du spectre d'émission de la lumière solaire dans la région spectrale des UV.	67
Figure 29 : Distribution des dommages de l'ADN après exposition aux UVA.	68
Figure 30 : Formation de lipides hydroperoxydes (LOOH).	71
Figure 31 : Ralentissement de la phase S après exposition aux UVA.	78
Figure 32 : Synchronisation des fibroblastes humains transformés MRC5Vi en début de phase S par traitement à l'aphidicoline (APC).	80
Figure 33 : Ralentissement de la phase S après exposition aux UVA dans les cellules MRC5Vi synchronisées en début ou milieu de phase S.	81
Figure 34 : Extension de la phase S dans des fibroblastes humains MRC5Vi synchronisés en milieu de phase S dépend de la dose d'UVA.	82

Figure 35 : Abolition du retard réplcatif induit par les UVA en présence d'azide de sodium (NaN ₃).	84
Figure 36 : Les radiations UVA induisent une production transitoire de ROS.....	85
Figure 37.A : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement après radiation.	88
Figure 37.B : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement après radiation.	89
Figure 38.A : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement ou 40 minutes après irradiation.	90
Figure 38.B : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement ou 40 minutes après irradiation.	91
Figure 39 : La présence d'azide de sodium pendant l'exposition aux UVA prévient le ralentissement des fourches de réplication.	92
Figure 40 : L'irradiation des cellules dans le PBS limite l'effet des UVA sur le ralentissement des fourches de réplication.	93
Figure 41 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.	94
Figure 42 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.	95
Figure 43 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.	99
Figure 44 : Distribution de la symétrie et asymétrie des fourches après irradiation.	102
Figure 45 : Effet du NaN ₃ sur le niveau intracellulaire de chacun des dNTPs immédiatement après UVA.	105
Figure 46 : Le pool de dNTPs est transitoirement et modérément réduit après UVA.	106
Figure 47 : Effet protecteur du NaN ₃ sur les niveaux intracellulaires des 4 dNTPs durant une exposition aux UVA.	108
Figure 48 : Complémentation en ribonucléosides dans des fibroblastes MRC5Vi.....	110
Figure 49 : Complémentation en ribonucléosides restaure partiellement l'élongation de la réplication après UVA.	110
Figure 50 : Complémentation en ribonucléosides ne protège pas la réplication d'un retard après UVA.	111
Figure 51 : Viabilité cellulaire des fibroblastes transformés MRC5Vi et primaires MRC5 en réponse aux radiations UVA.	113
Figure 52 : Ralentissement de la phase S dans des cellules primaires asynchrones dépend des ROS générées par les UVA.	114
Figure 53 : Perte d'amplitude du signal BrdU après exposition aux UVA.	116
Figure 54 : Mécanisme du retard réplcatif induit par les radiations UVA.	121
Figure 55 : Modification oxydative et transitoire de R1, immédiatement après UVA.	124
Figure 56 : Effet du rayonnement UVA sur la quantité de protéines ATR, Chk1, Cdc6, Cdc7, Dbf4, Cdc45, MCM2, ORC2, PCNA et RPA32 liées ou non à la chromatine.	127
Figure 57 : Etat oxydo-rédox de la sous-unité R1.....	135
Figure 58 : Modèle hypothétique du retard réplcatif induit par les radiations UVA.	138
Figure 59 : Profil spatio-temporel des foyers de réplication durant la phase S.	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Conservation des protéines de la réplication chez les eucaryotes.	20
Tableau 2 : Les sous-unités de la ribonucléotide réductase.	38
Tableau 3 : Valeurs de l'équation obtenue à partir de la courbe de tendance linéaire.	95
Tableau 4 : Valeurs théoriques de vélocité des fourches.	96
Tableau 5 : Différences de distance et de temps.	97
Tableau 6 : Récapitulatif des différents paramètres de la réplication obtenus.	100
Tableau 7 : La quantité intracellulaire de BrdUTP est similaire avant ou après UVA.	117
Tableau 8 : Inactivation des origines après exposition aux UVA dans des MRC5Vi asynchrones.	119
Tableau 9 : Inactivation des origines après exposition aux UVA dans des MRC5Vi synchronisées est dépendante des ROS produites par les UVA.	120
Tableau 10 : Liste des différents anticorps primaires utilisés au cours de cette étude.	151

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénosine
APC	Aphidicoline
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATPase	Adénosine triphosphate synthétase
ATR	Ataxia telangiectasia rad3
ATRIP	ATR interacting protein
β -mer	β -mercaptoéthanol
BrdU	5-bromo-2'-désoxyuridine
BrdUTP	5-bromo-2'-désoxyuridine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosine
Cdc	Cell division cycle
CDK	Cyclin-dependent kinase
CldU	Chlorodésoxyuridine
CMG	complexe Cdc45-MCM-GINS
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
dATP	désoxyadénosine triphosphate
Dbf4	Dumbbell former 4
dCTP	désoxycytosine triphosphate
DDK	Dbf4-dependent kinase cdc7
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
DHR123	Dihydrorhodamine 123
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNDP	désoxynucléotide diphosphate
dNMP	désoxynucléotide monophosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DSB	Double strand break
DTT	Dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EdU	5-éthynyl-2-désoxyuridine
FEN1	Flap endonucléase 1
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	Guanosine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GP	Glutathion peroxydase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion
HPLC	High performance liquid chromatography
HU	Hydroxyurée
IdU	Iododésoxyuridine

MCM	Mini chromosome maintenance
MCM2-7 _i	MCM2-7 inactif
MDA	Malondialdéhyde
MEM	Milieu complet
MEMi	Milieu sans rouge phénol (incolore)
MES	acide 4-morpholine éthane sulfonique
MES-E	MES-EDTA
MS	Mass spectroscopy
NAC	N-acétylcystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaN ₃	Azide de sodium
NEM	N-éthylmaléimide
NHSF	Normal human skin fibroblast
Nsides	ribonucléosides
NP40	Nonylphényl 40
Nsides	ribonucléosides
ORC	Origin replication complex
¹ O ₂	Oxygène singulet
³ O ₂	Oxygène à l'état de triplet
8-oxodGTP	8-oxodésoxyguanosine triphosphate
8-oxoG	8-oxoguanine
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PK	Protéinase K
Pré-IC	Pre-initiation complex
Pré-RC	Pre-replication complex
R1	sous-unité 1 de la RNR
R2	sous-unité 2 de la RNR
RFB	Replication fork barrier
RFC	Replication factor C
RNAP	RNA polymérase
RNase A	Ribonucléase A
(r)NDP	(ribo)nucléotide diphosphate
RNR	Ribonucléotide réductase
(r)NTP	(ribo)nucléotide triphosphate
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replicative protein A
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSB	Single strand break
TBS	Tris buffered saline
TER	Terminaison
Trx	Thiorédoxine
TTP	Thymidine triphosphate
U	Uridine
UV (A, B, C)	Ultraviolet A, B, C

GLOSSAIRE

S0R	0 heure de relâchement post-synchronisation
S4R	4 heures de relâchement post-synchronisation
Licensing	Permis de répliquer
Firing	Activation des origines de réplication
IC50	Intervalle de confiance à 50%

INTRODUCTION

I. Réplication chromosomique chez les eucaryotes

A. Processus moléculaire de la réplication

Au cours du cycle de vie de toutes cellules, l'information génétique, portée par la double hélice d'ADN, doit être fidèlement et intégralement dupliquée avant que la division cellulaire ne prenne part. Cette transmission complète du patrimoine génétique est assurée par un processus cellulaire nommé réplication. La réplication de l'ADN se déroule en deux étapes majeures, l'initiation et l'élongation, durant lesquelles des complexes protéiques se fixent sur les origines pour permettre l'ouverture de la double hélice d'ADN, ainsi que la synthèse bidirectionnelle et semi-conservative des brins (Figure 1). La rencontre de deux fourches convergentes conduit à la terminaison de la réplication. L'ensemble de ce processus, qui a lieu majoritairement au cours de la phase S, est finement coordonné avec les autres phases du cycle cellulaire (Kelly & Brown, 2000). Cette régulation intervient principalement au niveau de la mise en place des complexes d'initiation de la réplication de l'ADN *via* des interactions avec les mécanismes contrôlant la progression du cycle cellulaire (Diffley, 2011 ; Nasheuer et al, 2002).

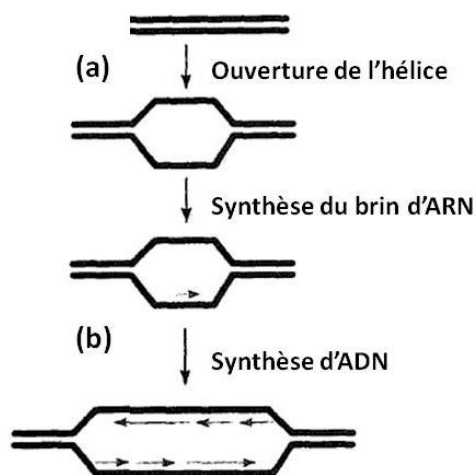


Figure 1 : Les deux principales étapes de la réplication.

(a) Activation de l'initiation par ouverture de la double hélice d'ADN au niveau des origines, (b) Elongation par synthèse bidirectionnelle et semi-conservative des brins.

Adapté d'après (Kodadek, 1998).

1. Initiation

Des expériences réalisées à partir de modèles d'eucaryotes unicellulaires, telles que les levures *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, ont permis d'identifier les acteurs protéiques qui agissent au niveau des origines de réplication pour initier la synthèse de l'ADN (Araki, 2011). Il est clairement défini que l'activité de ces protéines d'initiation est finement régulée par des protéines spécifiques, les kinases, pour assurer une duplication unique du génome par cycle cellulaire et ainsi garantir sa stabilité.

L'initiation de la réplication a pour objectif la mise en place d'un grand nombre de facteurs protéiques nécessaires à l'élongation de la réplication. Elle comprend la reconnaissance des origines de réplication par le complexe protéique « ORC » (Origin Recognition Complex), l'assemblage des complexes pré-réplcatif (pré-RC) et de pré-initiation (pré-IC) par recrutement d'autres facteurs protéiques pour ainsi obtenir une origine active, et enfin la synthèse des amorces d'ARN.

i.Reconnaissance des origines de réplication

Les origines de réplication sont définies comme la région (séquence d'ADN) où s'initie la réplication de l'ADN. Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la cartographie systématique des origines de réplication (appelées ARS pour « Autonomous Replication Sequence ») est maintenant bien établie et sont caractérisées par des îlots riches en AT (Berbenetz et al, 2010 ; Heichinger et al, 2006 ; Nieduszynski et al, 2006 ; Xu et al, 2012). Chez l'Homme, Cadoret et coll. ont identifié 283 origines de réplication dans les cellules HeLa mais en exploitant que 1 % du génome et ont démontré que la densité des origines actives est corrélée avec des régions riches en GC (Cadoret et al, 2008). En identifiant 150 nouvelles origines de réplication dans ce même modèle cellulaire, Karnani et coll. ont révélé l'influence de la régulation transcriptionnelle et de la structure chromatinienne sur la sélection des origines (Karnani et al, 2010). Récemment, Cayrou et coll. ont rapporté pour la première fois l'existence d'un motif conservé, OGRE, qui est une séquence riche en G présente dans 67 % à 90 % des origines de réplication de la Drosophile à l'Homme et qui permet la prédiction de structures G quadruplexes (Cayrou et al, 2012). Chez l'Homme, une autre étude réalisée sur génome entier a permis de mettre en évidence l'existence potentielle de 350000 origines pourvues d'un motif G quadruplexe (Besnard et al, 2012). Il existe une banque de données qui regroupe l'ensemble des origines de réplication eucaryotes identifiées à ce jour [<http://tubic.tju.edu.cn/deori> ; (Gao et al, 2012)].

Les paramètres qui vont définir le choix des origines commencent à être de plus en plus caractérisés. Ces paramètres dépendent de la séquence, de la topologie de l'ADN, de la présence ou non de nucléosome, et de la transcription [Figure 2 ; (Mechali, 2010)]. Ainsi, les travaux de Karnani et coll. suggèrent que dans les cellules HeLa, l'initiation de la réplication a lieu dans des régions riches en AT, proches de sites d'initiation de la transcription, et dans des régions de chromatines ouvertes (Karnani et al, 2010). Un travail récent du groupe de M. Méchali montre, à partir d'une analyse globale du génome de drosophile et de souris, que les îlots CpG (éléments essentiels pour le contrôle de la transcription et qui sont régulés par méthylation de l'ADN) contiennent des origines de réplication, et que ces origines sont préférentiellement concentrées dans des régions contenant des promoteurs de transcription (Cayrou et al, 2011).

Bien que la séquence et la structure des origines divergent entre les espèces, les protéines de l'initiation de la réplication sont extrêmement bien conservées, comme le démontre le tableau 1 (Tabancay & Forsburg, 2006). Chez les eucaryotes, le complexe protéique fondamental dans la reconnaissance des origines est le complexe ORC (Bell & Stillman, 1992). Ce complexe hétéro-hexamérique est formé de 6 sous-unités (ORC1 à ORC6) et sert de plateforme de recrutement pour les acteurs du complexe pré-répliatif [pré-RC ; (Bell, 2002)]. Cette sélection des origines semble être dépendante de l'activité ATPase de la protéine ORC1 (Ohta et al, 2003). En effet, les sous-unités de ORC (2 à 5) humaines se lient à l'ADN et initient la réplication seulement lorsque l'origine est associée à ORC1 (Radichev et al, 2006 ; Vashee et al, 2001). Contrairement aux sous-unités ORC2 à ORC5, la localisation de la sous-unité ORC1 est variable au cours du cycle cellulaire (Tatsumi et al, 2003). Cette dernière se dissocie de la chromatine durant la phase S *via* sa dégradation, puis s'y réassocie à la fin de la mitose (Kreitz et al, 2001 ; Li & DePamphilis, 2002). De plus, ORC6 est essentielle à l'initiation chez la levure (Chen et al, 2007), mais pas chez l'homme (Dhar et al, 2001). De ce fait, et contrairement aux levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* chez qui la liaison du complexe ORC à l'ADN semble avoir lieu tout au long du cycle cellulaire ; chez les mammifères l'activité du complexe ORC semble être régulée au cours du cycle cellulaire (Bell & Dutta, 2002). De cette association ORC-origine, il en résulte la formation du complexe pré-RC en fin de mitose et durant la phase G1 du cycle cellulaire, *via* le recrutement de protéines initiatrices dont le chargement à la chromatine est régulée par l'activité des kinases mitotiques CDK (Cyclin-Dependent Kinase) [Figure 2 ; (Mendez & Stillman, 2000)].

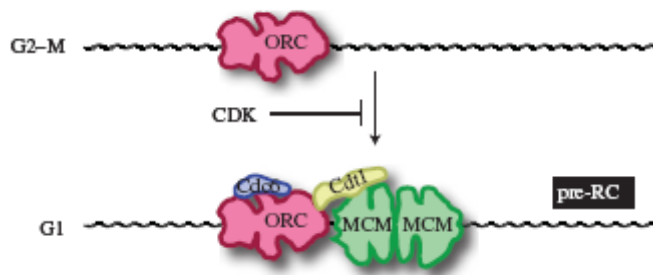


Figure 2 : Mise en place du complexe pré-répliatif (pré-RC) est dépendante des CDK.

D'après (Diffley, 2011).

Protéines	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Human</i>	<i>Xenopus</i>
Cdc6	Cdc6	Ddc18	Cdc6	Cdc6	Cdc6
Cdc7	Cdc7	Hsk1	Cdc7	Cdc7	Cdc7
Cdc45	Cdc45	Sna41, Cdc45	Cdc45	Cdc45	Cdc45
Ctf4	Ctf4, Chl15, Pob1	Mcl1	?	AND-1	?
Cdt1	Tah11, Sid2	Cdt1	Dup (double-parked)	Cdt1	Cdt1
Dbf4	Dbf4, Dna52	Dfp1, Him1	Chiffon	Dbf4, ASK	Dbf4
Dpb11	Dpb11	Rad4, Cut5	Mus101	TopBP1, Cut5	Xmus101
Geminin	No homologue	No homologue	Geminin	Geminin	Geminin
GINS :					GINS
PSF2	Psf2, Cdc102	Psf2, Bsh3	?	Psf2, Bsh3	Psf2
PSF3	Psf3	Psf3	?	?	Psf3
SLD5	Sld5, Cdc105	Sld5	?	?	Sld5
PSF1	Psf1, Cdc101	Psf1	?	?	Psf1
HP1	No homologue	Swi6	Su(var)2-5	HP1 α , β , γ	HP1
Mcm2	Mcm2	Mcm2, Cdc19, Nda1	DmMcm2	BM28, Mcm2	Mcm2
Mcm3	Mcm3	Mcm3	DmMcm3	Mcm3	Mcm3
Mcm4	Mcm4, Cdc54	Mcm4, Cdc21	DmMcm4, Dpa (diusk proliferation abnormal)	Mcm4	Mcm4
Mcm5	Mcm5, Cdc46	Mcm5, Nda4	DmMcm5, DmCdc46	Mcm5	Mcm5
Mcm6	Mcm6	Mcm6, Mis5	DmMcm6	Mcm6	Mcm6
Mcm7	Mcm7, Cdc47	Mcm7	DmMcm7	Mcm7	Mcm7
Mcm8	No homologue	No homologue	?	Mcm8	?
Mcm10	Mcm10, Dna43	Cdc23, Mcm10	Mcm10	Mcm10	Mcm10
ORC1-6	Orc1-6	Orp1-6, Orc1-6	DmORC1-6	ORC1-6	XOrc1-6

?=non
identifié

Tableau 1 : Conservation des protéines de la réplication chez les eucaryotes.

D'après (Tabancay & Forsburg, 2006).

Durant la phase G1 du cycle cellulaire, Cdc6 (Cell division cycle 6) et Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) sont recrutées par le complexe ORC, facilitant ainsi l'ancrage de l'hélicase MCM2-7 inactive (Mini-Chromosome Maintenance ; MRCM2-7_i) à la chromatine. Cet ensemble de facteurs protéiques (ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7_i) correspond au complexe pré-répliatif [pré-RC ; (Mendez & Stillman, 2003)]. Cette étape est appelée « licensing » ou « permis de répliquer », étant donné qu'elle rend l'ADN compétant pour la réplication ou en d'autres termes l'origine est compétente pour être activée [Figure 3 ; (Nishitani et al, 2004)].

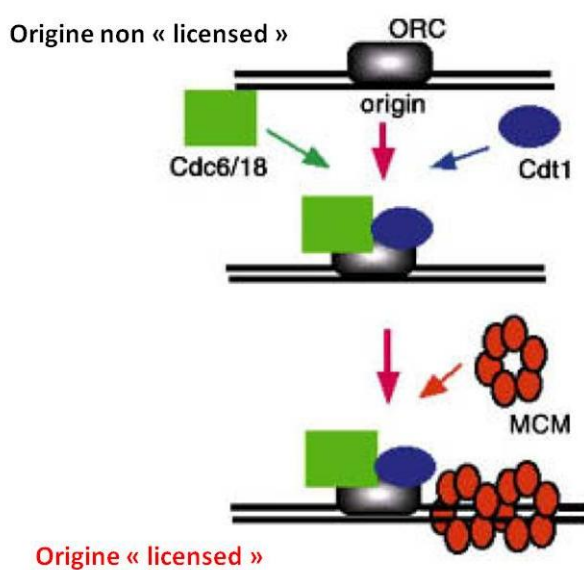


Figure 3 : Assemblage du complexe pré-répliatif (pré-RC).

ORC, cdc6, cdt1 et MCM2-7_i participent activement au « licensing » d'une origine. Adapté d'après (Nishitani & Lygerou, 2002).

Aux origines de réplication, le complexe ORC recrute indépendamment l'ATPase Cdc6 et Cdt1. En effet, Cdc6 et Cdt1 interagissent avec ORC1 et ORC6, respectivement [Figure 4 ; (Duncker et al, 2009)]. La protéine Cdt1 est recrutée sur le complexe ORC-Cdc6, autorisant ainsi le recrutement de l'hélicase MCM2-7_i autour de l'ADN (Maiorano et al, 2006). Etant donnée l'activité ATPase des protéines ORC et Cdc6, ces dernières peuvent fournir, *via* une hydrolyse d'ATP, l'énergie requise pour charger le complexe MCM2-7_i (Randell et al, 2006). De plus, des études ont montré que ce chargement de MCM2-7_i est aussi contrôlé par l'activité de l'histone acétylase HBO1 (Human acetylase Binding to ORC1) qui interagit directement avec Cdt1 durant la phase G1 (Miotto & Struhl, 2008 ; Miotto & Struhl, 2010). Après cette étape, l'origine de réplication est considérée comme complètement compétente. A la suite du chargement de l'hélicase MCM2-7_i, les protéines ORC et Cdc6 peuvent être éliminées de la chromatine sans

empêcher la réplication de l'ADN indiquant que leur fonction essentielle est probablement de charger l'hélicase MCM2-7_i (Hua & Newport, 1998 ; Rowles et al, 1999).

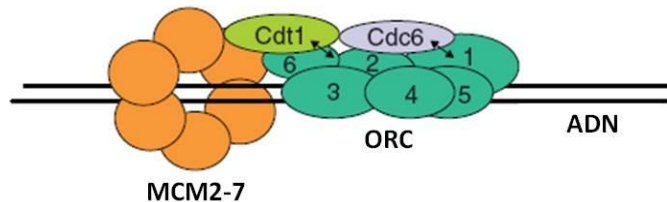


Figure 4 : Interaction d'ORC (sous-unités 1 à 6) avec Cdt1 et Cdc6.

Adapté d'après (Duncker et al, 2009).

Les protéines MCM2-7_i sont des composants majeurs du complexe pré-RC formé avant le début de la phase S au niveau des origines de réplication de l'ADN (Maiorano et al, 2006). Les 6 membres du complexe font également tous partis de la famille des ATPases AAA+. Cet hétérohexamère forme une bague qui enserre la double hélice d'ADN et possède une activité hélicase essentielle à l'initiation et à l'élongation de la réplication chez les eucaryotes (Forsburg, 2004 ; Forsburg, 2008). A partir du moment où le complexe MCM2-7_i est chargé, l'origine de réplication est considérée comme compétente.

Toutefois, la réplication du génome ne doit avoir lieu qu'une seule et unique fois par cycle cellulaire. Pour éviter ou empêcher la re-réplication, les acteurs du « licensing » (ORC, Cdt1 et Cdc6) doivent être soumis à une régulation fine. La conséquence directe sera d'empêcher l'amorçage d'une nouvelle hélicase MCM2-7_i sur une origine déjà active. En effet, la surexpression de Cdt1 est suffisante pour induire une ré-initiation des origines au cours d'un même cycle cellulaire (Vaziri et al, 2003). Pour éviter que ce phénomène n'ait lieu et conduise à une instabilité génétique, l'expression de Cdt1 doit être hautement contrôlée et n'être effective que pendant la phase G1. Soit cette protéine est phosphorylée par cdk2-cycline A puis dégradée par protéolyse au cours de la phase S (Nishitani et al, 2004), soit l'activité de Cdt1 est inhibée par une petite protéine régulatrice nommée gémimine pendant les phases S et G2 [Figure 5 ; (Lutzmann et al, 2006)]. D'autre part, la phosphorylation des protéines ORC1 et Cdc6 par les CDK (Cyclin-Dependent Kinase) et DDK (Dbf4-Dependent Kinase Cdc7) favoriserait leur poly-ubiquitination, leur exportation vers le cytoplasme et leur dégradation par le protéasome à la fin de la phase S (Delmolino et al, 2001 ; DePamphilis, 2003). Contrairement à la gémimine, la protéine MCM9 est un régulateur positif de Cdt1 et permet donc le chargement de MCM2-7_i (Lutzmann & Mechali, 2008). A la transition M/G1, la gémimine est dégradée sous l'action

d'APC (Anaphase Promoting Complex), et Cdt1 redevient actif (Zielke et al, 2008). Ce dernier peut se lier aux complexes ORC1-6 et ainsi recruter un complexe MCM2-7_i pour une nouvelle initiation.

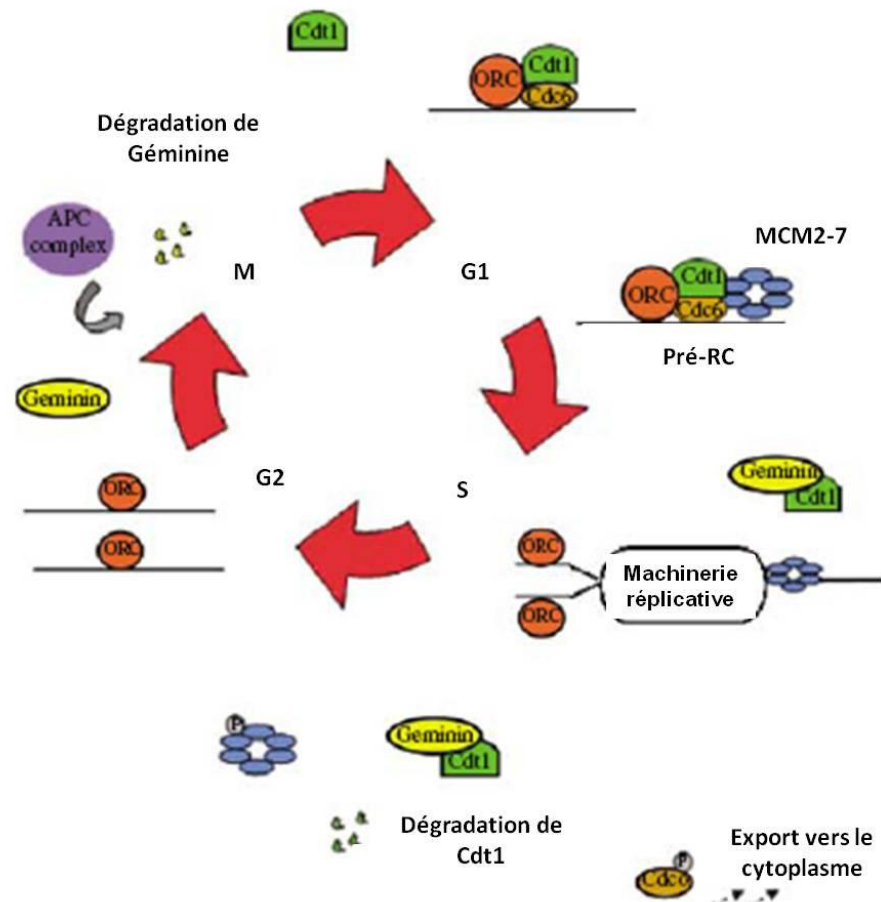


Figure 5 : Régulation de Cdt1 médiée partiellement par la géminine.

Géminine inhibe l'activité de Cdt1 au cours de la phase S.

Adapté d'après (Montanari et al, 2006).

ii. Activation des origines

Après avoir rendu l'origine de réplication compétente, son activation repose principalement sur la conversion du complexe pré-répliatif (pré-RC) en un complexe de pré-initiation (pré-IC), sous le contrôle des CDK et de la DDK [Figure 6 ; (Zegerman & Diffley, 2010)]. Chez la levure *S.cerevisiae*, Sld2 et Sld3 sont des substrats essentielles des CDKs et sont toutes deux nécessaires à l'initiation de la réplication (Tanaka et al, 2007 ; Zegerman & Diffley, 2007). Les orthologues humains de ces 2 protéines sont RTS/RecQL4 et Treslin/ticrr (Boos et al, 2011 ; Tanaka et al, 2007).

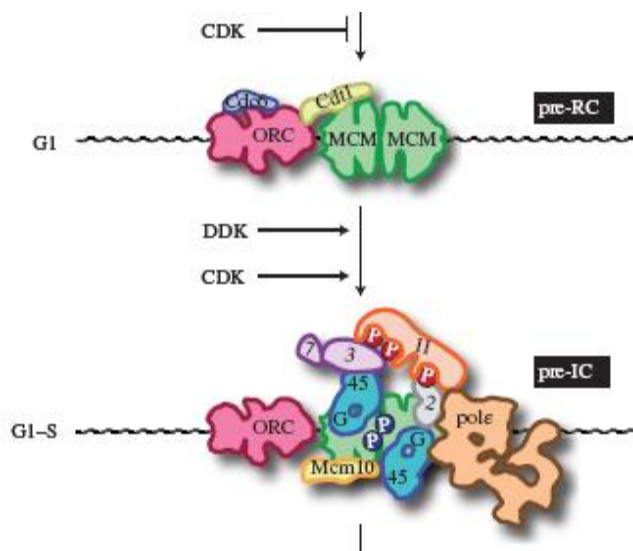


Figure 6 : Conversion du complexe pré-RC en un complexe pré-IC.

La conversion est régulée par les DDK et CDK.

D'après (Diffley, 2011).

A la transition G1/S, l'activité des CDK et DDK augmentent. Une fois activée, la kinase DDK, formée de Cdc7 (Cell division cycle 7) et de sa sous-unité régulatrice Dbf4 (Dumbbell former 4), phosphoryle les protéines MCM2, MCM4 et MCM6 (Francis et al, 2009 ; Sclafani et al, 2002 ; Tsuji et al, 2006). Bien que le rôle exact de ces phosphorylations ne soit pas connu, elles pourraient changer la conformation du complexe MCM2-7, facilitant ainsi le recrutement de facteurs additionnels tels que Sld3 et Cdc45 aux origines. La formation d'un complexe protéique ayant l'activité hélicase dépend également du chargement du complexe GINS [acronyme japonais de Go,-Ichi,-Ni,-San: Sld5, Psf1, Psf2, Psf3 ; (Gambus et al, 2006 ; Marinsek et al, 2006 ; Pacek et al, 2006)]. Ce complexe multi-protéique composé de Cdc45-MCM2-7_i-GINS (complexe CMG) est considéré comme l'hélicase réplivative active (Remus & Diffley, 2009). Dans les cellules eucaryotes, le recrutement de Cdc45 au sein du complexe CMG permet le recrutement subséquent de l'ADN polymérase alpha (polymérase α), de la protéine de réplication A (RPA) et du facteur de processivité (PCNA) à la chromatine (Kukimoto et al, 1999 ; Mimura & Takisawa, 1998 ; Uchiyama et al, 2001 ; Zou & Stillman, 2000). MCM10 est un autre acteur majeur de la réplication de l'ADN génomique. En effet, l'inactivation ou l'absence d'expression de cette protéine bloque l'ouverture de la double hélice d'ADN et donc l'initiation de la réplication (Im et al, 2009 ; Kanke et al, 2012 ; van Deursen et al, 2012 ; Watase et al, 2012). Contrairement à la situation dans les cellules humaines et chez le Xénope (Im et al, 2009 ; Zhu et al, 2007), MCM10 n'est pas requise, chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, pour la formation du complexe CMG mais pour le recrutement de RPA et de la polymérase α à la chromatine (Kanke et al, 2012 ; van Deursen et al, 2012 ; Watase et al, 2012). En 2011, S.P. Bell et ses collaborateurs ont proposé un modèle qui tient compte de l'ancrage séquentiel des différents acteurs aux origines de réplication ainsi que de l'activité des S-CDK et DDK pour expliquer l'initiation de la réplication [Figure 7 ; (Heller et al, 2011)]. La formation d'un complexe de pré-initiation (pré-IC) conduit rapidement au démarrage de l'initiation de la réplication ou «firing» par ouverture et déroulement de la double hélice d'ADN sous l'action de l'hélicase CMG (Figure 7). Après ouverture de la double hélice, il se crée un assemblage multi-protéique appelé réplisome pour démarrer la synthèse d'ADN. Cette synthèse se fait par l'action concertée de protéines distinctes qui seront décrites dans la suite de ce chapitre.

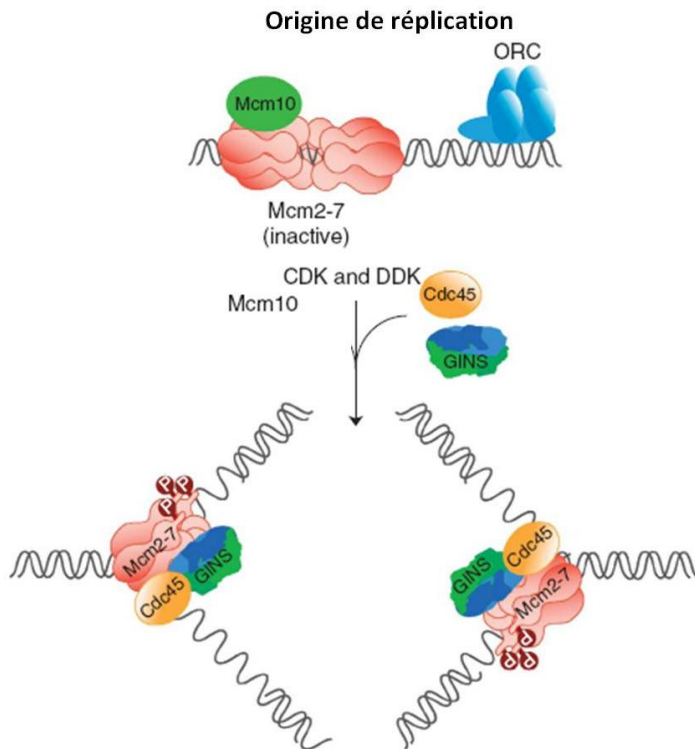


Figure 7 : Activation des origines sous le contrôle des DDK et S-CDK.

L'interaction de cdc45 et GINS avec MCM2-7 conduit à l'ouverture de la double hélice d'ADN.

Adapté d'après (van Deursen et al, 2012).

Sachant que les deux brins d'ADN ont une configuration antiparallèle et que la synthèse par les ADN polymérase s'effectue dans le sens 5'-3' du brin néo-synthétisé, l'un des brins est donc synthétisé de manière continue (3'-5' : leading strand) et l'autre de manière discontinue (5'-3' : lagging strand) en générant des fragments d'Okazaki d'environ 200 paires de bases (Touaille & Hubscher, 2004). La synthèse du brin discontinu et de chaque fragment est initiée par une amorce d'une dizaine de ribonucléotides, synthétisée par l'activité primase de pol α d'où la formation d'une amorce hybride ARN/ADN. On estime à 4.10^4 , le nombre d'origines initiées sur le brin continu, et à 2.10^7 le nombre d'initiations sur le brin retardé (discontinu) dans les cellules de mammifères (Hubscher et al, 2002). En plus de son activité primase, l'ADN polymérase α possède une sous-unité catalytique qui permet d'allonger la synthèse de 20 à 30 désoxyribonucléotides additionnels (Muzi-Falconi et al, 2003). Cependant, le recrutement de pol α n'est possible qu'après stabilisation de l'ADN simple brin par RPA (Walter & Newport, 2000). Après synthèse de l'amorce ARN/ADN, le facteur de réplication RFC (Replication Factor C) charge le facteur de processivité PCNA sur l'ADN en provoquant le déplacement de la primase (Maga et al, 2000). Etant donné la faible processivité et fidélité de la pol α , l'étape suivante est le remplacement de la polymérase α par une polymérase réplivative delta (pol δ) afin de poursuivre la synthèse d'ADN.

2. Elongation

Comme cité précédemment, les polymérase répliquatives (δ ou ϵ) sont des acteurs essentiels de la phase d'élongation de la réplication de l'ADN. Effectivement, l'ADN polymérase ϵ assure la réplication du brin continu et l'ADN polymérase δ celle du brin discontinu [Figure 8 ; (Bermudez et al, 2011 ; Nick McElhinny et al, 2008 ; Pursell et al, 2007)]. De plus, la processivité de ces polymérase répliquatives est assurée par PCNA en assurant une association forte avec l'ADN (Maga & Hubscher, 2003). En effet, après l'ancrage de PCNA sur l'amorce par RFC, ce dernier se dissocie, permettant à PCNA de fonctionner avec les ADN polymérase répliquatives.

De multiples autres facteurs interviennent lors de la progression des fourches de réplication afin de garantir la bonne progression de la phase S. En particulier, l'élongation nécessite le débobinage constant de l'ADN. Le complexe CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS) et l'hélicase MCM8 en interaction avec RPA participeraient au déroulement de la double hélice au cours de l'élongation (Maiorano et al, 2005 ; Moyer et al, 2006).

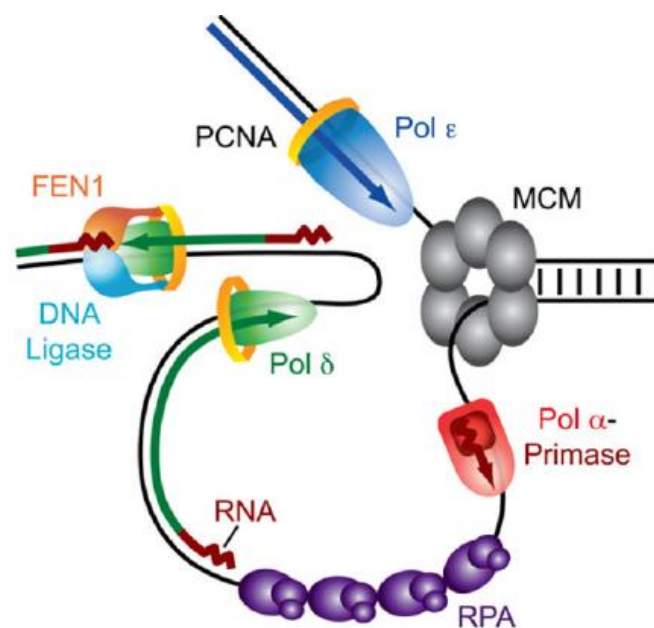


Figure 8 : Modélisation d'une fourche de réplication eucaryote.

Les ADN polymérase ϵ et δ assurent respectivement la synthèse des brins continu et retardé, conjointement avec MCM, PCNA et RPA. Toutefois d'autres protéines, non représentées participent à ce mécanisme. FEN1 et l'ADN ligase I contribuent à la maturation des fragments d'Okazaki.

D'après (Nick McElhinny et al, 2008).

Contrairement à l'élongation du brin continu, la synthèse du brin discontinu se finalise par la maturation des fragments d'Okazaki grâce à l'endonucléase FEN1 (Flap EndoNucléase 1) et à l'ADN ligase I (Zheng & Shen, 2011). Cette maturation peut s'effectuer par deux voies différentes. L'ADN polymérase δ progresse sur le brin discontinu pour combler les brèches créées entre les fragments d'Okazaki jusqu'à rencontrer une amorce ARN. A partir de ce moment-ci, deux scénarios sont envisageables. Dans le premier cas, l'ADN polymérase δ déplace uniquement l'amorce ARN, générant ainsi une extrémité flottante d'environ 10 nucléotides (non recouverte par RPA) qui sera clivée par FEN1 ; il en résulte une interruption au niveau des phosphates entre deux nucléotides adjacents qui seront reliés par l'ADN ligase I.

Dans le deuxième cas, la région déplacée par l'ADN polymérase δ est d'environ 30-35 nucléotides, ce qui est suffisant pour être recouvert par RPA et ce qui inhibe alors l'activité de FEN1 (Bae et al, 2001). Cette longue extrémité est néanmoins substrat de l'endonucléase DNA2 qui, en coupant, laisse quelques nucléotides qui seront clivés ultérieurement par FEN1. Ensuite, l'ADN ligase I relie les fragments entre eux afin de rétablir la continuité de la molécule d'ADN (Balakrishnan & Bambara, 2011 ; MacNeill, 2001). L'hélicase Pif1 favoriserait le deuxième scénario en accélérant la formation de l'extrémité flottante longue qui permet alors la fixation de RPA avant la coupure par FEN1 (Rossi et al, 2008). Cette voie de maturation des fragments d'Okazaki dépendante de PIF1-RPA-DNA 2-FEN1 permettrait d'éliminer les 20 à 30 désoxyribonucléotides incorporés par la pol α , qui ne possède pas d'activité de « relecture-correction » (activité « proof-reading »), ce qui limiterait la mutagenèse spontanée sur le brin discontinu (MacNeill, 2001).

3. Terminaison

La terminaison de la réplication a lieu lorsque deux fourches convergentes issues de deux origines actives se rencontrent. L'ADN ligase I catalyse la formation de la liaison phosphodiester entre les deux brins d'ADN néo-synthétisés. Les contraintes topologiques engendrées par la réplication sont annulées par l'action de l'ADN topoisomérase I tout au long de la réplication et les molécules d'ADN filles sont finalement déconcaténées par la topoisomérase II [Figure 9 ; (Jones & Petermann, 2012)].

Les connaissances concernant l'étape de terminaison chez les eucaryotes sont relativement limitées. Contrairement aux procaryotes, aucune séquence spécifique d'ADN ne semble requise pour l'étape de terminaison (Santamaria et al, 2000). Cependant, il existe au niveau de certaines séquences génétiques des sites spécifiques où les fourches de réplication se pausent et où la terminaison de la réplication est induite. C'est le cas, par exemple, des régions du rDNA ou de la séquence *RTS1* chez *S. pombe* (Eydmann et al, 2008). A l'intérieur de ces régions, des barrières de fourches spécialisées (RFBs) contrôlent la terminaison de façon polaire c'est-à-dire que seulement une des deux fourches convergentes est arrêtée (Lambert et al, 2005). Un des problèmes posés par l'existence de telles séquences est que ce sont des « points chauds » de cassures de l'ADN et de remaniements chromosomiques (Kobayashi, 2006 ; Lambert et al, 2005). Récemment, M. Foiani et ses collaborateurs ont identifié chez la levure *S. cerevisiae* 71 régions chromosomiques qui sont des sites de terminaison [sites TERs ; (Fachinetti et al, 2010)]. Tous ces sites TERs contiennent un élément génétique de pause de fourches, et les protéines Rrm3 (ADN hélicase) et Top2 (ADN topoisomérase) coordonneraient la progression et la fusion des fourches de réplication de façon à prévenir la formation de cassures et les réarrangements chromosomiques au niveau des sites TERs (Fachinetti et al, 2010).

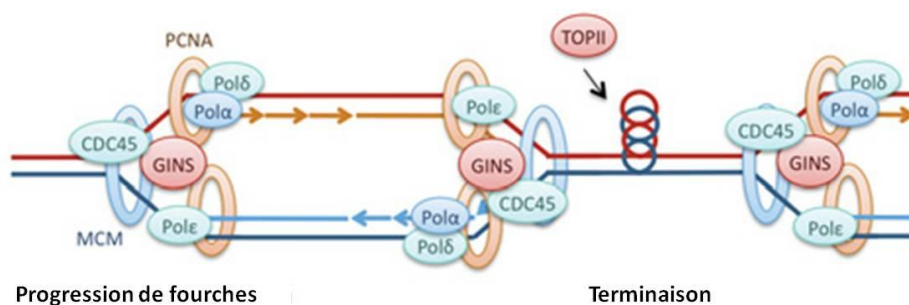


Figure 9 : Terminaison de la réplication.

Adapté d'après (Jones & Petermann, 2012).

L'ensemble du mécanisme de réplication de l'ADN est illustré sur la figure ci-dessous et témoigne de l'implication de nombreux acteurs, précédemment décrits, dans ce processus (Figure 10).

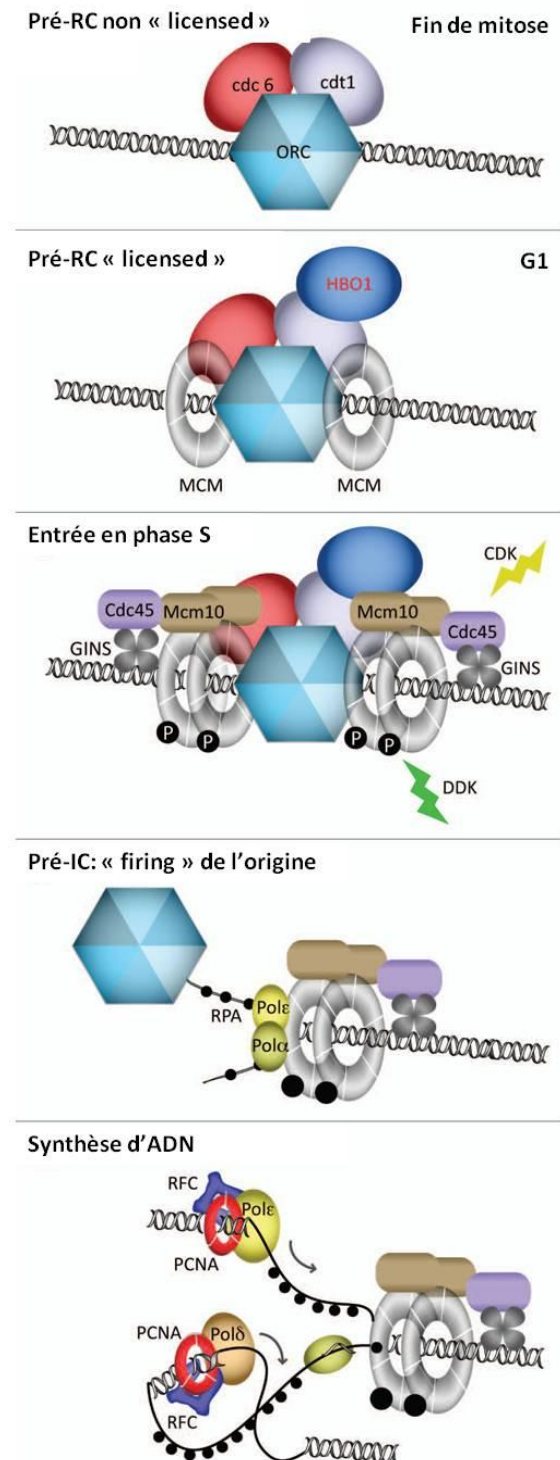


Figure 10 : Mécanisme moléculaire de la réplication de l'ADN chez les mammifères.

Adapté d'après (Casas-Delucchi & Cardoso, 2011).

Chez les eucaryotes, tous les sites d'initiation ou origines de réplication compétentes ne sont pas utilisés à chaque cycle cellulaire (Cayrou et al, 2011 ; DePamphilis, 1993). Seulement 1/5 à 1/4 des origines compétentes sont activées (30 000 à 50 000 origines), alors que les autres sont « dormantes » (Blow et al, 2011 ; Cayrou et al, 2011). A chaque nouveau cycle, les origines sont sélectionnées durant une période de la phase G1, communément appelée le point de décision des origines (Gilbert et al, 1995 ; Wu & Gilbert, 1996). Parmi les origines actives, 80 % d'entre elles seront actives durant le prochain cycle, suggérant qu'il existe une mémoire de sélection des origines (Li et al, 2003). Néanmoins, cette mémoire semble se limiter aux foyers de réplication, et non pas à une unique origine (Jackson & Pombo, 1998 ; Takebayashi et al, 2001). En effet, les origines sont organisées en réplicon. Un réplicon est un groupe de plusieurs origines adjacentes et flexibles potentiellement actives (Cayrou et al, 2011). En utilisant le modèle du « Réplicon Flexible » [Figure 12 ; (Cayrou et al, 2011)], c'est-à-dire qu'une seule et unique origine au sein de ce réplicon est activée par cellule et par cycle cellulaire alors que les autres origines sont « dormantes (ou latentes) » ; Cayrou et al. ont montré que les réplicons, dans les cellules de souris, qui ont une taille moyenne de 56 kb, contiennent 4,3 origines et que la distance inter-origines est d'environ 117 kb (Cayrou et al, 2011). La flexibilité dans l'utilisation des origines n'est donc pas stochastique au niveau du génome entier mais seulement au sein de chaque réplicon, d'où cette notion de « mémoire de sélection des origines » précédemment mentionnée.

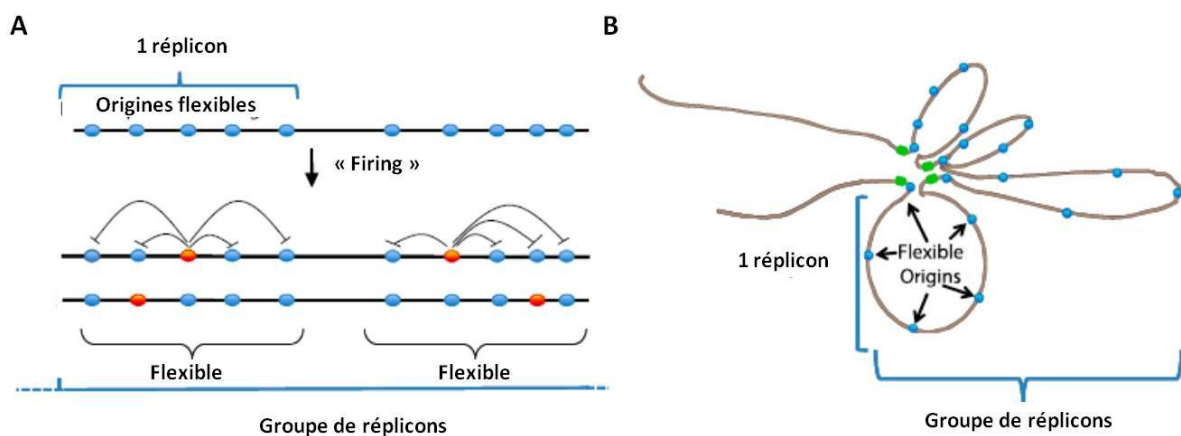


Figure 12 : Modèle du « réplicon flexible ».

A. Un réplicon est une unité fonctionnelle contenant plusieurs origines de réplication compétentes et flexibles. L'activation d'une origine au sein d'un réplicon inactive les origines avoisinantes contenues dans la même unité.

B. Représentation d'un groupe de réplicons en forme de boucles chromatiniques, où un réplicon se compose de plusieurs origines flexibles.

Adapté d'après (Cayrou et al, 2011).

D'autre part, 3 classes d'origines (flexible, dormante et constitutive) peuvent être établies en fonction des conditions de leurs utilisations (Mechali, 2010). La minorité des origines sont constitutives et utilisées continuellement alors que la plupart, comme nous venons de le voir, sont des origines flexibles. En revanche, les origines dormantes sont mises à contribution seulement en conditions de stress. Le fait que les complexes pré-RC soient surnuméraires dû à l'excès de protéines MCM et ORC, permet d'y avoir recours en cas de stress répliatif (Gilbert, 2007).

Par ailleurs, les origines sont activées selon un profil temporel différent (origines précoces, intermédiaires et tardives) au cours de la phase S (Gilbert, 2007 ; Jackson & Pombo, 1998). L'activation séquentielle de ces origines se fait selon des programmes prédéterminés et propres à chaque type cellulaire (Diffley, 2010). De même, la réplication des télomères est soumise à une régulation spécifique des chromosomes, plutôt qu'à un programme universel au sein du même type cellulaire (Drosopoulos et al, 2012).

L'activation coordonnée des origines prend place dans des structures nucléaires spécifiques appelées foyers de réplication. Ces derniers sont organisés en un ou plusieurs groupes de boucles chromatinienne (ou domaines de réplication ; Figure 13). Dans le noyau, le profil spatial de réplication évolue au cours de la phase S. Il est connu depuis longtemps que les régions hautement transcrites (euchromatine) sont dupliquées en début de phase S, alors que l'hétérochromatine, région plus condensée et peu transcrite, réplique tardivement en phase S (Drouin et al, 1990). Cette observation démontre clairement l'existence d'un lien entre la position nucléaire et le moment de réplication des différents domaines chromatiniens (Jackson & Pombo, 1998). Les foyers de réplication précoces sont situés au centre du noyau, alors que les foyers de réplication tardifs sont localisés à la périphérie nucléaire qui est riche en hétérochromatine [Figure 13.B ; (Berezney et al, 2000)].

De même, l'acétylation des histones, qui est associée à une accessibilité élevée de la chromatine, corrèle avec l'activation des origines (Aggarwal & Calvi, 2004). De plus, HBO1 (Histone acétyltransférase liée à ORC1), promeut l'activation des origines *via* l'acétylation de l'histone H4 (Iizuka et al, 2006). Des expériences ont montré que le complexe ORC est principalement situé dans des régions dépourvues de nucléosomes (Lubelsky et al, 2011 ; MacAlpine et al, 2010).

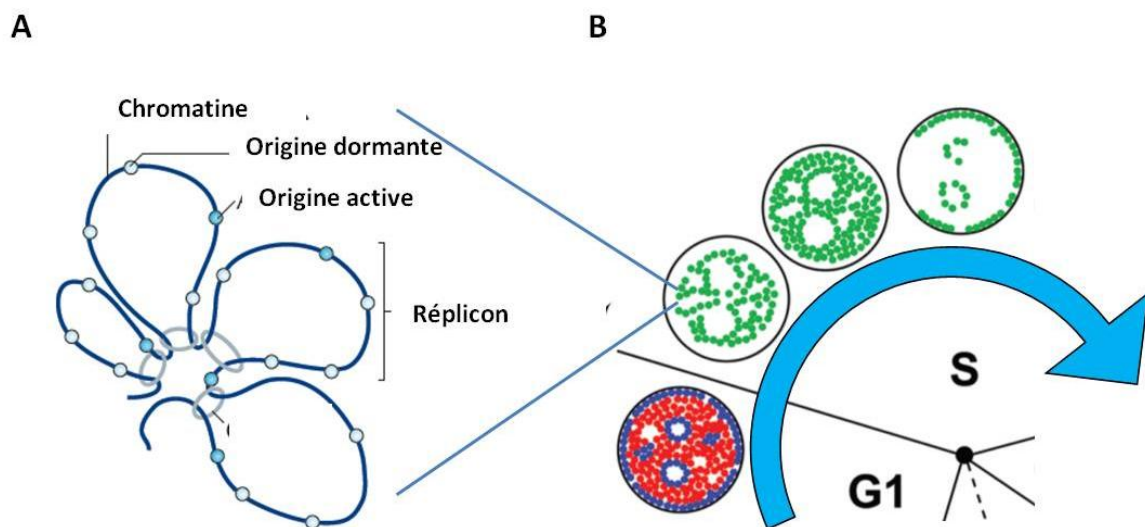


Figure 13 : Programme spatio-temporel de réplication.

A. Foyer de réplication composé d'un ensemble de boucles chromatiniennes

Adapté d'après (Alabert & Groth, 2012).

B. Organisation nucléaire des foyers de réplication au cours de la phase S : euchromatine en rouge, hétéro-chromatine en bleu et foyer de réplication en vert.

Adapté d'après (Gillespie & Blow, 2010).

B. dNTPs, les précurseurs essentiels à la réplication

Durant la réplication, la synthèse d'ADN correspond à l'incorporation de désoxynucléotides par les ADN polymérase. Un des facteurs limitant de ce mécanisme est donc la disponibilité des nucléotides *via* leur biosynthèse par la ribonucléotide réductase (RNR).

1. La ribonucléotide réductase et la synthèse des dNTPs

La ribonucléotide réductase ou ribonucléotide diphosphate réductase (RNR ou rNDP réductase) est un acteur majeur dans la synthèse des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) puriques et pyrimidiques. Précisément, cette enzyme-clé catalyse la formation *de novo* des désoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides (Eklund et al, 2001). Cette réaction enzymatique est très conservée entre les espèces (Torrents et al, 2002). La ribonucléotide réductase est spécifique des ribonucléotides diphosphates. En effet, ses substrats sont ADP, CDP, GDP et UDP. Alors que le dTDP est synthétisé par une autre enzyme, la thymidylate kinase, à partir de dTMP. Cette enzyme fournit les dNTPs indispensables non seulement pour la réplication de l'ADN nucléaire et mitochondriale, mais également au cours de la réparation de l'ADN. La réaction enzymatique médiée par la RNR correspond à une étape limitante pour la synthèse d'ADN. L'activité de la RNR doit donc être finement régulée pour maintenir un réservoir équilibré de dNTPs.

Dans les cellules eucaryotes, la RNR est un tétramère composé de deux larges sous-unités et deux petites sous-unités. Chez l'homme, la grande sous-unité R1 est codée par le gène *RRM1*, alors qu'il existe deux petites sous-unités R2 (R2 et p53R2) codées par les gènes *RRM2* et *RRM2B* [Figure 14 ; (Kolberg et al, 2004)]. Chez la levure *S. cerevisiae*, il existe 4 sous-unités : R1, R2, R3 et R4 (Niida et al, 2010). Chez les eucaryotes, cette enzyme est seulement active si un complexe se forme à partir de ses deux sous-unités : 2x (R1/R2) dans les cellules humaines, et [(R1/R2) + (R1/R4)] dans la levure. La sous-unité R3 pourrait avoir un rôle au cours de la réparation de l'ADN (Niida et al, 2010).

L'activité de la RNR dans son ensemble est contrôlée par des mécanismes allostériques (liaison de dNTPs et NTPs à la grande sous-unité), au niveau transcriptionnel, par des modifications post-traductionnelles, par sa localisation subcellulaire, par son état redox (Niida et al, 2010). Le contrôle par le cycle cellulaire de la transcription des gènes *RRM1*, *RRM2* et *RRM2B* amène à des niveaux optimaux durant la phase S (Bjorklund et al, 1990). L'expression de R2 fluctue de manière cyclique avec un contrôle qui s'exerce à la fois sur sa synthèse et sa

dégradation alors que le niveau de R1 est constant au cours du cycle cellulaire (Chabes et al, 2004 ; Chabes et al, 2003b ; D'Angiolella et al, 2012). Le gène RRM2 est activé en début de phase S, mais R2 est dégradée par protéolyse *via* l'APC durant la mitose (Chabes et al, 2004 ; Chabes et al, 2003b) ; l'activité de la RNR dépend donc du niveau d'expression de la R2. De ce fait, dans les cellules humaines en division, la forme prédominante de la RNR est composée des sous-unités R1 et R2, alors que dans les cellules quiescentes ou en mitose, qui n'expriment donc pas R2, la forme prédominante est composée de R1 et p53R2. Par ailleurs, la sous-unité p53R2, avec R1, assurerait la réplication de l'ADN mitochondriale (Pontarin et al, 2008). Une autre conséquence de la régulation au niveau transcriptionnel et post-traductionnel au cours du cycle cellulaire est que le pool de dNTPs au cours de la phase S est environ 20 fois plus important que celui mesuré en phase G1 (Niida et al, 2010).

Les études menées chez la levure *S. cerevisiae* ont montré que la sous-unité R1 localise dans le cytoplasme et les sous-unités R2/R4 dans le noyau. En absence de stress, les sous-unités R2/R4 relocalisent dans le cytoplasme uniquement en phase S, où en s'associant avec la sous-unité R1, elles forment une RNR active. En réponse à des dommages à l'ADN ou à un stress réplicatif, outre une augmentation de l'expression de ces protéines, les sous-unités R2/R4 relocalisent également dans le cytoplasme, ce qui se traduit par une élévation importante du pool de dNTPs intracellulaires (Niida et al, 2010). Chez les mammifères, la situation est différente puisque les sous-unités R1 et R2 semblent localiser exclusivement dans le cytoplasme (Pontarin et al, 2008) et qu'il n'y a pas d'augmentation du pool de dNTPs en réponse à des dommages à l'ADN dans des cellules cyclantes (Hakansson et al, 2006). Néanmoins, des données récentes montrent que, suite à des dommages à l'ADN, la sous-unité R2 n'est plus dégradée par le système ubiquitine-protéasome (D'Angiolella et al, 2012) et que l'histone acétyl transférase Tip60 permet le recrutement de la RNR aux sites des dommages (Niida et al, 2010). Ainsi, deux mécanismes différents existent pour pourvoir les cellules en quantité suffisante en dNTPs, et ainsi assurer la réparation de l'ADN : chez la levure *S. cerevisiae*, un niveau important de dNTPs est synthétisé alors que dans les cellules de mammifères, la RNR relocalise précisément aux sites de réparation (Figure14).

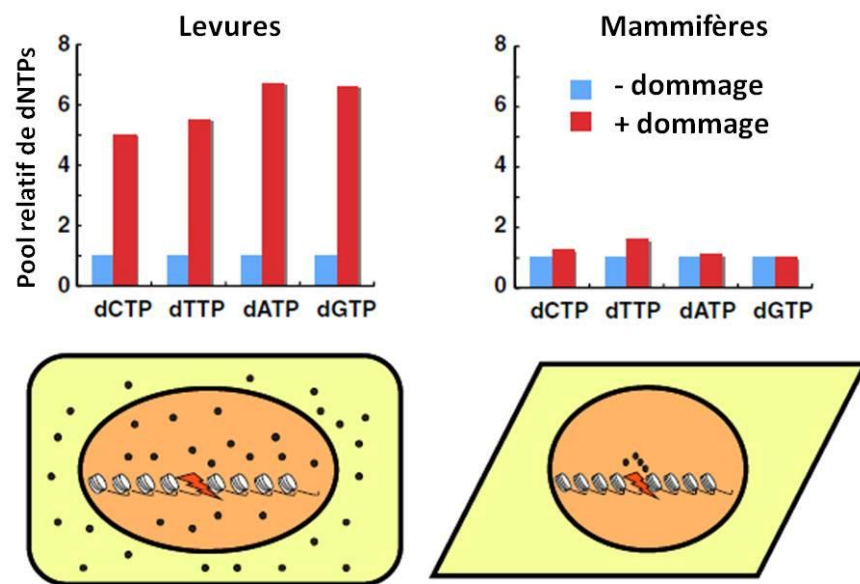


Figure 14 : Régulation du pool de dNTPs après dommages à l'ADN.

Après dommages à l'ADN, le pool de dNTPs reste inchangé chez les mammifères, mais celui des levures est drastiquement augmenté. Contrairement aux levures, les dNTPs se concentrent sur le lieu du dommage chez les mammifères

Adapté d'après (Niida et al, 2010).

Lorsqu'un substrat (NDP) est lié au site actif de la sous-unité R1, un radical tyrosyl stable est généré au sein de la sous-unité R2 *via* un site ferrique (Tableau 2). Ce radical est ensuite transféré au site catalytique de R1 *via* un transfert d'électrons couplés à des protons. Ainsi, le NDP est réduit en dNDP par élimination d'un atome d'hydrogène au niveau du carbone C2' du ribose (Stubbe et al, 2003). La réaction implique divers cofacteurs tels que de l'ATP, du magnésium, la thiorédoxine (protéine transporteuse d'hydrogène) et du NADPH. Dans un second temps, le dNDP est converti en dNTP par l'action de la nucléotide diphosphate kinase (NDP kinase) [Figure 15 ; (Mathews, 2006)].

Nom	Description	Taille de la protéine	Substrats endogènes	Localisation cellulaire
R1	Grande sous-unité	94 kDa / 792 aa	NDP	Cytosolique
R2	Petite sous-unité	44 kDa / 389 aa	NDP	Cytosolique
p53R2	Petite sous-unité induite par p53	40 kDa / 351 aa	NDP	Cytosolique

Tableau 2 : Les sous-unités de la ribonucléotide réductase.

Les trois sous-unités de la RNR sont localisées dans le cytosol et utilisent des substrats endogènes communs, les NDPs.

Adapté à partir de (Jordheim et al, 2005).

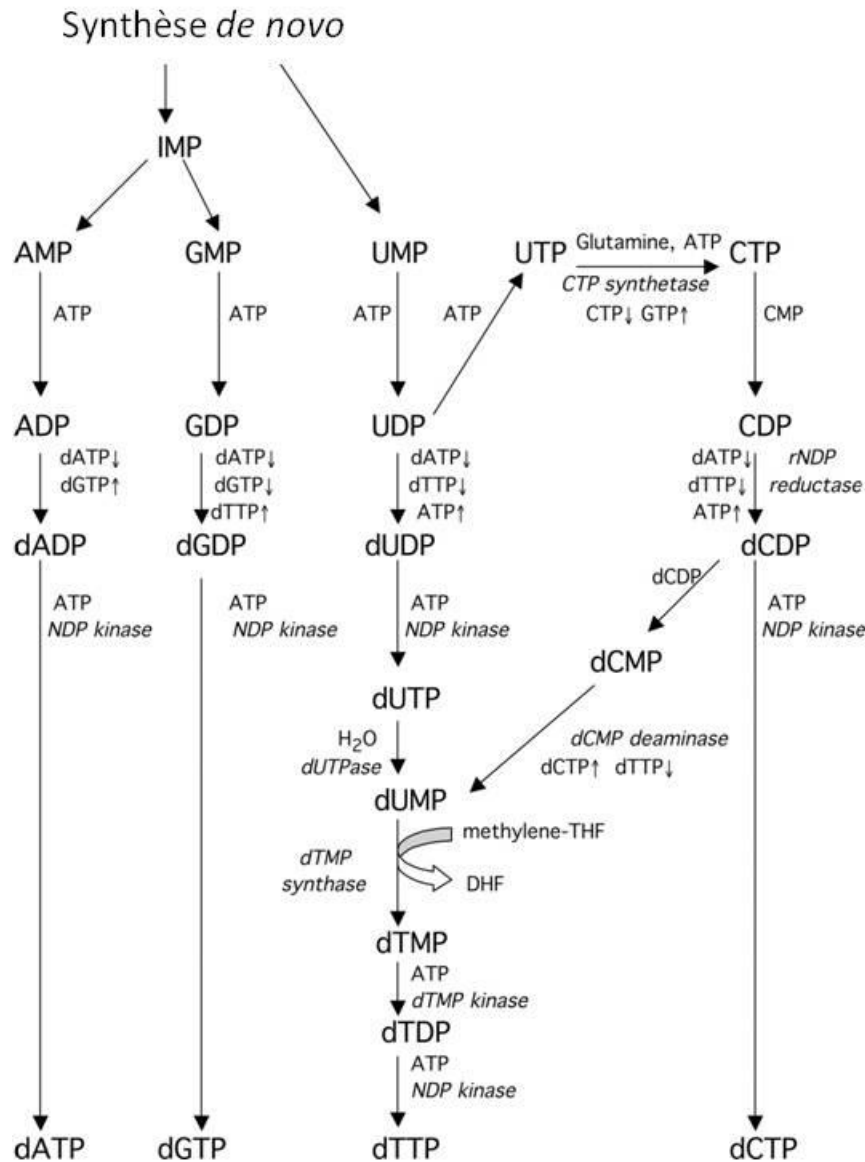


Figure 15 : Voies de synthèse *de novo* des dNTPs.

La RNR convertit les NDPs en dNDPs ; ces derniers sont transformés en dNTPs par la NDP kinase.

A l'exception que le dTDP provient du dTMP *via* l'action de la dTMP kinase.

Adapté d'après (Mathews, 2006).

Etant donné que des niveaux anormaux en dNTPs peuvent conduire à la mort cellulaire ou à de la mutagenèse, la RNR représente une importante cible thérapeutique pour de nombreuses maladies humaines (Cerqueira et al, 2007 ; Gon & Beckwith, 2006 ; Gon et al, 2011 ; Shao et al, 2006).

2. Synthèse de l'ADN *via* l'ADN polymérase

Au cours de la réplication de l'ADN génomique ou mitochondriale, l'ADN polymérase lie un désoxyribonucléoside monophosphate à la terminaison 3'-OH du brin d'ADN naissant, en utilisant des dNTPs comme substrats. Premièrement, il se forme des liaisons hydrogènes entre le dNTP recruté et un résidu du brin parental. Secondairement, le groupement hydroxyle 3' de la chaîne d'ADN en formation réalise une attaque nucléophile sur le groupement α -phosphoryl du dNTP qui va s'incorporer pour former une liaison phosphodiester en libérant un pyrophosphate (PP_i). Ensuite, l'ADN polymérase se déplace jusqu'au groupement hydroxyle du dNTP incorporé, et poursuit ainsi l'élongation du brin complémentaire, allant de plusieurs dizaines à plusieurs millions d'unités nucléotidiques. [Figure 16 ; (Steitz, 1999)].

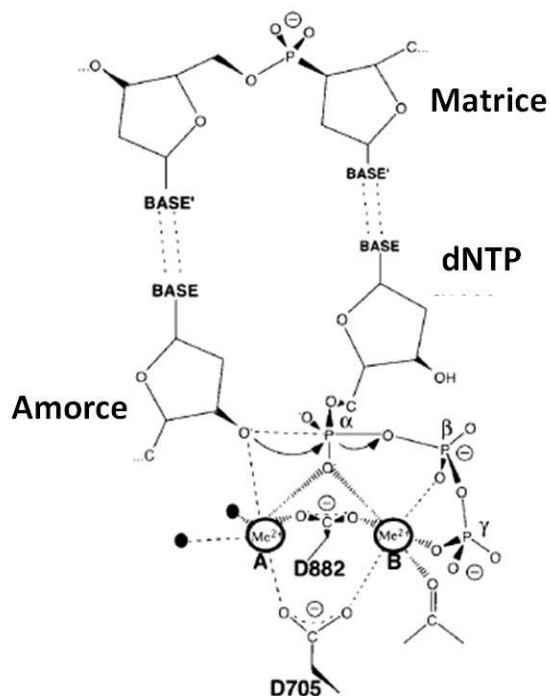


Figure 16 : Incorporation de dNTPs dans l'ADN.

Mise en place de liaisons hydrogènes entre une base de la matrice et le nouveau dNTP incorporé, et formation d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides successifs.

Adapté d'après (Steitz, 1999).

De plus, l'incorporation de bases oxydées telles que la 8-hydroxydGTP (8-oxodGTP) et 2-hydroxydATP (2-OH-dATP), produites en cas de stress oxydatif, peut être mutagène (Kamiya, 2004 ; Katafuchi & Nohmi, 2010). Néanmoins, une surexpression de p53R2 réduit la quantité intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène [ROS ; (Liu et al, 2008)]. Cela suggère que la mutagenèse induite par les bases oxydées pourrait être partiellement abolie lorsque le niveau d'expression de p53R2 est élevé. De plus, il est clairement établi que le premier système de défense dirigé contre les dNTPs modifiés est joué par les enzymes qui nettoient le pool de

dNTPs, en d'autres termes par les enzymes qui assurent un pool sain de nucléotides en hydrolysant le dNTP oxydé en nucléoside monophosphate correspondant (Fotouhi et al, 2011 ; Kamiya, 2010).

3. Pool de dNTPs et instabilité génomique

Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer le pool de dNTPs intracellulaires dans les cellules. Il s'agit d'un essai enzymatique basé sur de la radioactivité, initialement mis au point par Sherman et Fyfe (Sherman & Fyfe, 1989) et depuis amélioré (Ferraro et al, 2010) ou d'un dosage par HPLC, qui est aujourd'hui la méthode de choix (Chabes et al, 2003a ; Cohen et al, 2009 ; Ferraro et al, 2010 ; Gon et al, 2011 ; Pursell et al, 2008). Les quantités respectives de chacun des 4 dNTPs varient en fonction du type cellulaire et de la méthode d'analyse. Par exemple, Ferraro et al. ont mesuré, par HPLC, 45 pmoles de dATP, 18 pmoles de dGTP, 103 pmoles de TTP et 44 pmoles de dCTP par million de cellules à partir de fibroblastes humains normaux (Ferraro et al, 2010). Une autre étude par HPLC effectuée par Cohen et al., à partir de cellules leucémiques de souris L1210, a montré que les niveaux de dATP, dCTP, dGTP et TTP variaient d'une préparation à l'autre. Ainsi, la concentration en dATP varie de 2,8 à 9,9 pmoles, celle de dGTP de 1,3 à 5,3 pmoles, celle de TTP de 3 à 16 pmoles, et celle de dCTP de 2,2 à 8,8 pmoles par million de cellules (Cohen et al, 2009). Néanmoins, et de façon reproductible, le TTP reste le désoxyribonucléoside triphosphate le plus abondant dans les cellules eucaryotes (Chabes et al, 2003a ; Cohen et al, 2009 ; Ferraro et al, 2010).

Les concentrations individuelles et totales en dNTPs sont étroitement régulées afin de minimiser le taux de mutations et d'assurer ainsi une réplication fidèle. Un nombre croissant de publications montre clairement qu'une perturbation dans le pool de dNTPs impacte sur la stabilité du génome. La délétion de gènes qui contrôlent la stabilité du génome induit une augmentation de l'activité de la RNR, une augmentation du pool de dNTPs et conduit à un phénotype mutateur (Davidson et al, 2012 ; Holmberg et al, 2005 ; Tang et al, 2009). Chez la levure *S. cerevisiae*, le spectre de mutagenèse induite par une dérégulation des dNTPs est étroitement lié à la nature du dNTP qui est dérégulé et à l'amplitude de cette dérégulation (Kumar et al, 2011 ; Kumar et al, 2010). Une augmentation du pool de dNTPs est également observée en réponse à des dommages à l'ADN ce qui se traduit par une augmentation de la mutagenèse, mais contribuerait également à une meilleure survie de la cellule (Chabes et al, 2003a ; Gon et al, 2011).

Dans les cellules, le pool de ribonucléotides (rNTPs) est beaucoup plus important que celui des dNTPs [de 10 à 100 fois ; (Cohen et al, 2009)]. Bien que les ADN polymérase aient une meilleure sélectivité pour les dNTPs que pour les rNTPs, des travaux récents montrent que ces derniers sont incorporés dans l'ADN au cours de la réplication, qu'ils sont éliminés de l'ADN par l'action de RNase H, et qu'une réparation inefficace des ribonucléotides incorporés conduit à un stress répliatif et à une augmentation de l'instabilité génétique (Lazzaro et al, 2012 ; Nick McElhinny et al, 2010).

C. Les causes et les conséquences d'une réplication perturbée

1. Les causes du stress répliatif

Le stress répliatif se définit comme une perturbation du mécanisme de la réplication qui conduit à des fluctuations des paramètres de la réplication tels que la progression des fourches et l'activation des origines. Ce dérèglement peut être provoqué par de multiples facteurs qui sont d'origines exogènes ou endogènes. La machinerie de réplication peut rencontrer une multitude d'obstacles qui se présentent sous la forme de structures d'ADN secondaires, de structures hybrides ADN/ARN, de complexes protéines/ADN ou de lésions de l'ADN.

i. Sources exogènes

De nombreuses sources environnementales peuvent porter atteinte à l'intégrité du génome. Le rayonnement UVC, bien que non relevant en terme de santé publique, est largement utilisé dans les laboratoires car il produit les mêmes lésions toxiques de l'ADN que celles générées par le rayonnement UVB, un des composants du rayonnement UV solaire (constitué de photons UVB et UVA) (voir paragraphe II.A). La formation de ces dommages de bases (essentiellement des dimères de pyrimidines) va altérer la progression de la réplication (Kaufmann, 2010). Par ailleurs, le protéasome des cellules de mammifères dégrade spécifiquement MCM10, une protéine essentielle à l'initiation et l'élongation de la réplication, en réponse aux UVC (Sharma et al, 2010). Cette dégradation est dépendante de l'ubiquitine ligase CRL4-DDB1-VPRBP (Kaur et al, 2012). Sage et ses collaborateurs ont montré que l'exposition des cellules eucaryotes aux radiations UVA induit un retard de phase S qui ne résulte pas de l'effet génotoxique des UVA (Dardalhon et al, 2008 ; Girard et al, 2008).

Il existe d'autres types de rayonnement qui perturbent la réplication, ce sont les radiations ionisantes. Ces rayonnements proviennent de sources naturelles comme les radiations cosmiques et la radioactivité des roches, ou de sources artificielles telles que les rayons X ou les composés radioactifs utilisés en clinique. Ces radiations induisent de nombreux dommages à l'ADN tels que des cassures simple brin ou double brins, ainsi qu'une large variété de dommages oxydatifs. Il a été montré que les rayons X inhibent l'élongation des fourches de réplication, provoquent des blocages de fourches et réduisent l'activation des origines (Parplys et al, 2012).

Les agents chimiques tels que le méthyl méthanesulfonate (méthylation des bases), le peroxyde d'hydrogène (oxydation des bases), topotecan (inhibiteur de topoisomérase I), la mitomycine C (pontages inter-brins) induisent également un stress réplicatif (Parplys et al, 2012). Ce stress peut aussi être engendré par un inhibiteur de l'ADN polymérase α , l'aphidicoline ou des agents qui déplètent le pool en nucléotides en inhibant la RNR [hydroxyurée ; (Levenson & Hamlin, 1993 ; Poli et al, 2012)].

ii.Sources endogènes

L'état rédox (réduction-oxydation) intracellulaire est un paramètre important qui régule le cycle cellulaire (Menon & Goswami, 2007). Cet état redox est une balance délicate entre les niveaux de ROS produits par le métabolisme intracellulaire (mitochondrie, NADPH oxydase, peroxyosomes, métabolisme des acides gras, etc...) et les systèmes antioxydants (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, glutathion, vitamine E, vitamine C, etc...) qui les éliminent. Dès que ce système de protection ne permet plus d'éliminer suffisamment les radicaux libres ; la cellule se retrouve alors en situation de stress oxydant (Klaunig & Kamendulis, 2004) qui peut alors perturber les différentes phases du cycle cellulaire dont la réplication.

Il est possible de lister les facteurs intrinsèques qui favorisent l'induction d'un stress réplicatif (Figure 17). En situation de stress, le pool de dNTPs, déterminant de la progression des fourches et de l'activation des origines (Anglana et al, 2003), est modulé par l'activité de la RNR (Poli et al, 2012). L'expression d'autres acteurs réplicatifs tels que les protéines de l'initiation de la réplication peut également être affectée, menant alors à une variation d'activation des origines. Par exemple, la ré-initiation est sensible à l'inhibition des CDK (Borsuk & Czolowska, 2010). Au contraire, si le complexe MCM2-7 est faiblement chargé sur l'ADN, peu d'origines sont actives (Liang et al, 1999). En particulier, l'activité des origines dormantes, qui est dépendante du chargement de MCM2-7, est essentielle à l'accomplissement d'une réplication complète sous

des conditions de stress (Ge et al, 2007). D'autre part, la phosphorylation de Cdt1 par JNK1 inhibe le recrutement de l'histone acétylase HBO1 et par conséquent, bloque le « licensing » de réplication en réponse au stress (Miotto & Struhl, 2011).

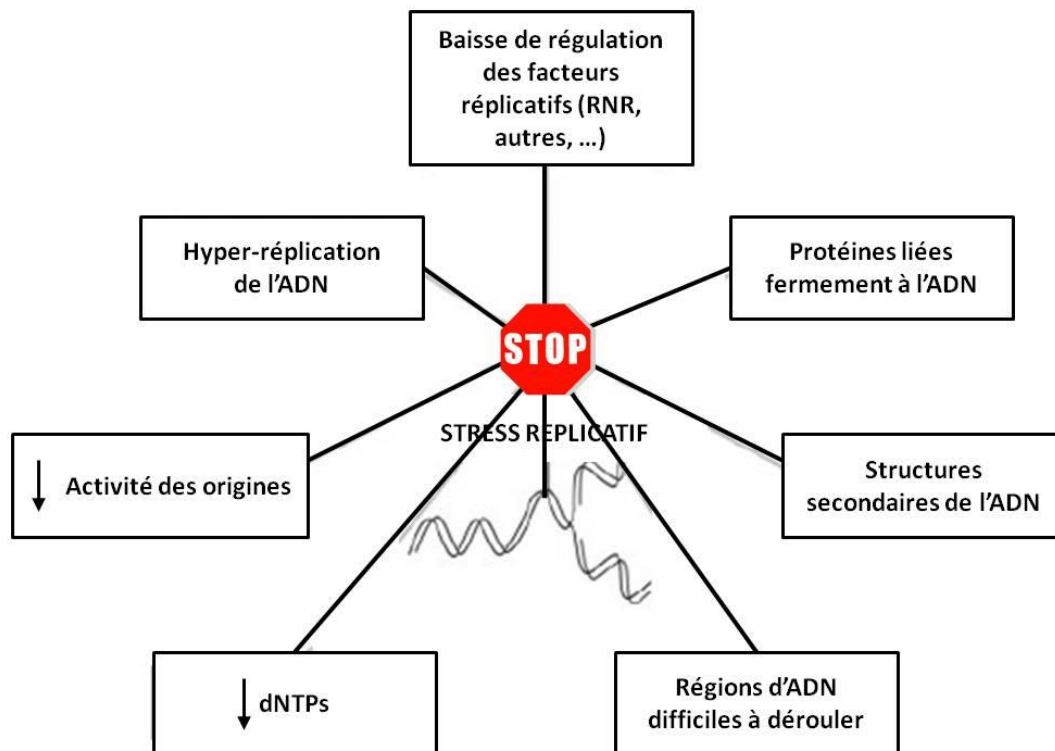


Figure 17 : Facteurs endogènes qui contribuent au stress répliatif.

Adapté d'après (Burhans & Weinberger, 2007).

De plus, toute modification de la structure de l'ADN (structures secondaires) ou de la chromatine (complexe ADN/protéines) crée des obstacles naturels ou barrières de fourches qui sont susceptibles de perturber l'activité de l'hélicase MCM et des ADN polymérases répliatives (ralentissement ou arrêt de la fourche de réplication), entraînant donc un stress répliatif (Hyrien, 2000 ; Lambert & Carr, 2005). La terminaison précoce de la réplication est encouragée par diverses séquences d'ADN telles que les séquences répétées inversées ou les microsatellites qui peuvent former des structures secondaires stables (en épingle à cheveux, triplex et quadruplex), astreintes à un enroulement négatif de la double hélice (Baran et al, 1991). Un des exemples qui reflète bien l'impact d'un complexe ADN/protéine sur l'arrêt de réplication est la dimérisation de la protéine de terminaison Tus avec le site Ter qui engendre une inhibition de l'activité de l'hélicase, chez *Escherichia coli* (Lee et al, 1989).

D'autre part, étant donné que la réplication et la transcription partagent la même matrice, des collisions entre ces deux machineries sont inévitables et interfèrent avec la progression des fourches de réplication. La figure 18 résume les effets potentiels de la transcription sur la progression des fourches. L'ensemble des études établies à partir d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis* démontrent clairement que les deux machineries doivent progresser dans la même direction pour maintenir une réplication normale ; dans le cas contraire, cela engendre un ralentissement des fourches de réplication. Il semblerait que la sévérité des arrêts de fourches (allant d'une simple pause à un effondrement de fourches) est corrélée à l'expression génique. Dans des gènes hautement transcrits (considérés comme essentiels) où réplisome et ARN polymérase (RNAP) se rencontrent face à face, l'instabilité génomique est vraisemblablement plus accrue. Le devenir de la fourche de réplication après collision reste néanmoins incertain. L'existence de modulateurs de l'ARN polymérase et d'hélicases auxiliaires permettraient de réduire, voire résoudre, ces conflits (Pomerantz & O'Donnell, 2010). Dans les cellules eucaryotes, la situation est plus compliquée puisque des blocages de fourches surviennent même lorsque transcription et réplication sont co-directionnelles (Poveda et al, 2010). Il a été montré que les régions hybrides ADN-ARN (R-loops), formées au cours de la transcription, interfèrent avec la progression des fourches de réplication, et sont donc sources d'instabilité génétique. Néanmoins, la formation de ces R-loops est limitée par la topoisomérase I (Tuduri et al, 2009).

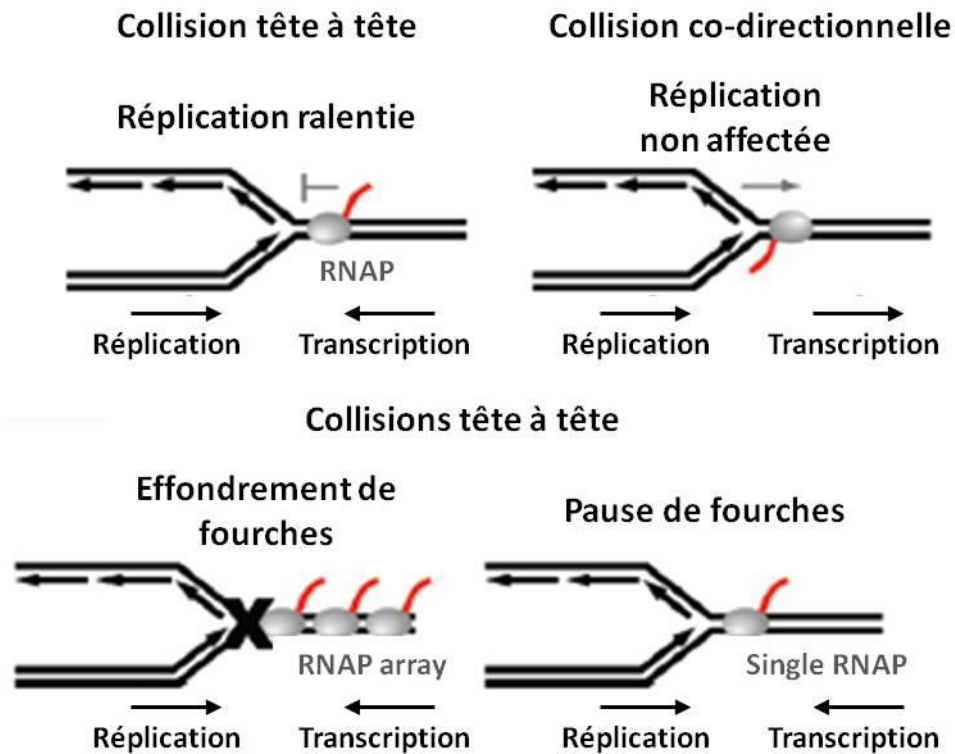


Figure 18 : Effets de la machinerie transcriptionnelle sur la progression des fourches de réplication.

La position des deux machineries transcription et réplication l'une par rapport à l'autre, ainsi que le nombre de RNAP (ARN polymérase) présents influencent la processivité des fourches. Les deux machineries doivent progresser dans la même direction pour maintenir une réplication normale. La rencontre face à face des deux machineries peut induire un retard répliatif, un effondrement ou une pause de fourches.

Adapté d'après (Pomerantz & O'Donnell, 2010).

Pour sauvegarder l'intégrité du génome en garantissant une réplication complète, le stress répliatif généré par ces divers facteurs exogènes ou endogènes est régulé par un point de contrôle intra-S.

2. Activation du point de contrôle intra-S

Le point de contrôle (« checkpoint ») de réplication ou intra-S possède de multiples rôles au cours d'une réplication non perturbée mais également perturbée par divers facteurs exogènes et endogènes (Ben-Yehoyada et al, 2007 ; Kaufmann, 2010 ; Tourriere & Pasero, 2007 ; Willis & Rhind, 2009). Ainsi, ce « checkpoint » est activé par la présence de dommages de l'ADN qui compromettent la réplication de l'ADN. Il en résulte la stabilisation de la fourche bloquée, voir son effondrement, la stimulation des mécanismes de réparation, une inhibition de l'activation des origines tardives (pour prévenir la rencontre entre une nouvelle fourche et un dommage), et possiblement une activation des origines dormantes afin de répliquer les régions du génome au voisinage de la fourche effondrée (Allen et al, 2011). L'ensemble de ces actions a pour finalité la réplication totale du génome avant l'entrée en mitose (Desany et al, 1998). Dans le cas contraire, c'est-à-dire en absence de réparation des fourches bloquées, le non-redémarrage des fourches ou l'effondrement des fourches peuvent engendrer la persistance d'ADN non répliqué, générer des régions d'ADN simple brin et conduire à la formation de cassures simple et double brin(s). Ces dernières sont hautement recombino-gènes et conduisent à des réarrangements chromosomiques (Aguilera & Gomez-Gonzalez, 2008 ; Branzei & Foiani, 2010). Il est à noter que le redémarrage de fourches bloquées par la recombinaison homologue conduit aussi à de tels réarrangements en absence de cassures double brins (Lambert et al, 2010).

Les réponses cellulaires aux dommages à l'ADN sont contrôlées par deux voies de signalisation : une voie ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)-Chk2, qui est activée principalement par les cassures doubles brins, et une voie ATR (ATM and Rad3-related)-Chk1, qui est activée par la présence d'ADN simple brin (Abraham, 2001 ; Cimprich & Cortez, 2008 ; Smith et al, 2010). La clé centrale qui initie l'activation du point de contrôle de la réplication est le recouvrement de l'ADN simple brin par RPA [Replicative Protein A ; (Byun et al, 2005 ; Choi et al, 2010 ; Huang et al, 2010)]. Au niveau des fourches bloquées, le découplage entre les activités de l'hélicase MCM et des polymérases génère l'apparition d'ADN simple brin, et facilite donc le recrutement de RPA (Byun et al, 2005). Le complexe ATR/ATRIP *via* son partenaire ATRIP (ATR Interacting Protein) interagit avec RPA, formant alors un complexe ATR-ATRIP-RPA (Figure 19). L'activation d'ATR est conditionnée par la mise en place du complexe 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) et de la protéine TopBP1 [Topoisomerase-Binding Protein 1 ; (Cimprich & Cortez, 2008)]. Ensuite, ATR propage le signal à sa kinase effectrice Chk1 et la phosphoryle sur les sérines 317 et 345 (Zhao & Piwnicka-Worms, 2001). Une fois activée par phosphorylation, la fraction de Chk1 associée à la chromatine s'en dissocie pour

phosphoryler diverses protéines effectrices qui participent aux arrêts de cycle, à la réparation et à la mort cellulaire (Smits et al, 2006).

Un des principaux mécanismes médiés par la signalisation d'ATR *via* Chk1 est la limitation du « firing » (activation) des origines afin de prévenir, par exemple, les collisions entre de nouvelles fourches et les dommages non réparés. En fait, l'activation de la voie de signalisation ATR/Chk1 supprime l'initiation des origines tardives, c'est-à-dire dans les régions du génome non répliquées, mais favorise l'activation des origines dormantes, c'est-à-dire dans les régions du génome en cours de réplication et donc issues du même réplicon (Ge & Blow, 2010). L'activation des origines est régulée par l'activité des CDK et de la DDK. (voir paragraphe I.A.1.ii). Il est clairement établi que Chk1 inhibe cdk2 (cyclin-dependent kinase 2 en combinaison avec la cycline A ou E) *via* la dégradation de Cdc25A (Scorah & McGowan, 2009 ; Zhao et al, 2002). Par contre, la phosphorylation de DDK par les kinases ATM et ATR en réponse à des dommages à l'ADN ou à un stress réplicatif (Heffernan et al, 2007 ; Lee et al, 2012) n'affecte pas son activité ce qui suggère que l'inhibition de l'activation des origines n'est pas directement modulée par l'activité kinase de DDK (Lee et al, 2012). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tsuji et al., qui ont montré que chez le Xénope, comme dans les cellules humaines, l'activité de la DDK n'est pas affectée par l'activation du « checkpoint » de phase S mais que cette activité serait importante pour réguler ce « checkpoint » et réinitier la réplication une fois le stress levé (Tsuji et al, 2008). Ces auteurs suggèrent également que le « checkpoint » de phase S pourrait plutôt cibler la protéine MCM10 pour empêcher son chargement à la chromatine (Tsuji et al, 2008), ce qui a pour effet d'empêcher le chargement de Cdc45, une protéine essentielle dans la mise en place du complexe de pré-initiation (Broderick & Nasheuer, 2009). Néanmoins, une étude récente montre que l'inhibition du « firing » des origines par le checkpoint de phase S a lieu après le chargement de MCM10 à la chromatine mais avant celui de Cdc45, suggérant que ce n'est pas le chargement de l'hélicase qui est la cible du « checkpoint », mais son activation ainsi que le chargement des polymérase (Karnani & Dutta, 2011).

D'autre part, il est démontré que la voie ATR-Chk1-Claspine favorise la stabilisation des fourches non seulement en conditions de stress mais également au cours d'une phase S normale. De part leurs interactions avec les facteurs de la machinerie réplicative et ceux du point de contrôle intra-S, la claspine et la kinase Chk1 sont considérées comme les protéines de stabilisation des fourches (Scorah & McGowan, 2009 ; Uno & Masai, 2011). La répression d'ATR induit un déclenchement précoce des origines et un ralentissement de la vitesse des fourches, en absence de stress réplicatif (Marheineke & Hyrien, 2004 ; Shechter et al, 2004). De

même, l'inhibition de Chk1 conduit à une sur-activation des origines et à un ralentissement de la progression des fourches de réplication *via* l'inhibition de Cdk2 (Petermann et al, 2008 ; Petermann et al, 2010 ; Scora & McGowan, 2009 ; Syljuasen et al, 2005). Si l'inhibition de la claspine conduit à des résultats similaires à ceux décrits pour Chk1 (Petermann et al, 2008 ; Scora & McGowan, 2009), son action est indépendante de Cdk2-Cdc25 (Scora & McGowan, 2009). Une récente étude effectuée chez la levure *S. cerevisiae* remet en cause un rôle de Mec1 et Rad53 (homologues fonctionnels d'ATR et Chk1) dans la stabilité du réplisome. Les auteurs suggèrent que le rôle de ces protéines serait de contrôler l'activité du réplisome plutôt que sa stabilité (De Piccoli et al, 2012). Enfin, Chk1 contrôlerait également la progression des fourches de réplication en réponse à un stress génotoxique (Conti et al, 2007 ; Kaufmann, 2010).

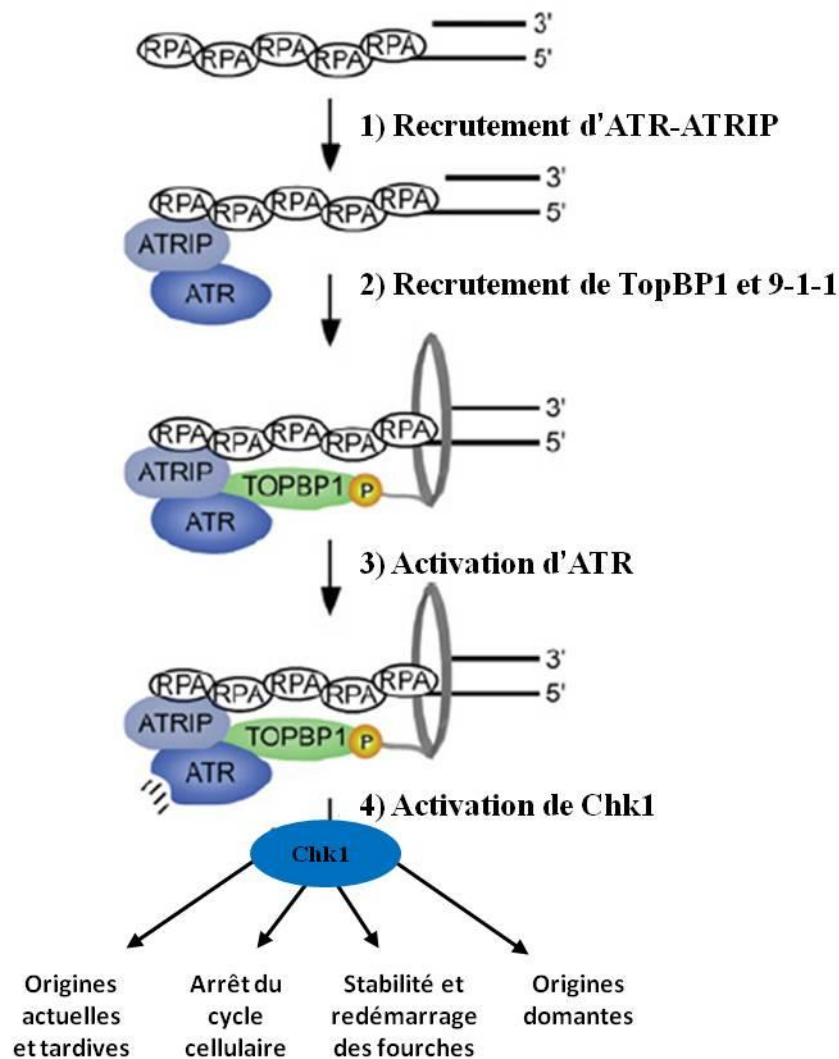


Figure 19 : Activation du point de contrôle intra-S.

Adapté d'après (Allen et al, 2011 ; Cimprich & Cortez, 2008; Nam & Cortez, 2011).

D. Analyse de la dynamique de réplication par peignage moléculaire

1. Principe du peignage moléculaire dynamique

Bien que l'ADN soit hautement condensé et compacté dans le noyau, la technique du peignage génomique permet de réaliser diverses études à l'échelle de la molécule unique avec une haute résolution (Michalet et al, 1997). Cette technique est couramment utilisée dans l'étude quantitative de la réplication de l'ADN et de la stabilité du génome étant donné son potentiel d'étirement d'un grand nombre de molécules d'ADN de manière contrôlée et uniforme (Herrick & Bensimon, 1999b ; Lebofsky & Bensimon, 2003). Suite à de nombreuses tentatives pour ancrer spécifiquement des molécules d'ADN uniques à une surface solide, le peignage moléculaire dynamique fut développé. Son principe consiste en un alignement de molécules liées par leurs extrémités à une lamelle de verre chimiquement modifiée, qui soient uniformément étirées à l'aide de la tension superficielle d'un ménisque en mouvement [Figure 20.A ; (Bensimon et al, 1994 ; Bensimon et al, 1995)]. Les principales étapes de cette méthode sont : 1- l'ancrage physico-chimique des molécules par leurs extrémités à la lamelle de verre silanisée et 2- l'alignement uniforme et l'étirement homogène de l'ensemble des molécules fixées. Ces deux points seront détaillés dans la suite de ce chapitre.

Un des critères essentiels pour obtenir un peignage optimal est de prendre en considération la pureté de la solution d'ADN (Schurra & Bensimon, 2009). La préparation des molécules débute par l'emballage d'un échantillon cellulaire au sein d'un bloc d'agarose (« plug ») pour préserver l'ADN dans son intégrité. La double hélice d'ADN est ensuite « mise à nu » par déprotéinisation et l'agarose est dégradée par digestion enzymatique. L'ADN en solution est transféré dans un réservoir en Téflon, dans lequel une lamelle de verre y est plongée. Le peignage des « pelotes d'ADN » en solution peut ainsi être amorcé. De plus, l'optimisation du peignage moléculaire repose également sur la qualité des surfaces silanisées sur lesquelles les molécules sont étirées (Labit et al, 2008 ; Schwob et al, 2009). Le but est d'obtenir un revêtement hydrophobe monocouche d'organo-silane (groupement vinyle $-\text{CH}=\text{CH}_2$) uniforme sur la surface de verre préalablement débarrassée de tous résidus. De cette approche résulte une fixation irréversible et un alignement uniforme hautement dense de l'ADN (Figure 20.B). Ces caractéristiques confèrent la possibilité de détecter des nucléotides modifiés incorporés dans l'ADN et/ou de réaliser des hybridations de sondes fluorescentes *in situ* (FISH), dans le but de visualiser la dynamique de réplication et d'étudier la stabilité du génome.

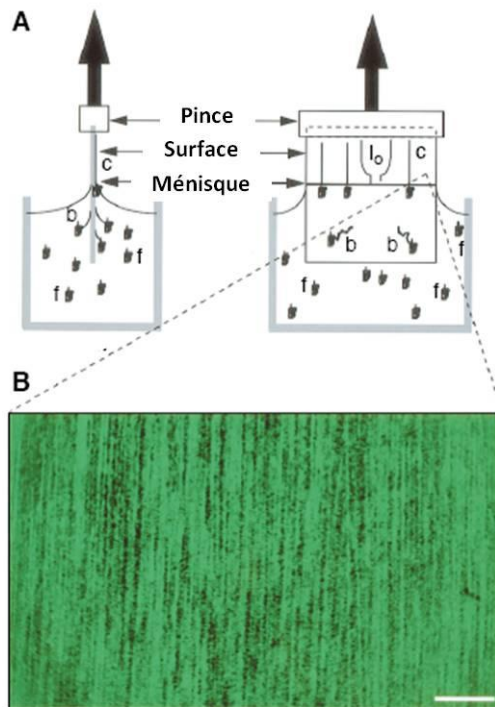


Figure 20 : Peignage moléculaire dynamique.

A. Système expérimental. Une lamelle, maintenue par la pince, est immergée dans une solution d'ADN, incubée durant 5 minutes, puis remontée mécaniquement à vitesse constante de 300 $\mu\text{m}/\text{secondes}$, ce qui garantit un étirement régulier de l'ADN (1 μm = 2 kb). Les molécules d'ADN sont représentées : libres en solution (f) où elles ont une conformation aléatoire en "pelotes", en solution mais attachées à la surface par une extrémité (b) ou bien peignées (c).

B. Plusieurs centaines de génomes peuvent être simultanément peignés par lamelle 22X22 mm. Echelle = 10 μm .

Adapté d'après (Herrick & Bensimon, 1999b; Michalet et al, 1997).

i. Ancrage de la molécule d'ADN à une surface solide

Comme précédemment énoncé, l'interaction physico-chimique de la molécule d'ADN par ses extrémités à la surface silanisée est une des étapes clé du peignage moléculaire. Les molécules d'ADN qui adoptent en solution une conformation de « pelotes désordonnées », animées d'un mouvement brownien, entrent aléatoirement en contact avec la surface traitée, et, éventuellement, finissent spontanément par s'ancrer par l'une de leurs extrémités sur une variété de surfaces (Allemand et al, 1997).

Il est connu que l'ADN est partiellement déroulé à ses extrémités (Stein et al, 1995). Ce déroulement joue un rôle essentiel dans l'exposition des charges négatives sur les bases des extrémités et dans celle du caractère hydrophobe de l'hélice. Cela suggère deux mécanismes possibles de liaison de l'ADN qui dépendent du type de surface. Sur des surfaces chargées positivement, une interaction électrostatique peut avoir lieu avec l'ADN chargée négativement. En revanche, le mécanisme est différent sur des surfaces hydrophobes telles que le silane. Dans des conditions à bas pH et faible concentration en sel, l'ADN tend à se dénaturer et à présenter son cœur hydrophobe, et ainsi augmenter son affinité pour la surface hydrophobe. L'augmentation graduelle du pH limite la dénaturation aux extrémités et donc la liaison

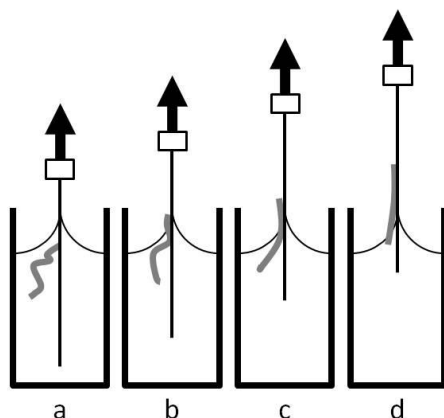
spécifique a lieu uniquement entre la surface et les extrémités. A pH élevé (supérieur à 5,5), la fixation est moins efficace étant donné la faible dénaturation de l'hélice.

En résumé, la liaison est due à l'hydrophobicité et/ou à l'interaction électrostatique entre l'ADN chargé négativement et la surface chargée positivement (Herrick & Bensimon, 1999b). Initialement, il a été observé que la liaison optimale se déclare dans une fenêtre avoisinant un pH de 5,5 sur une surface revêtue de silane, où seules les extrémités de la molécule sont fixées à la surface, alors que le reste de la molécule qui demeure en solution sera étiré sous l'action du ménisque (Allemand et al, 1997).

ii. Elongation des fibres d'ADN

La qualité de l'élongation repose sur la force constante exercée par le ménisque (interface air/solution) pour étendre de manière homogène et de façon strictement parallèle les molécules liées par leurs extrémités à la surface. Son principal avantage est l'obtention d'un étirement mécanique contrôlé et uniforme. En effet, l'étirement de l'ADN est réalisé à l'aide d'une machine dont le levier remonte à une vitesse constante de 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Figure 21). Comme la molécule est ancrée par l'extrémité qui se trouve désormais hors de la solution, il en résulte un déroulement de la pelote d'ADN. Par conséquent, de part et d'autre de l'interface air/solution, l'ADN se déplace librement au sein de la solution, alors qu'une fois le ménisque passé, on constate une fixation irréversible de la molécule étirée sur la surface sèche (Figure 21).

Figure 21 : Représentation schématique du peignage d'une molécule d'ADN.



(a) L'ADN en solution se fixe spontanément par une extrémité sur une lamelle traitée. Lorsque la lamelle remonte (b-c-d), le point d'attachement de l'ADN passe le ménisque, l'ADN est alors étiré et aligné parallèlement au mouvement de la lamelle. Sous le ménisque (b-c), une partie de la molécule est encore libre et mobile en solution, alors que de l'autre côté (c-d), l'ADN est sec et fixé sur la lamelle. Lorsque la lamelle remonte, les molécules d'ADN ancrées à la surface sont entraînées avec elle; le ménisque exerce alors une tension constante sur la partie de la molécule encore immergée. Cette force étire la molécule en solution à proximité immédiate du ménisque, puis la molécule se trouve fixée à la surface après que le ménisque soit passé.

Une expérience originale, réalisée avec l'ADN de phage lambda, a permis d'établir que les molécules peignées sous la contrainte du ménisque, sont identiquement étirées jusqu'à 1,5 fois leur longueur normale ; d'où une corrélation directe de 2 kb/ μm entre la taille réelle de chaque molécule et la longueur mesurée (Herrick & Bensimon, 1999a). La force d'action jouée par le ménisque est plus faible que les forces d'ancrage de la molécule à la surface, et également plus faible que la force nécessaire pour casser une liaison covalente au sein même de la molécule. De plus, la force exercée par le ménisque (qui est à l'origine de l'extension de la molécule) est influencée par la nature de la surface et de la solution tampon utilisées (Allemand et al, 1997). Bien que l'étirement ait lieu au niveau du ménisque, l'ensemble des molécules est étiré à l'identique, mais indépendamment de la taille et de la séquence (Bensimon et al, 1995 ; Herrick & Bensimon, 1999a ; Herrick & Bensimon, 1999b).

iii. Points d'attaches de la molécule

Une fois en contact avec l'air, l'ADN se colle à la surface pour éviter toute rétractation de la molécule, et après réhydratation, elle reste solidement fixée à la surface. L'observation des molécules étirées en microscopie à fluorescence montre que les molécules ont quelques points d'attaches sur le substrat [Figure 22 ; (Gueroui et al, 2002)]. Cette théorie de l'existence de points d'attaches tout le long de la molécule d'ADN n'est pas bien définie, bien qu'un mécanisme analogue à celui de la liaison des extrémités de la molécule à la surface ait été proposé pour expliquer ce phénomène. Par l'emploi de divers traitements de surface, l'étirement et la nature des interactions de l'ADN sur la surface peuvent être variables (van Mameren et al, 2008). Sur des surfaces silanisées hydrophobes, l'ADN est collé sur la totalité de sa longueur avec une très haute densité de points d'attaches (Gueroui et al, 2002).

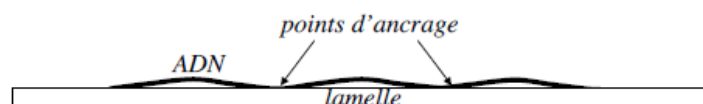


Figure 22 : Représentation schématique d'une molécule d'ADN peignée sur une lamelle de verre.

Les molécules d'ADN sont ancrées à la surface en plusieurs points. Entre chaque point, la molécule n'interagit pas avec la surface.

Un des avantages majeurs du peignage moléculaire dynamique est sa capacité à aligner de haute concentration d'ADN génomique avec une amplitude de taille comprise entre 20 kb et 1 Mb et une longueur moyenne d'environ 250 kb selon le type cellulaire (Patel et al, 2006). Cet atout est extrêmement dépendant de la qualité du traitement de surface qui doit principalement être homogène (Labit et al, 2008). A chaque cycle de peignage, une centaine de génomes est étirée sur une lamelle 22X22 mm, permettant ainsi la réalisation d'études quantitatives fiables (Lebofsky & Bensimon, 2003). Toutefois, une trop grande densité rend l'interprétation des signaux difficiles tandis qu'une trop faible densité rend la recherche des fibres d'intérêt fastidieuse.

L'ensemble des atouts de cette technique, détaillé ci-dessus, conditionne sa puissance à l'échelle du génome. En particulier, le peignage offre la possibilité d'étudier, avec une haute résolution, la réplication de l'ADN dans sa globalité ou à un site spécifique si elle est couplée au FISH, ainsi que la stabilité du génome (réarrangements chromosomiques). Néanmoins, il n'est pas approprié pour permettre l'étude de la réplication de l'ADN mitochondrial qui possède une longueur d'environ 16 kb (Clayton, 2003).

2. Application du peignage moléculaire à l'étude de la réplication de l'ADN

i.Utilisation d'analogues de bases halogénées

Durant la croissance cellulaire, la réplication de l'ADN est un évènement hautement coordonné par lequel une seule copie du génome est synthétisée (Campbell, 1993 ; Chevalier & Blow, 1996). Chez les eucaryotes, la réplication est accomplie par l'activation unique des origines à des locus distincts et seulement une fois par cycle (Aladjem et al, 1998 ; Brewer, 1994). L'analyse spatio-temporelle des évènements de réplication sur de larges régions est donc importante pour comprendre le mécanisme qui régule la réplication de l'ADN dans des conditions normales et pathologiques.

En 1974, Blumenthal publia la première analyse génomique des unités de réplication par le biais d'une combinaison de l'autoradiographie de fibres et de la microscopie électronique, chez les eucaryotes supérieurs (Blumenthal et al, 1974). En particulier, la microscopie électronique permet la visualisation directe des intermédiaires réplcatifs sur molécules individuelles et fut utilisée pour cartographier la première origine eucaryote de réplication [Figure 23 ; (Bozzoni et al, 1981)]. L'autoradiographie de fibres est basée sur un marquage des chromosomes avec de la

thymidine tritiée et sur la détection de régions nouvellement répliquées (Huberman & Riggs, 1966). Cette dernière a permis de réaliser la première évaluation quantitative de la densité des origines et du taux de fourches répliquatives chez les métazoaires (Tuduri et al, 2010).

Au fil du temps, cette technique fut remplacée par des approches de fluorographie de fibres, dans lesquelles l'ADN nouvellement répliqué est substitué avec des dérivés nucléotidiques halogénés tels que la bromo- (Br-), chloro- (Cl-), ou iodo- (I-) désoxyuridine (dU), et est visualisé par immunofluorescence indirecte grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (Jackson & Pombo, 1998). Différentes versions de fluorographie ont été développées pour enregistrer la répllication de molécules individuelles d'ADN. Toutefois, elles diffèrent sur le marquage et la méthode d'étirement. Les plus communes sont "DNA spreads" (Jackson & Pombo, 1998), "DNA combing" [peignage moléculaire ; (Michalet et al, 1997)], et SMARD [Single Molecule Analysis of Replicated DNA ; (Norio & Schildkraut, 2001)]. Toutes ces approches peuvent être couplées à de l'hybridation de sondes fluorescentes *in situ* (FISH) pour identifier des régions d'intérêt et suivre la répllication à un locus spécifique (Lebofsky et al, 2006 ; Norio & Schildkraut, 2001 ; Pasero et al, 2002).

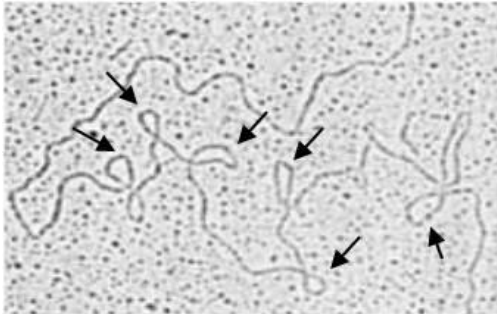


Figure 23 : Structures répliquatives de l'ADN chez *Xenopus laevis*.

Photographie obtenue par microscopie électronique.
Les flèches indiquent les unités de répllication
Adapté d'après (Bozzoni et al, 1981).

Les principales caractéristiques du peignage moléculaire font que cette technique est parfaitement appropriée pour définir avec précision la dynamique de répllication de l'ADN. En outre, elle donne la possibilité de comparer les profils de répllication au niveau génomique entre différents types cellulaires ou entre des cellules traitées avec des composés qui perturbent la répllication et des cellules contrôles. Un autre avantage de la technique est de pouvoir étudier au cours de la même expérience la dynamique de répllication au sein du génome global et au sein d'un locus particulier.

Pour réaliser cette étude, des marquages séquentiels de l'ADN génomique avec des analogues halogénés de la thymidine (BrdU, IdU et CldU) sont appliqués durant une période définie (Figure 24.A). Il est bien entendu que cette technique ne peut s'appliquer que sur une population de cellules en phase de réplication (Schurra & Bensimon, 2009). Après étirement de l'ADN double brin sur les lamelles silanisées, celui-ci est dénaturé en ADN simple brin. Cette étape est indispensable car les analogues incorporés dans l'ADN ne sont reconnus par des anticorps primaires spécifiques à chacun que dans l'ADN simple brin. Ces derniers sont ensuite reconnus par des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes. Depuis quelques années, un autre analogue de base est utilisé, le 5-éthynyl-2-désoxyuridine (EdU), pour étudier les cellules en réplication (Buck et al, 2008). La détection de l'EdU est basée sur la chimie « Click » (Tornøe et al, 2002), et contrairement à l'utilisation du BrdU, CldU et IdU, cette méthode ne nécessite pas la dénaturation de l'ADN.

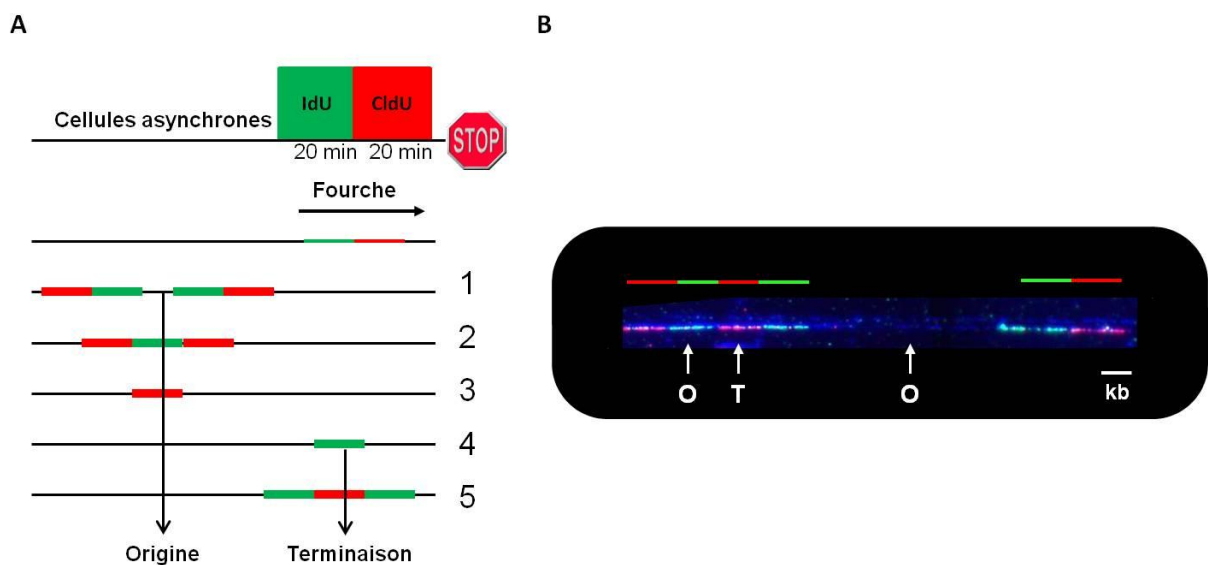


Figure 24 : Analyse de la dynamique de réplication sur ADN peigné.

A. Identification des événements d'initiation et de terminaison grâce au double marquage IdU (vert)/CldU (rouge). Ce dernier permet d'identifier les origines de réplication ayant démarré avant le marquage (1), au cours du premier marquage (2) au cours du deuxième marquage (3), ou les événements de terminaison ayant eu lieu au cours du premier marquage (4) ou au cours du deuxième marquage (5).

Adapté d'après (Anglana et al, 2003).

B. Exemples d'événements d'initiation et de terminaison de réplication dans le génome global. Image brute prise en microscopie à fluorescence. ADN en bleu; IdU en vert; CldU en rouge. O=origine ; T= terminaison ; Echelle= 10 kb.

ii. Différents paramètres analysés : vitesse des fourches, asymétrie de fourches, distance inter-origines, densité de fourches et terminaison

A l'issue de la détection des signaux par immunofluorescence et de l'acquisition des images par le biais d'un microscope à fluorescence, et du traitement des données par un logiciel approprié, il se dessine un profil de réplication multi-couleurs, comme indiqué sur la figure 24.B. Cette approche génère une multitude de données qui permettent de répondre aux questions adressées sur la régulation des différents paramètres du programme répliatif (Figure 25). L'alternance de signaux issue du marquage séquentiel IdU-CldU permet de déterminer le sens de progression des fourches de réplication et d'identifier certaines anomalies telles que la présence de fourches bloquées. Les origines de réplication sont caractérisées par la présence de deux fourches divergentes tandis que les événements de terminaison le sont par deux fourches convergentes. Cette technique permet donc de visualiser les origines de réplication actives au moment du marquage, et d'identifier l'initiation de la réplication au niveau d'origines précoces, intermédiaires et tardives pour établir leur ordre relatif d'activation (Herrick & Bensimon, 1999b ; Lebofsky & Bensimon, 2003). En tenant compte du marquage de l'ADN simple brin, on peut donc mesurer la longueur totale de l'ADN étiré dans un champ donné, déterminer la densité et la position des origines de réplication, mesurer des distances inter-origines ; ainsi que la vitesse, la densité et la symétrie des fourches de réplication sur des molécules d'ADN uniques (Lebofsky & Bensimon, 2003 ; Tuduri et al, 2010). Connaissant la durée d'incorporation des nucléotides halogénés et en mesurant la taille des signaux de fluorescence, qui reflète la distance parcourue par les polymérase pendant ce temps défini, il est possible donc de calculer la vitesse de progression des fourches. La vitesse moyenne de réplication du génome chez les eucaryotes varie de 1 à 3 kb/min. Il existe une hétérogénéité de vitesse de fourches entre les différents types cellulaires et au sein d'une même lignée cellulaire, en fonction des conditions physiologiques et de croissance. Par exemple, les cellules humaines d'adénocarcinomes de sein (MCF-7) et celles de carcinomes de colon (HCT 116) répliquent à une vitesse de 0,8 kb/min et 1,04 kb/min, respectivement (Conti et al, 2010 ; Izawa et al, 2011). En revanche, la vitesse des fourches des lymphocytes B chez le poulet (DT 40) est de 0,4 kb/min (Schwab & Niedzwiedz, 2011).

Pour évaluer correctement une densité qui se définit comme le nombre total de fourches divisé par la longueur totale d'ADN répliquée, il faut nécessairement prendre en considération la fraction de molécules répliquées (les cellules sont préalablement marquées au BrdU, puis la fraction de cellules BrdU⁺ est quantifiée par FACS). Plusieurs études de réplication ont pu ainsi montrer que la densité est très hétérogène d'une espèce à l'autre et selon le type cellulaire : elle équivaut à 10-130 fourches/Mb chez le Xénope (Herrick et al, 2000 ; Marheineke & Hyrien, 2004), et à 6-13 fourches/Mb dans des fibroblastes de hamster chinois (Anglana et al, 2003) et à 2-3 fourches/Mb dans des fibroblastes humains (Despras et al, 2010)]. Enfin, Courbet et al. ont clairement mis en évidence une relation entre la vitesse des fourches et l'activation des origines dormantes au sein d'un même réplicon (Courbet et al, 2008). En effet, les cellules sont capables de compenser une diminution de vitesse de fourches en mobilisant les origines dormantes afin d'assurer une réplication complète du génome en un temps opportun.

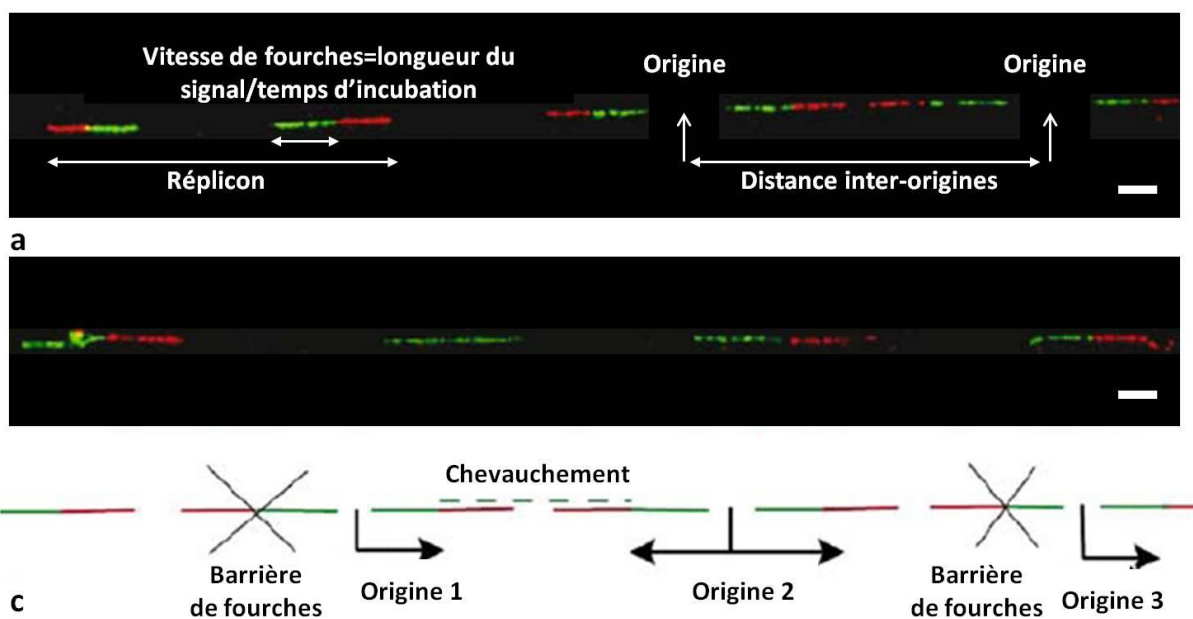


Figure 25 : Paramètres de la réplication de l'ADN et barrières de fourches.

(a) Le marquage séquentiel (IdU en vert puis CldU en rouge) permet de localiser les origines, de visualiser la bidirectionnalité des fourches au sein d'un réplicon, de mesurer la distance inter-origines et de définir la vitesse des fourches. La vitesse de réplication est calculée en divisant la taille du signal par la durée de marquage.

(b) Exemples de barrières de fourches. En haut, image brute prise en microscopie à fluorescence. En bas, représentation schématisée des blocages répliatifs.

(c) Interprétation : le premier signal vert-rouge est suivi d'un segment vert où un signal rouge-vert est attendu. Cela indique l'existence d'une barrière de fourches à l'origine 1, c'est une origine unidirectionnelle. Le signal totalement vert correspond à la superposition de fourches convergentes qui proviennent de l'origine 1 et 2. L'origine 2 est bidirectionnelle comme dans la majorité des cas. L'origine 3 est unidirectionnelle avec une autre barrière de fourche. Echelle= 10µm.

Adapté à partir de (Schurra & Bensimon, 2009).

iii. Conclusion

L'étude de la réplication de l'ADN par peignage moléculaire conduit à l'obtention de résultats statistiquement robustes. Cependant, la détection des signaux au sein d'un bruit de fond et l'analyse manuelle de chacune des molécules, sont deux critères non négligeables qui peuvent être à l'origine de biais expérimentaux. Par conséquent, pour augmenter la vitesse et la rigueur d'analyse des données, l'équipe d'Etienne Schwob a développé un logiciel, nommé IDeFIx, qui identifie automatiquement les fibres d'ADN et ses caractéristiques (Schwob et al, 2009).

Par ailleurs, cette technique est utilisable en absence de toute synchronisation cellulaire, le marquage par des analogues de nucléotides permet d'observer ce qui se passe uniquement dans des cellules en phase S. Malgré ces nombreux avantages, la technique du peignage moléculaire présente quelques inconvénients. En effet, cette technique est composée d'un grand nombre d'étapes qui s'avèrent être très délicates et qui vont conditionner la qualité du peignage. Tout d'abord, la manipulation des « plugs » est délicate puisque ceux-ci sont très fragiles (agarose à bas point de fusion) et peuvent facilement se fragmenter pendant les étapes de lavage. Ensuite, lorsque l'ADN est en solution, celui-ci peut également se casser en de multiples points. Or, un des problèmes majeurs posés par cette technique est l'obtention de fibre d'ADN suffisamment longues pour pouvoir identifier au moins deux origines sur la même fibre, et déterminer ainsi une distance inter-origines (voir paragraphe ci-dessus). Ensuite, la qualité des lamelles va aussi être un paramètre crucial puisque celles-ci doivent avoir la surface la plus adéquate pour fixer une extrémité de l'ADN à partir de laquelle la fibre d'ADN va s'étirer. Enfin, il faut adapter le protocole en fonction du type cellulaire (cellules adhérentes ou en suspension).

D'autre part, la levure ne possède pas de thymidine kinase, nécessaire à la phosphorylation des désoxyribonucléosides, et donc elle est incapable naturellement d'incorporer des nucléotides exogènes dans son ADN. Pour contourner ce problème, des souches de levure exprimant la thymidine kinase avec des niveaux élevés, furent construites (Lengronne et al, 2001 ; Sivakumar et al, 2004 ; Viggiani & Aparicio, 2006).

Pour conclure, le peignage moléculaire est un outil très puissant pour mesurer à l'échelle de la molécule unique les paramètres de la réplication dans des conditions où la cellule est non stressée ou soumise à une dérégulation de son métabolisme. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, je me suis tout particulièrement intéressée à cette technique, pour étudier la réplication de l'ADN en réponse aux radiations UVA.

II. Le rayonnement ultraviolet A

A. Le rayonnement UV

Le rayonnement ultraviolet (UV) correspond à 5 % des radiations électromagnétiques émises par le soleil. Les 95 % restants comprennent la lumière visible (50 %) et les infrarouges (45 %) (Svobodova et al, 2006). La région spectrale du rayonnement UV s'étend de 100 et 400 nm, qui elle-même se décompose en 3 sous-régions : UVA, UVB et UVC (Figure 26). Cette classification émane de l'observation suivante : les effets biologiques induits par les UV varient en fonction de la longueur d'onde émise (Diffey, 2002). En effet, les UVC (100-280 nm), de part leurs énergies élevées, ont l'impact le plus délétère sur l'Homme du fait qu'ils sont fortement absorbés par l'ADN et donc hautement génotoxiques, comparés aux UVB (280-315 nm) et aux UVA (315-400 nm) (Ohnaka, 1993). Néanmoins, et du fait que la couche d'ozone est capable d'absorber efficacement toutes radiations UV inférieures à 300 nm, la totalité des UVC et une partie des UVB n'atteignent pas la surface de la Terre (Frederick et al, 1989). De ce fait, la peau de l'Homme est quotidiennement exposée à 5 % d'UVB et à la totalité des UVA (Madronich et al, 1998). De plus, alors que les UVB n'atteignent que l'épiderme et le derme superficiel, les UVA pénètrent la peau jusqu'au derme profond (Bruls et al, 1984). Dans la suite de ce chapitre, je vais tout particulièrement m'intéresser à l'action des UVA sur la cellule et exposer ses potentiels effets directs et indirects sur les biomolécules.

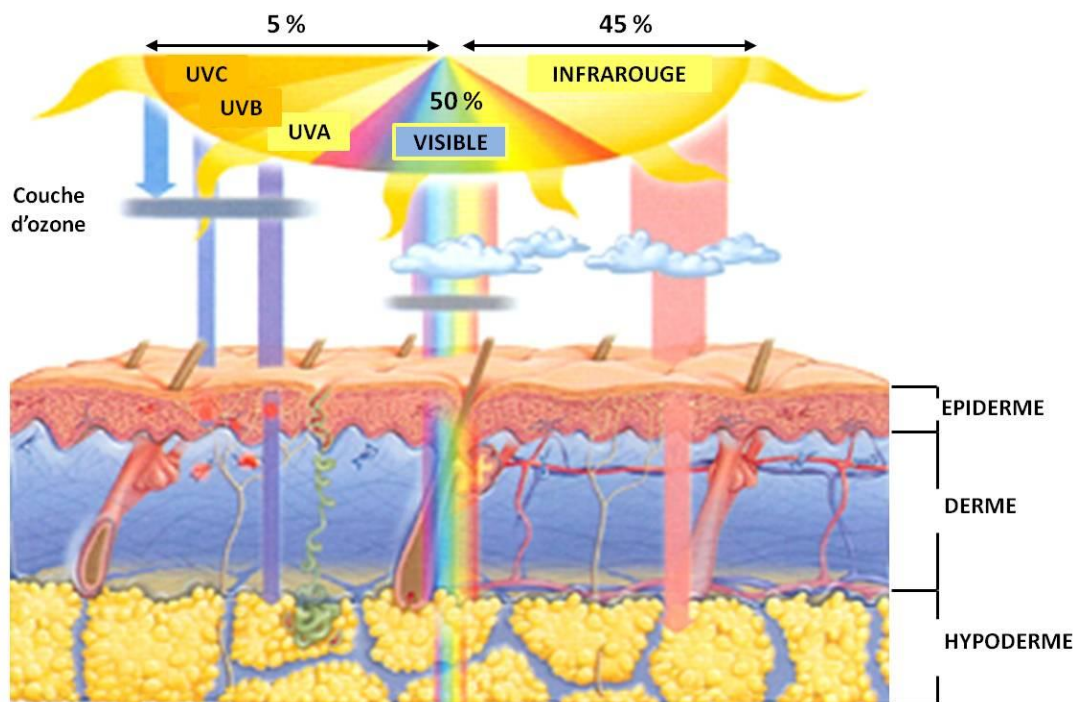


Figure 26 : Le rayonnement UV et la peau.

Après le passage au travers de la couche d'ozone, une partie des UVB atteint l'épiderme et le derme superficiel, alors que la totalité des UVA pénètrent la peau jusqu'au derme profond.

B. Stress oxydatif généré par les radiations UVA

1. La production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène *via* des photosensibilisateurs

Les photons UVA peuvent être absorbés par diverses molécules endogènes appelées photosensibilisateurs tels que les riboflavines, les porphyrines, les quinones et la mélanine (Ito et al, 1993 ; Kawanishi & Hiraku, 2001 ; Wood et al, 2006). Dans leur environnement cellulaire normal, l'effet de ces photosensibilisateurs n'est pas apparent soit parce que leur concentration dans la cellule est trop faible soit parce qu'ils sont localisés dans des complexes où leur pouvoir de photosensibilisateur est atténué. Les photosensibilisateurs peuvent également avoir une origine exogène. Ceux sont des colorants et des biomolécules qui peuvent être d'origine naturelle telle l'hypéricine (Wilhelm et al, 2001), produite par le millepertuis (ou herbe de la St Jean), ou d'origine pharmaceutique comme des antibiotiques de la famille des tétracyclines ou des fluoroquinolones, des anti-inflammatoires (ketoprofen), ou l'agent immunosuppresseur l'azathioprine (O'Donovan et al, 2005), et bien d'autres. Dès lors que ces molécules ont absorbé des photons UVA, une succession de processus moléculaires se déclenche.

Une fois photo-activées par les UVA, ces molécules peuvent indirectement endommager les macromolécules (ADN, protéines et lipides) par des mécanismes de type I ou de type II (Figure 27). Les mécanismes sont dépendants des propriétés chimiques du photosensibilisateur. Le mécanisme de type I implique un transfert direct d'électrons ou d'atomes d'hydrogène entre un photosensibilisateur à l'état excité (Sen^*) et une autre biomolécule (Substrat) (Figure 27). Le transfert ne requiert pas la présence d'oxygène, et conduit à la formation transitoire de deux espèces radicalaires : un radical anion (Sen^-) et un radical cation ($Substrat^+$). En présence d'oxygène moléculaire (3O_2), le substrat comme le photosensibilisateur sont oxydés. Le radical anion (Sen^-) en transférant directement son électron à l'oxygène peut également générer l'anion radical superoxyde (O_2^-). Le mécanisme de type II passe par un transfert d'énergie du photosensibilisateur excité (Sen^*) à une molécule d'oxygène dans son état triplet (état stable). Ce transfert d'énergie a pour effet de produire l'état singulet de l'oxygène (1O_2), qui est un état instable (Foote, 1991). En solution aqueuse, la durée de vie de 1O_2 peut varier de quelques centaines de nanosecondes à environ 2 μs (Gorman & Rodgers, 1992 ; Merkel & Kearns, 1972). Dans ce laps de temps très court, l'oxygène singulet peut alors interagir avec des biomolécules environnantes et les oxyder.

Ces réactions de type I et II produisent donc des ROS. L'oxygène singulet ne peut provenir que de la voie de type II (Baier et al, 2006). En revanche, les deux voies engendrent la production mineure d' $O_2^{\cdot-}$, espèce peu réactive biologiquement qui est convertie par une réaction de dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène n'est pas capable à lui seul de produire des dommages, mais en présence de métaux de transition sous forme réduite (fer, cuivre, ...); il en résulte la production de radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}), très réactifs, par une réaction de Fenton (Figure 27). Il est important de noter également que les UVA favorisent la libération immédiate de fer labile dans la cellule (Pourzand et al, 1999) ce qui contribue à maintenir un niveau de ROS élevé. D'autre part, des espèces réactives de l'azote (RNS; ex: peroxinitrites) peuvent être engendrées après une exposition aux UVA (Villiotou & Deliconstantinos, 1995). Des études ont montré que les radiations UVA peuvent générer à long terme ces deux types d'espèces (ROS et RNS), indiquant alors la possibilité d'un effet prolongé des UVA (Didier et al, 1999; Valencia et al, 2006).

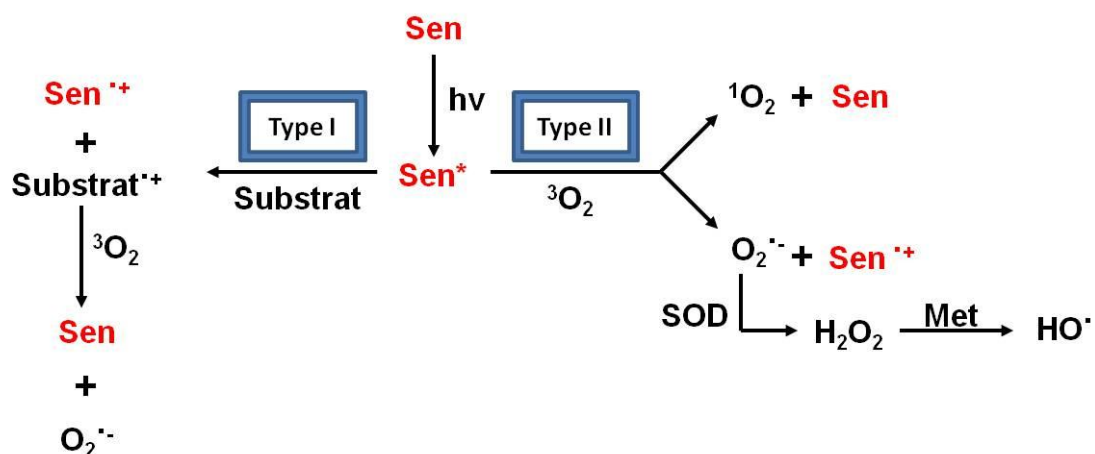


Figure 27 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via une réaction de type I ou II.

Sen : photosensibilisateur ; Sen^* : photosensibilisateur excité ; Met : métal ; SOD : superoxyde dismutase.

Adapté d'après (Svobodova et al, 2006).

2. Les systèmes de détoxification

La production excessive de ROS, lors d'une exposition prolongée aux UVA, est néfaste pour la cellule, comme le témoigne la partie 3 de ce chapitre qui souligne les dommages moléculaires induits par les UVA. Afin de s'en protéger et d'éviter l'apparition d'un stress

oxydatif, la cellule a mis en place des mécanismes de défense dirigés contre ces espèces. Néanmoins, il est important de prendre en considération que la cellule a besoin d'une quantité minimale de ROS. Dans des conditions physiologiques, les radicaux libres participent à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la régulation des gènes, à la transduction de signaux cellulaires, ainsi qu'à la régulation de la mort cellulaire programmée et de l'apoptose (Hultqvist et al, 2009 ; Sauer et al, 2001 ; Stowe & Camara, 2009). C'est pourquoi, la cellule ne cherche pas à éliminer la totalité de ces espèces, mais seulement à maintenir le potentiel rédox intracellulaire.

Pour lutter contre un déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant, un système complexe d'enzymes spécialisées et de molécules antioxydantes est mis en jeu (Halliwell, 1996). Les enzymes de défense peuvent éliminer directement les ROS ou réparer les dommages causés par les ROS sur les biomolécules. Il apparaît que l'expression et l'activité de ces enzymes détoxifiantes sont modulées par les UVA et les UVB (Leccia et al, 2001). La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo-enzyme qui convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Afaq & Mukhtar, 2001). Les eucaryotes possèdent deux types de SOD : la cuivre-zinc SOD (CuZnSOD) située dans le cytoplasme et la manganèse SOD (MnSOD) localisée dans la mitochondrie (Meewes et al, 2001). La MnSOD est fortement induite en réponse à des doses répétées d'UVA (Poswig et al, 1999). Néanmoins, une autre étude a démontré que l'activité de la SOD est immédiatement supprimée après exposition aux UVA, seule une fraction est restaurée au bout de 24 heures (Punnonen et al, 1991). De plus, la catalase (CAT), qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène, intervient également dans le maintien d'un équilibre rédox. Après exposition aux UVA, l'activité de la CAT est altérée, du aux dommages oxydatifs présents au sein même de sa structure protéique (Maresca et al, 2006). Dans les fibroblastes humains, il a également été observé que l'expression de la CAT est affectée jusqu'à 5 jours post-UVA (Shindo & Hashimoto, 1997). Par contre, sa surexpression engendre une réduction du niveau de 8-oxoguanine après UVA dans les kératinocytes humains (Rezvani et al, 2007). En plus de générer des dommages oxydatifs, ces données démontrent que le rayonnement UVA est aussi capable de supprimer les défenses cellulaires par réduction de l'activité antioxydante. Les glutathion peroxydases (GPxs) permettent également la transformation du peroxyde d'hydrogène en molécule assimilables (eau ou alcool). Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une protection efficace ne peut être obtenue par les SOD seules.

Enfin, les molécules antioxydantes non enzymatiques telles que le glutathion (GSH), la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (tocophérol), les polyphénols et l'acide urique participent également au système de défense contre les ROS (McCall & Frei, 1999 ; Nichols & Katiyar,

2010 ; Vives-Bauza et al, 2007). Par exemple, la vitamine E conduit à une réduction de la peroxydation lipidique et à une augmentation de la survie cellulaire après UVA (Shorrocks et al, 2008). Des études ont montré que le GSH joue un rôle critique de défense contre l'action létale des radiations UVA et UVB (Tyrrell & Pidoux, 1988). Suite à une irradiation aux UVA, les kératinocytes et les mélanocytes humains perdent rapidement le GSH réduit (Larsson et al, 2005). Des études ont également suggéré que le GSH pouvait moduler les niveaux de ROS produits après UVA (Tobi et al, 2000). Le GSH est un substrat de l'enzyme de détoxification, la glutathion S-transférase dont la mutation est associée à des risques élevés de cancers de la peau (Lafuente et al, 1995).

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyrédoxines, l'hème oxygénase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites ci-dessus vont utiliser comme cofacteur, le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante.

Si ces systèmes de défense sont inefficaces, un déséquilibre advient en faveur d'un excès de ROS toxiques : on parle alors de stress oxydatif. En conséquence, ces espèces seront sujettes à altérer des cibles biologiques telles que l'ADN, les protéines et les lipides. L'accumulation de dommages oxydatifs dans les cellules est à l'origine du vieillissement cutané et de cancers tels que le mélanome (Halliwell, 1999 ; Picardo et al, 1996 ; Sander et al, 2004 ; Scharffetter-Kochanek et al, 1997).

3. La photoprotection exogène

Au niveau de la santé humaine, les effets nocifs des radiations UVA/B, tels que les cancers de la peau, peuvent être minimisés par photo-protection. L'utilisation de crèmes solaires et de vêtements appropriés, ainsi que la réduction du temps d'exposition sont des principes fondamentaux en termes de protection ultraviolette.

Les crèmes solaires sont composées de divers filtres ultraviolets, incluant les filtres organiques et inorganiques. Ces filtres sont composés de molécules ou complexes moléculaires qui peuvent absorber ou réfléchir et diffuser les radiations UV. Pour être performant, un filtre UV ne doit pas être dégradé sous l'effet de la lumière : il doit être photo-stable et être capable de réduire la pénétration des radiations UVA et UVB (dépend de son spectre de protection). Par conséquent, ils contribuent à l'efficacité photo-protectrice de la crème qui se définit comme le

rapport entre la dose érythémale minimale (DEM= la plus faible dose d'UV qui provoque une rougeur de la peau) d'une peau recouverte de crème solaire et celle d'une peau non protégée (Wolf et al, 2001).

A ce jour, les meilleurs filtres inorganiques pour se protéger des UVA sont le dioxyde de titanium (TiO_2) et l'oxyde de zinc (ZnO). Alors que les principaux filtres UVA organiques sont essentiellement des composés aromatiques combinés à un groupement carboxylique tels que les benzophénones, l'avobenzone, le drométrizole trisiloxane (DTS) et le méthylène-bis-benzotriazolyl tétraméthylbutylphénol (MBBT) ; (Balogh et al, 2011 ; Fourtanier et al, 2012). Toutefois, la mélanine de la peau constitue à elle seule un filtre naturel contre les agressions UV. Mais cette protection naturelle varie en fonction du phototype : plus le phototype est bas (peau claire), plus la sensibilité aux radiations UV est accrue (Tadokoro et al, 2003).

C. Effets des UVA sur les macromolécules biologiques

En absence de systèmes de défense (exogènes ou endogènes) suffisants et/ou fonctionnels, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les UVA, et majoritairement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), peuvent endommager directement les macromolécules biologiques situées à proximité de leur lieu de production. Etant donné la forte réactivité de ces espèces, toutes les molécules biologiques telles que les acides nucléiques (ADN et ARN), les protéines et les lipides, sont susceptibles d'être la cible de ces ROS.

1. Les dommages de l'ADN induits par les UVA

Contrairement aux UVB, les radiations UVA sont faiblement absorbées par l'ADN [Figure 28 ; (Sutherland & Griffin, 1981)]. Néanmoins, il est clairement admis aujourd'hui que les radiations UVA engendrent à la fois des dommages à l'ADN par absorption directe, et de manière indirecte *via* la production de ROS (Sage et al, 2012). Il en résulte donc des lésions de l'ADN de nature différente.

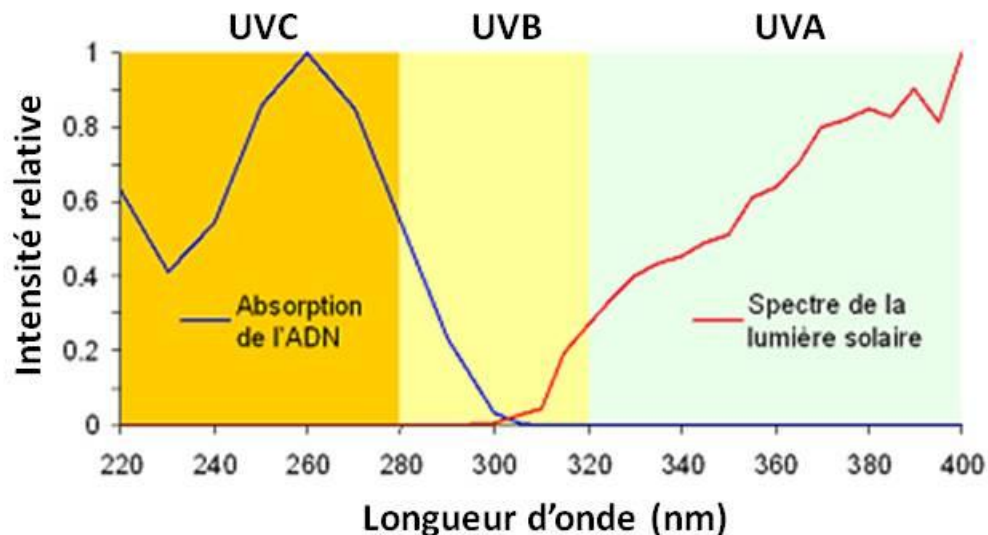


Figure 28 : Superposition du spectre d'absorption de l'ADN et du spectre d'émission de la lumière solaire dans la région spectrale des UV.

Depuis de nombreuses années, les photo-biologistes cherchent à caractériser la nature des dommages induits par le rayonnement UVA. Un de ces types de dommages concerne les cassures simple (SSB) et double brins (DSB). La détection de ces cassures se fait généralement par « comet assay », par gels d'agarose neutres et alcalins, et par la mesure de la formation de foyers γ H2AX. S'il est assez clair que les radiations UVA peuvent générer des SSBs (Petersen et al, 2000 ; Rapp & Greulich, 2004 ; Svobodova et al, 2012 ; Wischermann et al, 2008), les résultats sont plus contradictoires concernant les DSBs. Ainsi, si un certain nombre d'études montrent que les UVA induisent des DSBs (Douki et al, 2003 ; Peak & Peak, 1990 ; Rapp & Greulich, 2004 ; Wischermann et al, 2008), d'autres études n'ont pas observés la formation de DSBs après UVA (Girard et al, 2008 ; Rizzo et al, 2011 ; Svobodova et al, 2012).

Par contre, il est clairement établi que les principaux dommages de base après exposition aux UVA sont des dimères cyclobutane de pyrimidine (CPD) qui sont détectés dans des cellules de mammifères en culture mais aussi au sein des peaux humaines et murines (Chadwick et al, 1995 ; Ley & Fourtanier, 2000 ; Mouret et al, 2006 ; Perdiz et al, 2000). Contrairement au rayonnement UVB qui produit toute classes de CPDs, ainsi que des photoproduits (6-4), les UVA font très majoritairement des CPDs aux sites TT (TT CPDs) et pas de photoproduits (6-4) (Besaratina et al, 2005 ; Besaratina et al, 2011 ; Courdavault et al, 2005 ; Courdavault et al, 2004 ; Douki et al, 2003 ; Mouret et al, 2006 ; Perdiz et al, 2000 ; Rochette et al, 2003). Par ailleurs, les TT CPDs sont moins efficacement réparés dans les cellules irradiées aux UVA qu'aux UVB suggérant que les capacités de réparation de la cellule sont moindres après UVA

qu'UVB (Mouret et al, 2006). Même si le mécanisme de formation des CPDs a longtemps fait débat (effet direct *versus* effet indirect), les données récentes sont en faveur d'une absorption directe des photons UVA par l'ADN (Banyasz et al, 2011 ; Girard et al, 2011 ; Jiang et al, 2009 ; Mouret et al, 2010 ; Sage et al, 2012). L'autre dommage de base prépondérant, induit par l'oxygène singulet généré par le rayonnement UVA, est la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanine ou 8-oxoG), alors que les dommages oxydatifs au niveau des pyrimidines sont bien moindres [Figure 29 ; (Cadet et al, 2009 ; Courdavault et al, 2004 ; Douki et al, 2003 ; Kvam & Tyrrell, 1997)]. Il est également important de noter que la quantité des CPDs prévaut sur celle des dommages oxydatifs ou des cassures simple brin en réponse aux radiations UVA dans les cellules de mammifères (Figure 29), mais pas chez la levure (Kozmin et al, 2005). Enfin, il a été montré que les radiations UVA en combinaison avec la 6-thioguanine (6-TG) peuvent également induire la formation de pontages ADN-ADN et ADN-protéines (Brem & Karran, 2012). La formation de ces dommages, leur fréquence, leur distribution dans l'ADN vont varier en fonction de la nature de la source UVA utilisée, de la dose délivrée, de la présence ou non d'un photosensibilisateur, de la localisation intracellulaire de ce photosensibilisateur (Baier et al, 2006 ; Besaratinia et al, 2007 ; Ibuki et al, 2007 ; Merwald et al, 2005 ; Shorrocks et al, 2008).

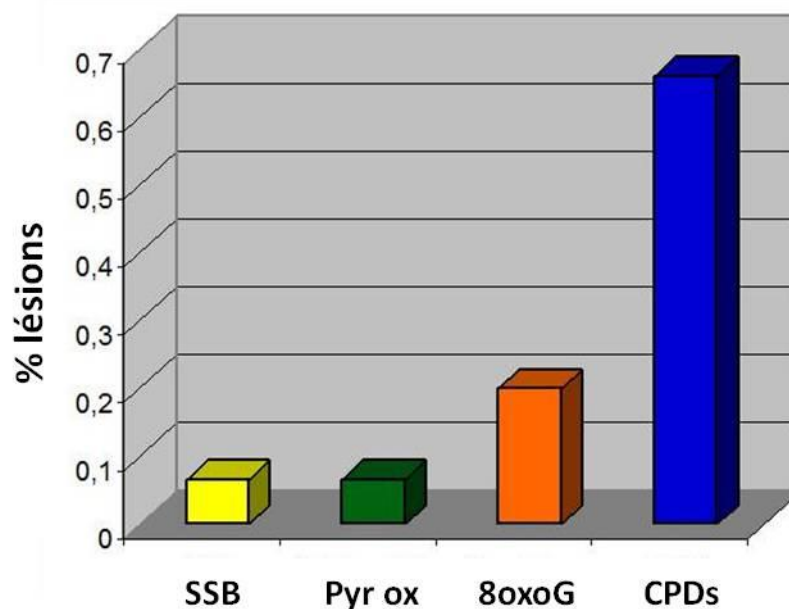


Figure 29 : Distribution des dommages de l'ADN après exposition aux UVA.

SSB : cassures simple brin ; Pyr ox: pyrimidines oxydées ; 8oxoG : 8-oxoguanine ; CPDs : dimères cyclobutaniques de pyrimidines.

Adapté d'après (Douki et al, 2003).

2. L'oxydation des protéines

Du fait de l'abondance des protéines au sein même de la cellule, elles peuvent être les cibles majeures de photo-oxydation par les UVA. Or, une protéine oxydée est potentiellement une protéine qui a perdu son activité (Shacter, 2000). De part la présence d'acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine), les protéines absorbent dans une gamme comprise entre 250 et 320 nm, c'est-à-dire dans l'UVC/UVB. Par contre, les protéines se lient à des groupements prosthétiques tels que les flavines et les hèmes, qui absorbent les photons UVA. Il en résulte une photo-oxydation directe de type I des protéines ou des chromophores liés, *via* une absorption des radiations UVA. De plus, une oxydation protéique *via* le mécanisme de type II peut également avoir lieu (Pattison & Davies, 2006). Tous les acides aminés sont sensibles à l'oxydation (Shacter, 2000), et l'oxygène singulet en particulier peut réagir avec les acides aminés Tryptophane, Tyrosine, Histidine, Méthionine, et Cystéine (Davies, 2003). En particulier, la fonction thiol des résidus cystéines est très sensible à l'oxydation et peut subir diverses altérations rédox réversibles et irréversibles en réponse aux ROS.

Par exemple, l'oxydation des groupes sulfhydryles par les UVA dans les cellules humaines de peau est dépendante du fer, de l'oxygène singulet et du peroxyde d'hydrogène (Vile & Tyrrell, 1995). Les UVA occasionnent aussi des modifications dans la charge de la catalase, probablement *via* des modifications oxydatives des résidus tryptophane et méthionine (Maresca et al, 2006). D'autres protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN, sont sensibles à l'oxydation induite par les UVA. Une étude menée par le laboratoire de P. Karran, et au sein de notre laboratoire, a montré que PCNA, un des cofacteurs des ADN polymérase, subit une modification oxydative irréversible, dépendante à la fois de la dose d'UVA et de l'oxygène singulet (Girard et al, 2011 ; Montaner et al, 2007). De plus, nous avons des données au laboratoire qui démontrent que les UVA sont responsables de la formation de ponts disulfures intramoléculaires au sein de XRCC3, une protéine de réparation des DSBs par recombinaison homologue, et intermoléculaires entre le glutathion (GSH) et des protéines non identifiées (Girard et al., manuscrit soumis). L'ensemble de ces données renforce l'idée que l'oxydation protéique jouerait un rôle dans les effets délétères du rayonnement UVA.

3. Les dommages lipidiques

Les ROS, générées en réponse aux radiations UVA, peuvent induire une oxydation lipidique par deux distinctes voies. La production de lipides hydroperoxydes (LOOH) peut résulter d'une réaction de type I ou II entre des radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) ou de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), respectivement, et un phospholipide (LH) (Figure 30). Ensuite, le LOOH peut emprunter deux chemins différents. Soit il subit une réduction d'un électron qui est catalysée par le fer pour donner un radical peroxyde époxyallylique qui favorise une réaction de peroxydation lipidique en chaîne. Soit le LOOH subit une réduction de deux électrons pour former un alcool inerte (LOH). Les peroxydes lipidiques ainsi formés possèdent une demi-vie longue et peuvent aisément initier des réactions en chaîne qui augmenteront les dommages oxydatifs (Thiele et al, 2001).

Du fait que la membrane cellulaire soit une bicouche phospholipidique contenant une concentration élevée en oxygène moléculaire ($^3\text{O}_2$), cela suggère que la peroxydation lipidique résulte majoritairement d'une réaction de type II impliquant l'oxygène singulet (Valenzeno, 1987 ; Vile & Tyrrell, 1995). L'oxydation lipidique de la membrane induite par les UVA modifie sa fluidité, ainsi que sa perméabilité et sa fonction (Budai et al, 2004 ; Gaboriau et al, 1993). En effet, il est bien connu que les lipides insaturés des membranes cellulaires, incluant phospholipides et cholestérol, sont des cibles de modifications oxydatives induites par les UVA (Girotti & Kriska, 2004). Toutefois, la présence de vitamine E au sein des membranes biologiques peut empêcher cette transmission en chaîne de la peroxydation lipidique. Les principaux produits issus de la peroxydation lipidique tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) sont des agents toxiques et carcinogènes et sont souvent utilisés comme marqueurs de peroxydation lipidique. En effet, ils sont capables de diffuser à l'intérieur des cellules, et sont susceptibles de former des adduits avec les protéines, l'ADN et les phospholipides avoisinants (Esterbauer et al, 1990). La peroxydation photodynamique des lipides est associée à des pathologies telles que la photo-toxicité de la peau et la carcinogénèse (Girotti, 2001).

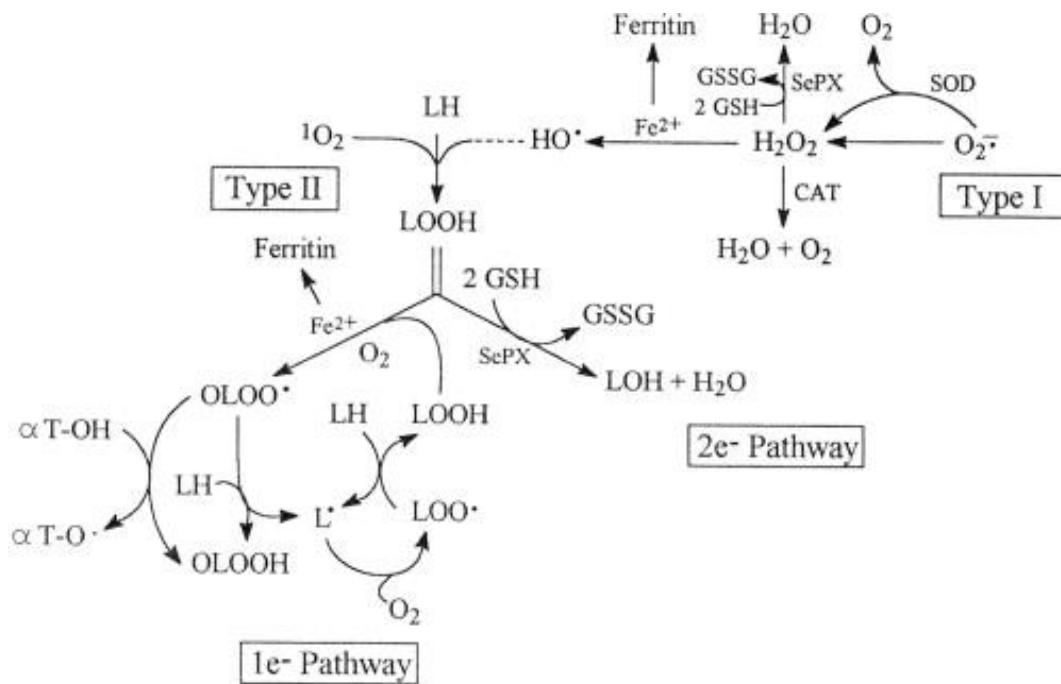


Figure 30 : Formation de lipides hydroperoxydes (LOOH).

D'après (Girotti, 2001).

D. Radiations UVA et cancer de la peau

Etant donné les propriétés physiques et les principales cibles du rayonnement UVA, il est incontestable de reconnaître aujourd'hui que les radiations UVA jouent un rôle non négligeable dans l'étiologie des cancers de la peau (de Gruijl, 1999). Les radiations UVA endommagent l'ADN (CPD, 8-oxoG, SSB) et sont mutagènes à des doses environnementales. Même si l'effet mutagène des radiations UVA est essentiellement lié à la formation des CPDs (Ikehata & Ono, 2011 ; Kappes et al, 2006 ; Pfeifer & Besaratinia, 2012 ; Sage et al, 2012) ; certaines données suggèrent également que le stress oxydatif et des lésions plus complexes pourraient contribuer à cette mutagenèse (Biverstal et al, 2008 ; Phillipson et al, 2002). En effet, une signature spécifique des radiations UVA (transversion $A \rightarrow C$) a été identifiée dans des cellules de hamster chinois (Drobetsky et al, 1995). Néanmoins, le type de mutation le plus fréquemment retrouvé dans les cellules irradiées aux UVB ou aux UVA est la transition $C \rightarrow T$ préférentiellement aux sites méthyl-CpG (Ikehata & Ono, 2011 ; Pfeifer & Besaratinia, 2012) et est désignée comme étant la signature UV solaire (Brash et al, 1991 ; Sage et al, 2012).

Il est estimé qu'environ 10 % des CPDs produits par la lumière solaire pourrait provenir des photons UVA (Grof et al, 2002). Par rapport aux radiations UVB, le fait que la peau soit exposée à cent fois plus d'UVA et que les UVA pénètrent plus efficacement dans les couches profondes de la peau, suggère qu'une fraction des CPDs formés au niveau de la couche basale serait produite par les UVA. En analysant la présence des CPDs et de la 8-oxoG dans des biopsies provenant de carcinomes cellulaires squameux (Squamous Cell Carcinomas) et de kératoses solaires pré-malignes excisées (SK), Agar a conclu que la couche basale dans les tumeurs possède plus de mutations avec une empreinte UVA (Agar et al, 2004). De plus, la quantité de CPDs est maximale dans les couches supérieures. Ce résultat coïncide bien avec la pénétrance graduelle des UVA aux couches baso-épithéliales et au derme, comparé à celle des UVB qui est prépondérante au niveau de l'épiderme. Même si la spécificité mutationnelle des UVA n'est pas encore clairement établie, ces données suggèrent fortement un possible rôle des UVA dans la carcinogénèse cutanée humaine (Halliday et al, 2005). De même, les UVA induisent des carcinomes cutanés chez la souris (de Laat et al, 1997).

Le rôle des UVA dans la cancérogénèse cutanée est sujet à un intense débat vu les contradictions. Setlow est le premier à avoir rapporté que les UVA sont capables de causer des mélanomes chez *platyfish Xiphophorus*, mais Mitchell réfuta récemment cette observation (Mitchell et al, 2010 ; Setlow et al, 1993). Une exposition prolongée aux UVA induit une hyperplasie mélanocytaire (précurseur du mélanome) chez l'*opposum Monodelphis domestica* (Ley, 1997). Au contraire, seul les UVB engendrent des mélanomes malins chez des souris transgéniques (De Fabo et al, 2004). Néanmoins, les données épidémiologiques suggèrent que les radiations UVA participent au développement du mélanome cutané (Autier et al, 2011). Une étude récente, portant sur le séquençage complet du génome d'un mélanome malin comparé à celui d'une lignée lymphoblastoïde issue du même donneur, a montré principalement la présence de la signature UV solaire (C → T transition) et dans une moindre mesure celle d'une signature stress oxydatif (G → T transversion) dans le génome du mélanome (Pleasant et al, 2010).

La population à peau claire dénote une incidence plus élevée de mélanomes que les individus ayant une peau foncée. La phéomélanine et l'eumélanine, présentes dans les peaux claires peuvent agir comme des photosensibilisateurs et produire des ROS. Mais dans les peaux foncées, l'eumélanine, qui est plus abondante, manifeste une protection plus haute à la photosensibilisation, et assure donc une meilleure protection contre les radiations solaires (Kollias et al, 1991). Les cellules de mélanomes humains avec un contenu élevé en mélanine accumulent deux fois plus de 8-oxoG et 40 fois plus de SSB après UVA que les cellules contenant peu de mélanine (Kvam & Tyrrell, 1999 ; Wenczl et al, 1998). Etant donné que ces

dommages se déclarent principalement *via* des mécanismes oxydatifs, cela renforce l'idée que la photo-oxydation UVA joue un rôle dans la formation du mélanome (Hill & Hill, 2000). Une étude très récente montre que la mélanine joue un rôle essentiel dans la mélanomagenèse et permet de réconcilier les effets des UVB et des UVA dans ce processus (Noonan et al, 2012). En effet, les auteurs ont montré que l'induction de mélanome par les UVB, chez un modèle de souris transgénique, est indépendante de la mélanine mais dépend des dommages UV de type CPDs. A l'opposé, l'induction de mélanome par les UVA est dépendant de la mélanine et des dommages oxydatifs (8-oxoguanine) induits par le stress oxydatif émanant de l'interaction entre les UVA et la mélanine (Noonan et al, 2012). Ce résultat suggère que le stress oxydatif induit par les UVA participe à l'induction du mélanome.

III. Préambule : la problématique de la thèse

Au laboratoire, l'équipe s'intéresse depuis plusieurs années à l'étude du rayonnement UVA et de son interaction avec les biomolécules, les levures et les cellules de mammifère en culture afin d'en comprendre les effets, en particulier en terme de dommages à l'ADN et de mutagenèse (Sage et al, 2012). Plus récemment, le choix fut d'étudier l'effet de ce rayonnement sur le cycle cellulaire tout particulièrement au niveau de la réplication de l'ADN. En effet, une littérature de plus en plus abondante suggère qu'un stress de réplication de l'ADN peut engendrer une instabilité génétique et conduire à une prédisposition tumorale (Bermejo et al, 2012 ; Branzei & Foiani, 2010 ; Burhans & Weinberger, 2007 ; Dereli-Oz et al, 2011 ; Lambert et al, 2007 ; Negrini et al, 2010 ; Tourriere & Pasero, 2007).

A mon arrivée au sein du laboratoire, l'équipe venait de montrer que les radiations UVA affectaient la progression du cycle cellulaire et plus particulièrement ralentissaient la phase S dans des cellules humaines (Girard et al, 2008). Ces résultats venaient conforter d'autres données précédemment publiées (Banrud et al, 1995 ; de Laat et al, 1996 ; Kowalczyk et al, 2006 ; Placzek et al, 2007). Néanmoins, les résultats de Girard et al., montraient que cette inhibition était indépendante des voies de surveillance du génome (voies ATM, ATR et p38) et ne semblait pas être la résultante de dommages à l'ADN [CPDs, 8-oxoG, cassures simples et doubles brins ; (Girard et al, 2008)]. Une étude parallèle menée sur la levure *S. pombe* avait conduit à des résultats similaires (Dardalhon et al, 2008). Dans la mesure où les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées au cours de l'irradiation UVA jouent un rôle important dans l'inhibition de la

réplication, il a été proposé que ce soit l'action des ROS sur des acteurs (protéiques ou non) de la machinerie de réplication qui est la cause majeure de cette perturbation de la réplication (Girard et al, 2008). En effet, les modifications oxydatives peuvent conduire dans le cas des protéines, par exemple, à leur inactivation et en conséquence altérer les voies biologiques dans lesquelles ces acteurs sont impliqués (Shacter, 2000). Partant de ces faits, mon projet de thèse a consisté à identifier le mécanisme de ralentissement de la réplication en réponse aux radiations UVA et de valider, ou non, l'hypothèse selon laquelle l'oxydation de facteurs réplicatifs impacte le programme spatio-temporelle de la réplication.

Mes principaux objectifs ont donc été les suivants :

1/ Etudier au niveau moléculaire la réplication de l'ADN en réponse aux UVA.

Jusqu'à présent, l'analyse du cycle cellulaire en réponse aux UVA s'est essentiellement faite par cytométrie de flux (FACS) en marquant les cellules en phase S par le BrdU et en suivant le devenir de ces cellules au cours du temps. Cette approche donne une image globale de la réplication mais ne permet en aucun cas de savoir si ce retard observé résulte d'un ralentissement des fourches de réplication et/ou d'une diminution du nombre d'origines actives. Par conséquent, une analyse par peignage moléculaire fut utilisée pour permettre de répondre à ces questions.

2/ Déterminer si le réservoir de dNTPs est affecté par le rayonnement UVA. Il est connu depuis de nombreuses années qu'une réduction du réservoir de dNTPs inhibe la synthèse d'ADN (Zannis-Hadjopoulos et al, 1980). Si les conséquences d'une irradiation UVC sur le devenir du pool de dNTPs sont connues depuis longtemps (Katz & Sirover, 1987 ; Suzuki et al, 1983), il n'existe pas de données concernant l'effet d'une irradiation UVA sur ce pool. Nous nous sommes donc intéressés au devenir de ce pool après UVA et dans le cadre d'une collaboration, le dosage des dNTPs a été accompli.

3/ Déterminer si les protéines de la réplication sont sensibles à l'oxydation et si leur recrutement à la chromatine est affectée par les UVA. Il a été montré que PCNA subit une modification oxydative irréversible en réponse aux UVA (Montaner et al, 2007). Au laboratoire, nous avons également observé que les ROS générées par les radiations UVA conduisent à l'oxydation réversible [protéines S-glutathionylées, XRCC3 ; (Girard et al., manuscrit soumis)] et irréversible (PCNA) de protéines (Sage et al, 2012). Ces exemples montrent clairement que des protéines de liaison à l'ADN sont sensibles au stress oxydatif généré par les UVA. On peut donc penser que des protéines de la réplication puissent aussi être oxydées au cours de l'irradiation UVA. Or, l'oxydation réversible ou irréversible de protéines de réplication pourrait affecter temporairement ou de façon plus prolongée leur activité et donc conduire également à un ralentissement de la réplication. Par ailleurs, les UVA, indépendamment de leur potentiel oxydant, pourraient aussi modifier la localisation subcellulaire de ces protéines. C'est pourquoi, nous avons aussi étudié la liaison des protéines de réplication à l'ADN avant et après radiation.

La finalité de mon projet de thèse est d'être capable de proposer un modèle moléculaire qui permet de rendre compte de la perturbation de la réplication observée en réponse au rayonnement UVA.

RÉSULTATS

I. Analyse du retard global de réplication en réponse aux radiations UVA par cytométrie de flux

A. Contexte

Les UVA induisent un retard de réplication de l'ADN dans des fibroblastes humains transformés, qui est dépendant à la fois de la dose d'irradiation et des ROS (Girard et al, 2008). Nous avons observé ce retard quelque soit le type cellulaire analysé et quelque soit l'état normal, transformé ou tumoral des cellules étudiées [fibroblastes humains normaux et transformés de peau (NHSF), de poumon (MRC5 et MRC5Vi), cellules lymphoblastoïdes (LCLs), kératinocytes (HaCaT), adénocarcinomes (MCF-7), carcinomes colorectaux (HCT116), cellules de rongeur (CHO et MEF)] (Girard, données non publiées). De cette observation, nous avons donc choisi de conserver les fibroblastes humains transformés MRC5Vi comme modèle cellulaire d'étude.

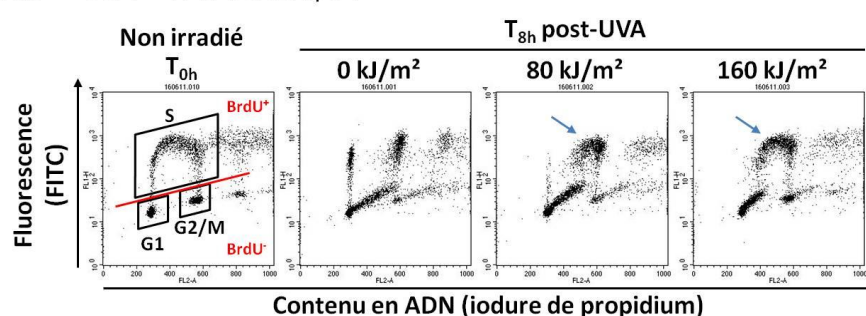
B. Résultats

Pour débiter ce projet, j'ai tout d'abord voulu reconfirmer, par cytométrie de flux, l'effet des UVA sur le ralentissement de la réplication. Pour ce faire, des cellules asynchrones en phase exponentielle de croissance sont incubées en présence de BrdU pendant 30 minutes, puis irradiées à 80 et 160 kJ/m² de radiations UVA. Les cellules sont alors remises en culture pendant 8 heures avant d'être analysées par cytométrie de flux. Comme précédemment publié (Girard et al, 2008), nous montrons qu'au bout de 8 heures, toutes les cellules qui étaient en phase S au moment du marquage au BrdU (cellules BrdU⁺) ont terminé leur réplication et se répartissent entre les phases G2/M et G1 (Figure 31.A). En revanche, on observe bien un ralentissement de la phase S 8 heures après irradiation aux UVA, caractérisé par un épaulement des cellules BrdU⁺, dont l'intensité dépend de la dose d'UVA émise (flèche ; Figure 31.A). De plus, nous constatons que les cellules qui étaient en G1 au moment de l'irradiation (cellules BrdU), rentrent également en phase S avec néanmoins un retard en comparaison avec les cellules non irradiées.

Deuxièmement, nous avons évalué la capacité des cellules en phase S à incorporer le BrdU à un temps donné après UVA. Pour y répondre, le marquage au BrdU est réalisé 8 heures après irradiation. Nous distinguons clairement deux populations qui sont particulièrement visibles après une dose de 160 kJ/m² d'UVA (Figure 31.B). En effet, il y a une population dont l'intensité de fluorescence est dispersée (cellules en milieu et fin de phase S) correspondant aux cellules qui étaient en phase S au moment de l'irradiation et qui répliquent lentement, et une autre dont

l'intensité de fluorescence est plus homogène (cellules en début et milieu de phase S) correspondant aux cellules qui étaient en G1 au moment de l'irradiation et qui semblent répliquer normalement (Figure 31.B). Ces derniers résultats confirment bien que la réplication, particulièrement la fin de phase S, est encore fortement perturbée plusieurs heures après irradiation par un mécanisme que je vais tenter de caractériser, en ayant principalement recours au peignage moléculaire.

A: BrdU → UVA → FACS à temps T



B: UVA → BrdU à temps T_{8h} → FACS

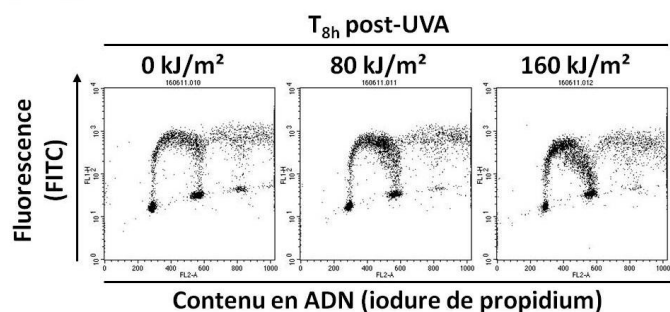


Figure 31 : Ralentiement de la phase S après exposition aux UVA.

A. Les fibroblastes humains transformés MRC5Vi asynchrones sont incubés pendant 30 minutes en présence de 10 mM de BrdU, puis irradiés dans du MEM sans rouge phénol (MEMi) à 80 et 160 kJ/m² d'UVA. Les cellules sont récoltées soit immédiatement (T_{0h}) soit 8 heures post-irradiation (T_{8h}). BrdU⁺ = cellules qui ont incorporé le BrdU ; BrdU⁻ = cellules qui n'ont pas incorporé le BrdU. Les flèches indiquent l'épaule observé dans la progression des cellules en phase S après irradiation.

B. Les cellules MRC5Vi sont exposées ou non aux UVA, puis remises en culture pendant 8 heures, temps au bout duquel les cellules sont incubées en présence de BrdU.

Les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (FACS). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

Comme indiqué précédemment, deux populations de cellules ayant des profils de réplication différents se distinguent après irradiation : l'une ayant une réplication perturbée l'autre ayant une réplication apparemment « normale ». Or, par peignage moléculaire on ne pourra pas distinguer, aux temps longs, les fibres d'ADN provenant de cellules qui étaient en phase S des cellules en G1 au moment de l'irradiation. De ce fait, nous avons également choisi d'étudier les paramètres de la réplication, par peignage moléculaire, de cellules synchronisées en début de phase S afin de s'affranchir de la population cellulaire en G1 au moment de l'irradiation. Dans un premier temps, nous avons recherché les conditions optimales d'expérimentation pour synchroniser les cellules en début de phase S. Notre choix s'est porté sur une synchronisation des cellules à l'aphidicoline (APC). En effet, cet agent de synchronisation a pour fonction d'inhiber les ADN polymérase α et δ , et donc d'enrichir les cellules en phase S (Banfalvi, 2011 ; Wang, 1991). Par ailleurs, contrairement à d'autres agents de synchronisation, tel que l'hydroxyurée (HU) ou le double bloc de thymidine (Banfalvi, 2011 ; Jackman & O'Connor, 2001), l'APC n'altère pas le pool de désoxyribonucléotides triphosphates [dNTPs ; (Nicander & Reichard, 1985)]. Or, comme nous le verrons par la suite, nous nous sommes également intéressés aux niveaux de chacun des quatre dNTPs après irradiation.

Avant d'étudier l'effet du rayonnement UVA sur la réplication de cellules synchronisées, nous avons préalablement réalisé quelques contrôles qui étaient de rigueur. Par cytométrie de flux, nous observons, comme attendu, un enrichissement cellulaire en début de phase S après traitement à l'APC et une phase S terminée 8 heures après relâchement (Figure 32.A). Il est à noter que cette durée de la phase S des cellules synchronisées en début de phase S est identique à celle observée sur des cellules asynchrones (environ 8 heures). Par ailleurs, il a été montré que l'APC génère un stress réplcatif qui se manifeste par la phosphorylation de la kinase Chk1 par la protéine kinase ATR (Byun et al, 2005), un des acteurs essentiels des voies de surveillance de l'intégrité du génome (Mordes & Cortez, 2008). Nous avons donc voulu savoir si ce stress perdurait longtemps ou non après relâchement à l'APC. En effet, nous ne voulions pas rajouter au stress réplcatif généré par l'APC, celui induit par le rayonnement UVA. L'étude de la phosphorylation de la sérine 345 de Chk1 (Chk1Ser345) par western-blot montre que Chk1 est phosphorylée en réponse à l'APC, mais l'intensité de cette phosphorylation diminue très rapidement après retrait de cet agent de synchronisation (Figure 32.B), ce qui correspond à une reprise de la réplication (Figure 32.A). Par ailleurs, l'absence complète de détection de la phosphorylation de Chk1 est clairement effective après 4 heures de relâchement. C'est pourquoi, dans le but d'optimiser notre étude, nous avons par la suite privilégié cette condition

expérimentale que l'on a nommée S4R, signifiant que les irradiations ont eu lieu 4 heures après le relâchement à l'APC.

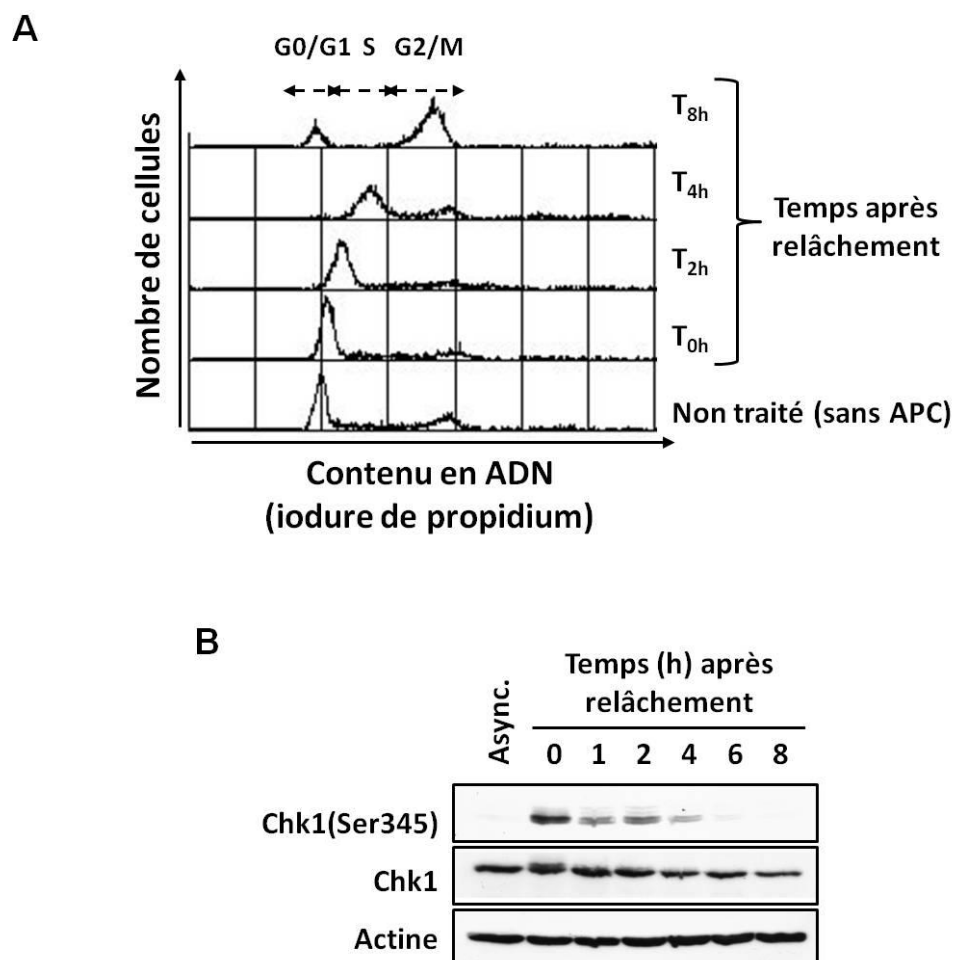


Figure 32 : Synchronisation des fibroblastes humains transformés MRC5Vi en début de phase S par traitement à l'aphidicoline (APC).

Les cellules sont traitées pendant 16 heures à l'APC (5 µg/ml), ensuite ce dernier est retiré, puis les cellules sont remises en culture pendant des temps donnés.

A. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS).

B. Etude par western-blot de la phosphorylation de la Ser345 de Chk1 en fonction du temps, après traitement et retrait de l'APC. Les extraits sont analysés par SDS-PAGE en condition réductrice (+ β-mercaptoéthanol). L'actine est utilisée comme témoin de charge. Async.= cellules asynchrones.

Afin de compléter nos résultats, nous avons comparé le profil de distribution des cellules synchronisées en phase S par l'APC et irradiées soient immédiatement (condition S0R), soient 4 heures (condition S4R) après relâchement, au sein-même du cycle cellulaire. L'étude de la progression de la phase S par cytométrie de flux, 8 heures (condition S0R) et 4 heures (condition

S4R) après exposition des cellules à 80 et 160 kJ/m² d'UVA, rend manifeste un retard de réplication qui est dépendant de la dose d'UVA et qui est assez similaire entre les cellules synchronisées qui sont irradiées soient en début (S0R) ou milieu de phase S (S4R) (Figure 33). On peut néanmoins noter un retard légèrement plus prononcé à la dose de 80 kJ/m² d'UVA dans la condition S4R comparée à la condition S0R, même si les profils de migration sont très similaires à la dose de 160 kJ/m² d'UVA.

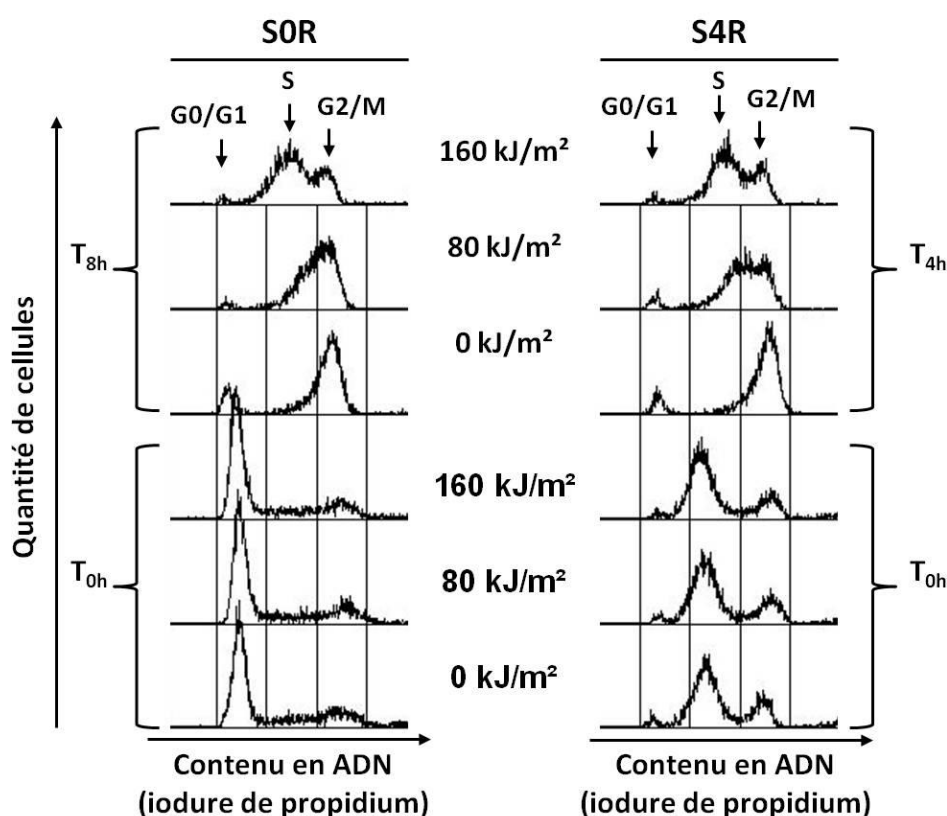


Figure 33 : Ralentissement de la phase S après exposition aux UVA dans les cellules MRC5Vi synchronisées en début ou milieu de phase S.

Les cellules sont traitées pendant 16 heures à l'APC, ensuite ce dernier est retiré, puis les cellules sont irradiées aux UVA soit immédiatement (S0R) soit 4 heures après relâchement (S4R) et remises ou non en culture pendant 8 heures (T_{8h}) et 4 heures (T_{4h}) respectivement. Les résultats sont représentatifs de 3 distinctes expériences.

Dans nos conditions expérimentales, la durée de la phase S dans la condition S4R a pu être approximativement estimée à 8 heures, 10 heures et 12 heures pour des doses respectives de 0, 80 et 160 kJ/m² d'UVA (Figure 34). Ces valeurs sont similaires à celles obtenues à partir de cellules asynchrones ou synchronisées et irradiées en début de phase S (condition S0R : données non montrées).

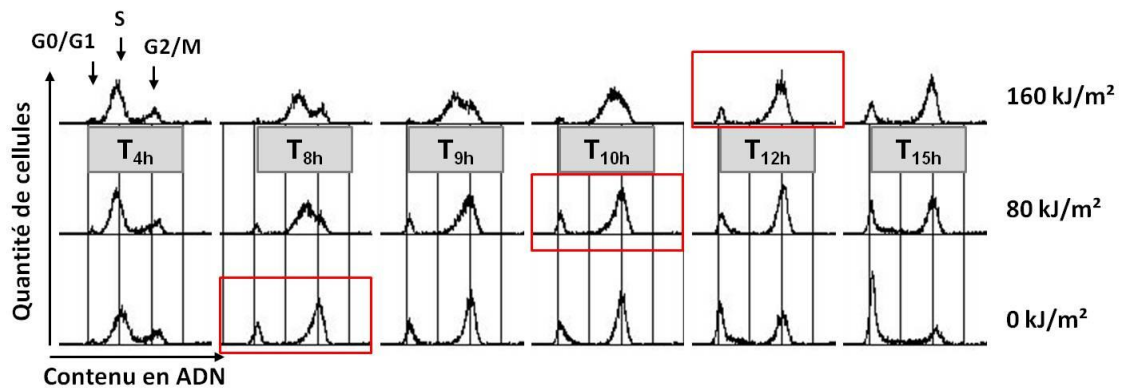


Figure 34 : Extension de la phase S dans des fibroblastes humains MRC5Vi synchronisés en milieu de phase S dépend de la dose d’UVA.

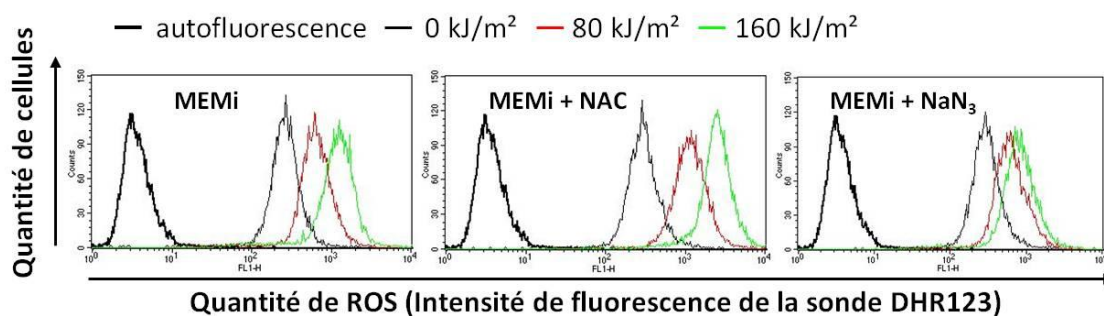
Les cellules sont synchronisées en milieu de phase S et immédiatement exposées aux doses d’UVA de 80 et 160 kJ/m², puis remises en culture pendant différentes périodes de temps. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les délais sont identiques pour des cellules synchronisées en début de phase S (condition S0R non montrée). Les données présentées sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Nous avons également vérifié dans des MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S (S4R) que ce retard réplcatif induit par les UVA est dépendant des ROS, comme précédemment publié sur des cellules asynchrones (Girard et al, 2008). Dans un premier temps, l’emploi de la sonde DHR123 a permis de mettre en évidence une production de ROS qui est corrélée à la dose d’UVA émise (Figure 35.A). L’usage de cette sonde a aussi aidé à montrer que l’azide de sodium (NaN₃), un inhibiteur de la production d’oxygène singulet (¹O₂) est l’antioxydant par excellence que nous devons utiliser pour piéger l’oxygène singulet produit durant une exposition aux UVA [Figure 35 ; (Li et al, 2001)]. Par contre, l’ajout de N-acétyl-L-cystéine (NAC) au cours de l’irradiation ne prévient pas la formation de ROS. Puisque la durée de vie de l’oxygène singulet en solution est assez courte dans les systèmes biologiques (de la ns à la μs) (Gorman & Rodgers, 1992 ; Merkel & Kearns, 1972), et dans la mesure où la sonde DHR123 est ajoutée après UVA, il est clair que celle-ci ne détecte pas l’¹O₂ produit mais probablement les peroxydes intracellulaires dont la production dépend de l’oxygène singulet (Qin et al, 2008 ; Sakurada et al, 1992).

De plus, nous avons pu constater que l'ajout de NaN_3 au cours de l'irradiation abolit le retard de réplication (Figure 35.B). Enfin, sachant que la production de ROS, plus particulièrement de $^1\text{O}_2$, est dépendante de la présence de photosensibilisateurs dans le milieu d'irradiation, les cellules ont également été irradiées dans le PBS qui est dépourvu de photosensibilisateurs. Dans ces conditions, et comme attendu, on ne constate pas de retard de réplication induit par les UVA (Figure 35.B). L'ensemble de ces données confirment bien que dans nos conditions expérimentales, ce ralentissement répliatif est dépendant des ROS, plus précisément de l'oxygène singulet.

Comme nous avons montré que les radiations UVA produisent des ROS intracellulaires, nous nous sommes également demandé si celles-ci perduraient et si leur présence, à long terme dans la cellule, pourrait expliquer l'effet sur la phase S. De ce fait, les cellules en S4R sont irradiées ou non, puis incubées avec la sonde DHR123 à différents temps après irradiation. Les résultats montrent que la quantité de ROS (les peroxydes) produite immédiatement après radiation (T_{0h}) diminue fortement au bout de 30 minutes ($T_{1/2h}$) et devient négligeable 1 heure après radiation (T_{1h}) (Figure 36). En conséquence, on peut penser que l'effet des ROS sur la dynamique de réplication est probablement immédiat, mais ne doit pas avoir un rôle majeur à long terme.

A



B

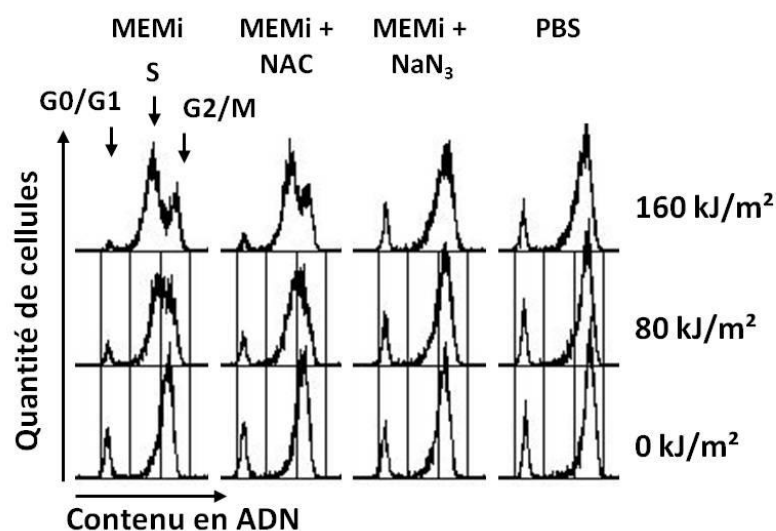


Figure 35 : Abolition du retard réplcatif induit par les UVA en présence d'azide de sodium (NaN_3).

Les fibroblastes humains MRC5Vi sont synchronisés en milieu de phase S (S4R), puis exposés aux doses de 80 et 160 kJ/m^2 d'UVA dans du milieu MEMi ou du PBS, en présence ou non de 10 mM NaN_3 ou NAC.

A. Après irradiation, les cellules sont remises en culture pendant 30 minutes en présence de la sonde DHR123.

B. Les cellules sont remises en culture pendant 4 heures post-UVA. Les échantillons récoltés sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS).

Les données sont représentatives de deux expériences distinctes au minimum. Les résultats sont similaires pour des cellules synchronisées en début de phase S (condition S0R : données non montrées).

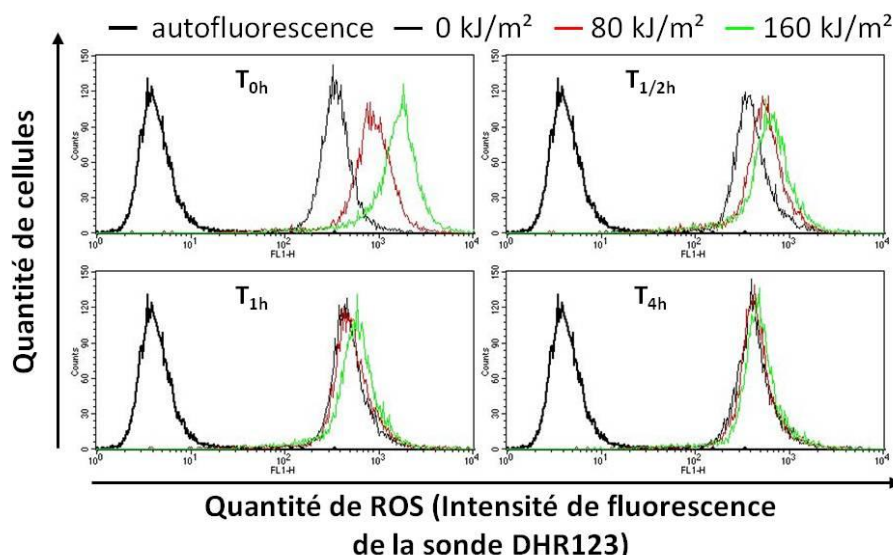


Figure 36 : Les radiations UVA induisent une production transitoire de ROS.

Des cellules MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S (S4R) sont irradiées ou non aux UVA (80 et 160 kJ/m²), puis remises en culture pendant des temps différents (T_{0h}, T_{1/2h}, T_{1h} et T_{4h}). Avant chaque récolte, les cellules sont incubées 30 minutes avec la sonde DHR123. Ensuite, les échantillons sont immédiatement analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

C. Conclusion

L'ensemble des données présentées dans cette première partie des résultats montrent que le ralentissement de la réplication induit par les UVA est similaire lorsque les cellules sont irradiées en milieu (condition S4R) ou en début de phase S (condition S0R). Or, les cellules en S4R, contrairement à celles en S0R, ont déjà répliqué la moitié de leur génome au moment de l'irradiation. A partir de ces observations, on peut donc en conclure que l'effet des radiations UVA sur la réplication est du même ordre de grandeur lorsque les cellules sont déjà en cours de réplication au moment de l'irradiation, c'est-à-dire lorsque les fourches de réplication progressent (condition S4R), que lorsque celles-ci sont arrêtées (condition S0R). Nous montrons également que ce ralentissement est dépendant des ROS, principalement de l'oxygène singulet généré pendant l'irradiation.

De ce fait, nous proposons que le ralentissement de la réplication puisse être la conséquence d'une diminution de la vitesse des fourches de réplication et d'une inactivation des origines suite au stress oxydatif généré par les radiations UVA. Il existe déjà deux arguments en faveur de ces hypothèses : 1) les cellules irradiées en G1 semblent entrer normalement en phase S ce qui suggère fortement que les UVA n'affectent pas le mécanisme de réplication à l'étape de

mise en place du complexe pré-réplicatif (pré-RC), mais que l'incident a probablement lieu plus tardivement au moment du « firing » et 2) par comparaison aux cellules SOR, seules les cellules S4R ont eu la capacité de répliquer normalement avant que n'ait eu lieu l'irradiation. Dans ce cas-ci, les UVA ont probablement affecté l'élongation et l'initiation. En conséquent, ces deux essentielles étapes de la réplication, activation des origines et élongation, peuvent être supposées responsables de ce retard, et doivent donc être analysées en détail.

II. Etude de la vitesse de fourches en réponse aux radiations UVA

A. Contexte

Une diminution de la vitesse des fourches pourrait être une explication plausible à ce retard réplicatif, comme mentionné ci-dessus. C'est la raison pour laquelle, nous avons eu recours à la technique du peignage moléculaire ou couramment appelé « DNA combing » pour analyser précisément ce paramètre (voir Introduction, I.D). La robustesse de cette technique apporte un réel atout à nos travaux. Chronologiquement, ma première année de thèse a essentiellement consisté à mettre au point cette technique au sein du laboratoire dans la mesure où elle n'y était pas implantée. De plus, la commercialisation des lamelles silanisées n'étant pas effective, j'ai été amenée à mettre également au point le traitement des lamelles nommé « silanisation » (Labit et al, 2008), en y apportant quelques modifications. Toutefois, les derniers résultats ont été obtenus à partir de lamelles provenant de la plateforme de peignage moléculaire de Montpellier (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS-UMR5535) et de la société Genomic Vision (implantée à Bagnex 92, France). Il s'avère, fort heureusement, que quelque soit la provenance des lamelles silanisées, une homogénéité des données est conservée.

B. Résultats

1. Diminution instantanée de la vitesse de fourches

D'un point de vue expérimental, des fibroblastes humains transformés MRC5Vi asynchrones ont été incubés en présence d'IdU (100 μ M) pendant 30 minutes, irradiés ou non à 80 et 160 kJ/m² d'UVA, puis rincés avec du milieu frais et immédiatement réincubés avec du CldU (100 μ M) durant 40 minutes (Figure 37). La durée du deuxième pulse n'a pas été choisie de manière arbitraire. Si notre hypothèse s'avère exacte, le marquage après UVA doit suffisamment être grand pour pouvoir en mesurer sa longueur. Puisque l'IdU est ajouté avant irradiation, la taille moyenne des signaux révélés par les anticorps spécifiques de l'IdU (marquage vert, Figure 37.A) ne doit pas dépendre de la dose d'irradiation. Pour mesurer la vitesse moyenne des fourches de réplication à partir du signal IdU, je n'ai pris en compte que les signaux verts séparés par une absence de signal, c'est-à-dire correspondant à des origines de réplication déjà activées au moment du marquage à l'IdU (voir Introduction, I.D). Après avoir analysé les échantillons, les résultats montrent que la vitesse de réplication avant irradiation (signal IdU) varie de 0,96 à 1,22 kb/min (Figure 37.B). Par conséquent, la vitesse moyenne de réplication est de $1,08 \pm 0,13$ kb/min, valeur déjà décrite pour d'autres systèmes cellulaires (Courbet et al, 2008 ; Daboussi et al, 2008). Par ailleurs, il est important de noter que d'une expérience à l'autre, les valeurs de vitesse moyenne de réplication peuvent changer, c'est-à-dire être soit légèrement plus grande soit légèrement plus petite que 1 kb/min. Ceci dépend probablement des conditions de culture (nouveau stock de cellules, nouveau milieu de culture, etc...).

Pour mesurer l'impact des radiations UVA sur la vitesse des fourches de réplication, la taille des signaux révélés par les anticorps spécifiques du CldU a été mesurée dans les différentes conditions. En absence d'UVA, la vitesse des fourches est d'environ 1,4 kb/min, valeur légèrement supérieure à celle obtenue avec l'IdU (1,22 kb/min) dans les mêmes conditions (Figure 37.B). Lorsque les cellules sont exposées à 80 et 160 kJ/m² d'UVA, on observe une diminution de la vitesse des fourches qui est dépendante de la dose d'UVA, celle-ci étant de 0,93 et 0,74 kb/min à 80 et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement (Figure 37.B). On observe donc une réduction de la vitesse moyenne des fourches de réplication entre 30 et 70 minutes après l'irradiation. Enfin, on constate que les valeurs de la moyenne et de la médiane des vitesses sont très proches, quelque soit la condition expérimentale analysée, ce qui suggère que la distribution des vitesses reste quasi homogène même après UVA. D'autre part, nous visualisons une large distribution des vitesses de fourches, ce qui montre que toutes les fourches de réplication ne progressent pas exactement à la même vitesse (Figure 37.B). Cette observation est cohérente du

fait de l'hétérogénéité des régions d'ADN à répliquer [euchromatine, hétérochromatine, séquences structurées, complexes ADN-protéines ; (Berezney et al, 2000)].

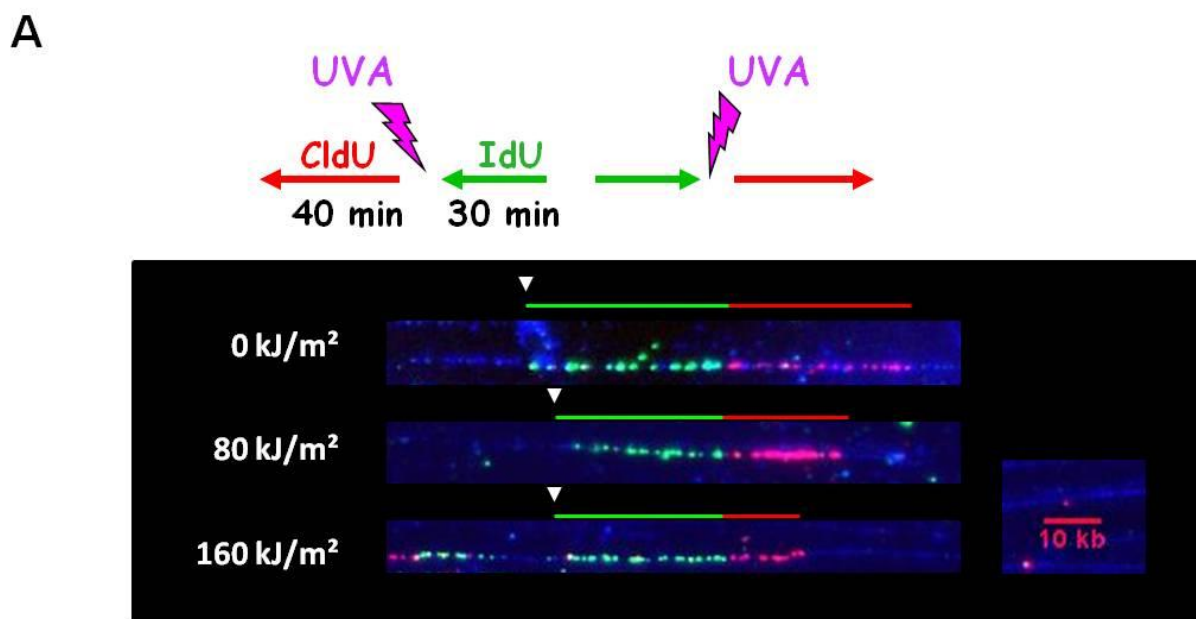


Figure 37.A : Effet du rayonnement UVA sur la vitesse des fourches de réplication immédiatement après radiation.

Protocole expérimental et image de fibres d'ADN irradiées ou non aux UVA : représentation d'une seule fourche ; IdU en vert ; CldU en rouge ; ADN en bleu.

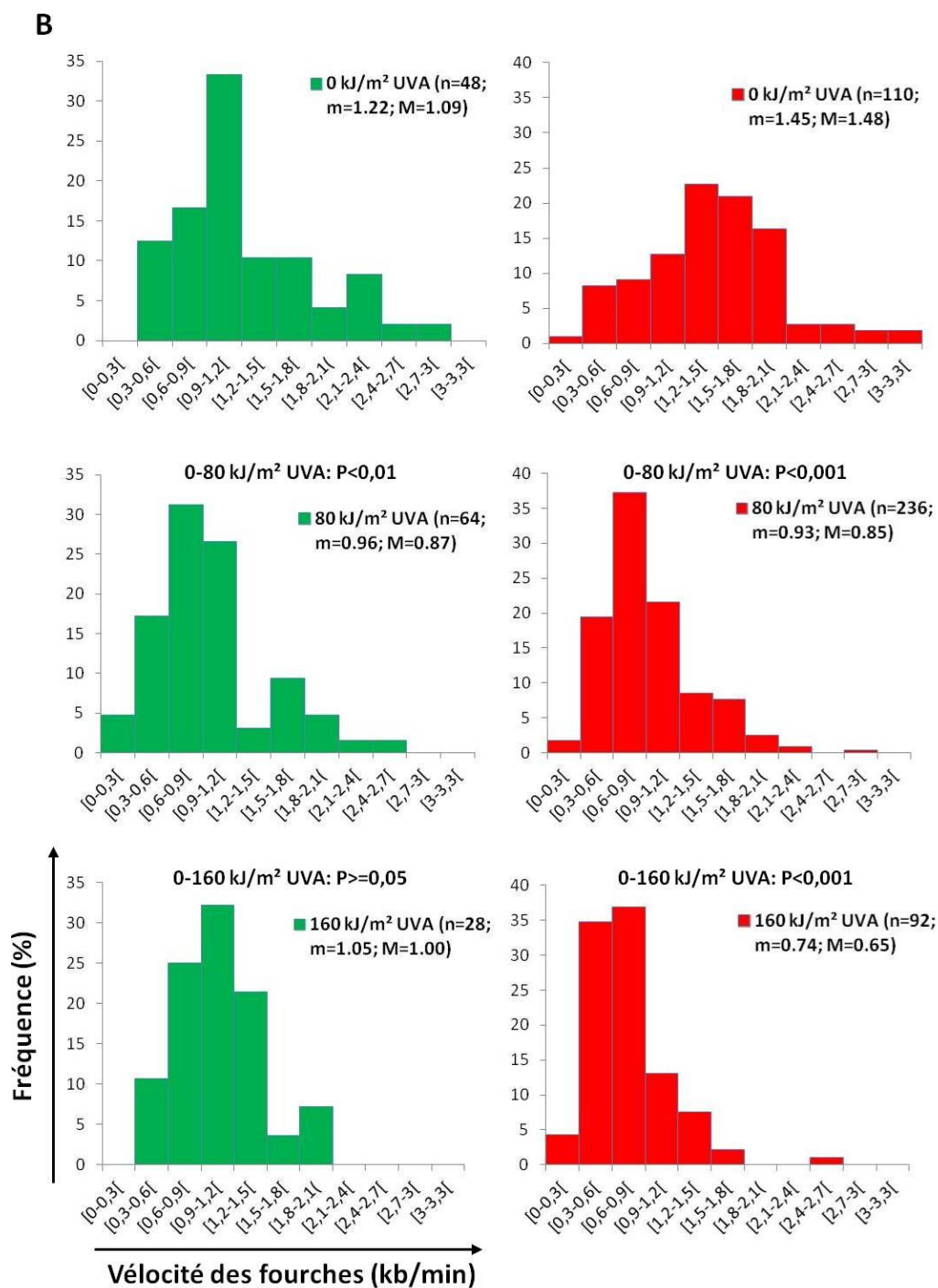


Figure 37.B : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement après radiation.

Des cellules asynchrones MRC5Vi sont incubées 30 minutes avec de l'IdU (histogrammes verts), puis exposées ou non à 80 et 160 kJ/m² d'UVA et réincubées avec du CldU (histogrammes rouges) pendant 40 minutes. Les histogrammes représentent la fréquence de fourches (exprimée en %) en fonction de leur vitesse (exprimée en kb/min) par tranche de 0,3 kb/min. Ces données sont représentatives d'au moins deux expériences différentes. n= nombre de signaux analysés ; M=médiane ; m=moyenne. Test Mann Whitney (two-tailed test).

Afin de confirmer ces premiers résultats, et pour éliminer toute interférence entre l'IdU incorporé et le rayonnement UVA, les cellules MRC5Vi sont tout d'abord irradiées puis marquées séquentiellement avec de l'IdU et du CldU, pendant 40 et 30 minutes, respectivement (Figure 38.A). L'analyse des signaux obtenus avec l'IdU (n'ont été pris en compte que les signaux verts séparés par une absence de signal) montre une diminution immédiate de la vitesse des fourches (c'est-à-dire dans la fenêtre de temps entre 0 et 40 minutes après UVA), qui est dépendante de la dose d'UVA (Figure 38.B). Ainsi, aux doses de 80 et 160 kJ/m² d'UVA, la vitesse des fourches diminue de 44% et 77%, respectivement. L'analyse des signaux obtenus avec le CldU (fenêtre de temps entre 40 et 70 minutes après UVA) montre également une diminution de la vitesse des fourches de réplication mais seulement de 20% et 43% aux doses de 80 et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement (Figure 38.B). Ces résultats confirment les données obtenues précédemment et suggèrent que le ralentissement des fourches n'est que transitoire.

A

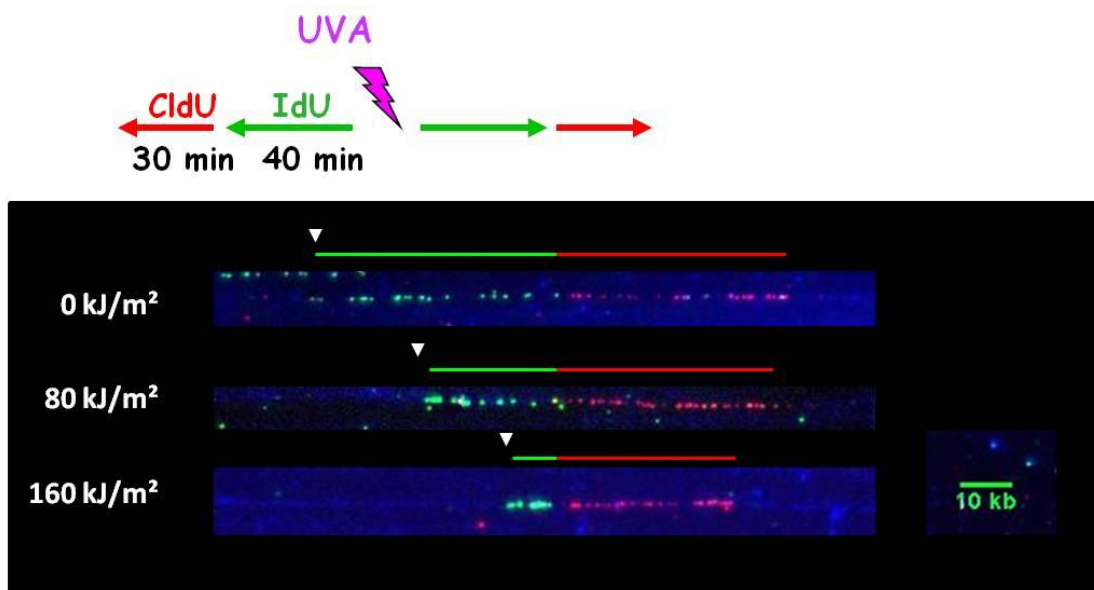


Figure 38.A : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement ou 40 minutes après irradiation.

Protocole expérimental et image de fibres d'ADN irradiées ou non aux UVA : représentation d'une seule fourche ; IdU en vert ; CldU en rouge ; ADN en bleu.

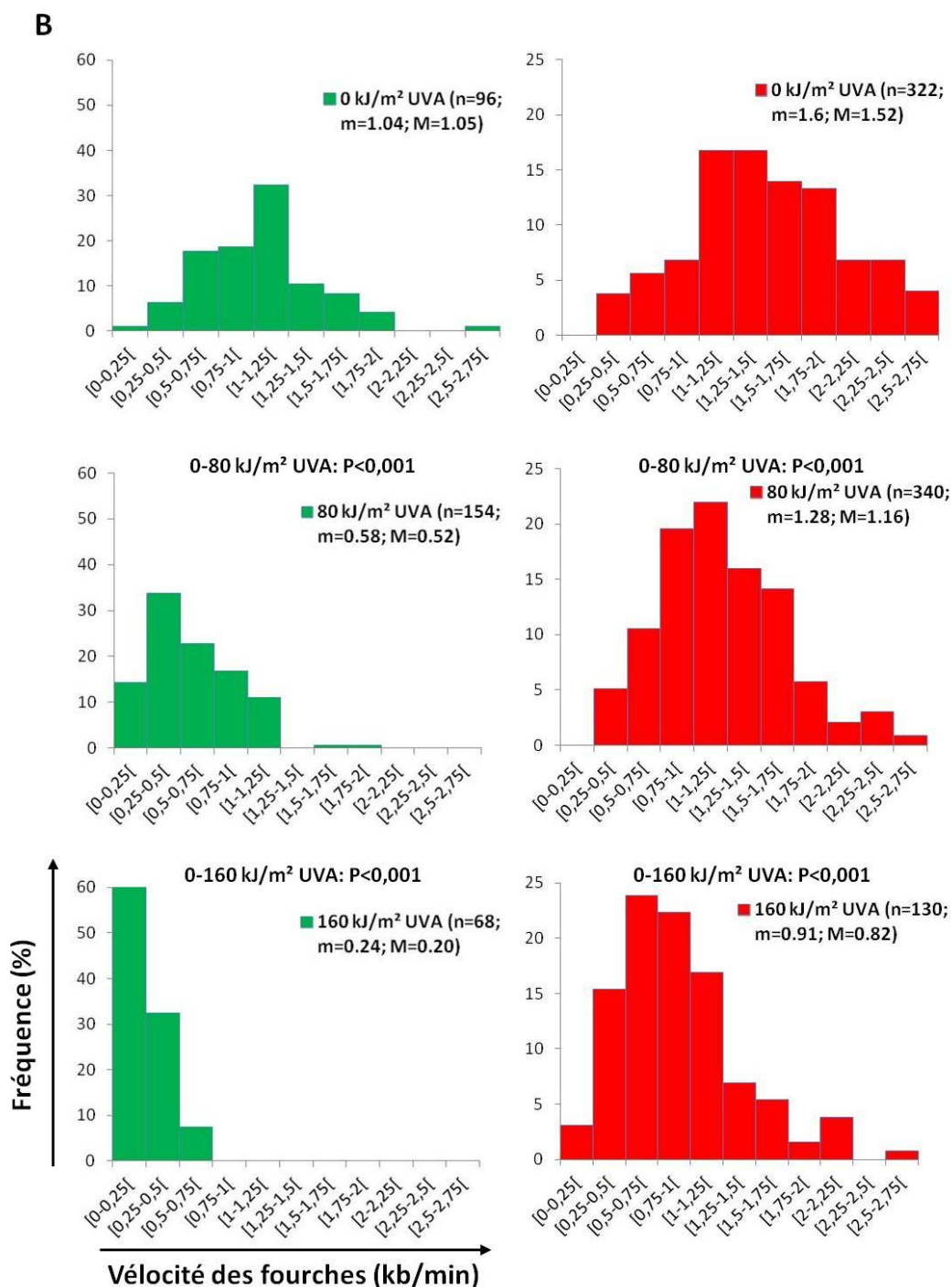


Figure 38.B : Effet du rayonnement UVA sur la vélocité des fourches de réplication immédiatement ou 40 minutes après irradiation.

Des cellules asynchrones MRC5Vi sont exposées ou non à 80 et 160 kJ/m² d'UVA et incubées 40 minutes avec de l'IdU (histogrammes verts), puis avec du CldU (histogrammes rouges) pendant 30 minutes. Les histogrammes représentent la fréquence de fourches (exprimée en %) en fonction de leur vitesse (exprimée en kb/min) par tranche de 0,25 kb/min. Ces données sont représentatives d'au moins deux expériences différentes. n= nombre de signaux analysés ; M=médiane ; m=moyenne. Test Mann Whitney (two-tailed test).

De plus, cette diminution immédiate de la vitesse des fourches de réplication est abolie lorsque des cellules MRC5Vi, asynchrones ou synchronisées en milieu de phase S (condition S4R), sont irradiées dans le milieu MEMi en présence de NaN_3 (Figures 39.A et 39.B), ou lorsque les cellules sont irradiées dans du PBS, c'est-à-dire en absence de photosensibilisateurs (Figure 40). Ces résultats permettent d'affirmer que ce ralentissement des fourches induit par les UVA est dépendant de l'oxygène singulet.

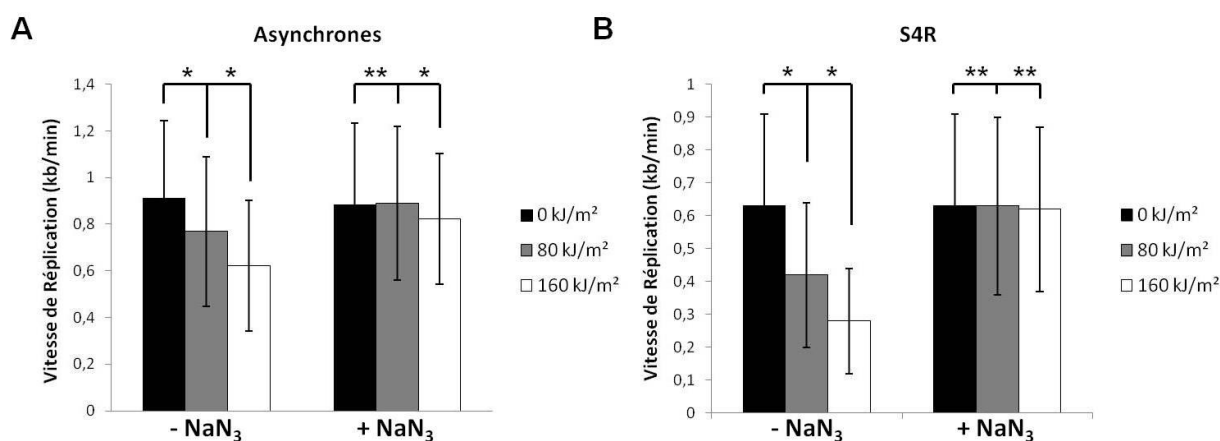


Figure 39 : La présence d'azide de sodium pendant l'exposition aux UVA prévient le ralentissement des fourches de réplication.

Des fibroblastes humains MRC5Vi asynchrones (A) et synchronisées en milieu de phase S (B) sont exposés au rayonnement UVA en présence (+ NaN_3) ou absence (- NaN_3) d'azide de sodium. Immédiatement après l'irradiation, les cellules sont incubées en présence d'IdU pendant 30 minutes, puis de CldU pendant 40 minutes. La vitesse moyenne des fourches de réplication est obtenue à partir des mesures faites sur les signaux CldU. Les données sont issues d'une expérience unique. $n_{(A)} = 1000-3000$ fourches analysées en fonction de la dose ; $n_{(B)} = 900-1700$ fourches analysées en fonction de la dose. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de l'ensemble des vitesses de fourches d'une même condition au sein d'une unique expérience. * : $P < 0,001$ (two-tailed test) ; ** : $P \geq 0,05$ (two-tailed test).

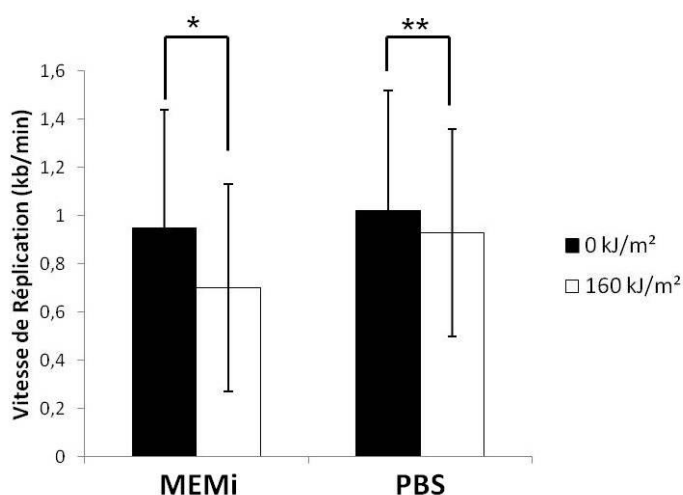


Figure 40 : L'irradiation des cellules dans le PBS limite l'effet des UVA sur le ralentissement des fourches de réplication.

Des fibroblastes humains MRC5Vi synchronisés en milieu de phase S sont exposés au rayonnement UVA dans du milieu MEMi ou du PBS. Immédiatement après l'irradiation, les cellules sont incubées en présence d'IdU pendant 30 minutes, puis de CldU pendant 40 minutes. La vitesse moyenne des fourches de réplication est obtenue à partir des mesures faites sur les signaux CldU. Les données sont issues d'une expérience unique (100-350 fourches analysées). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de l'ensemble des vitesses de fourches d'une même condition au sein d'une unique expérience. * : $P < 0,001$ (two-tailed test) ; ** : $P \geq 0,05$ (two-tailed test).

2. Ralentissement transitoire de la vitesse de fourches

Les données obtenues précédemment (voir figure 38) suggèrent très fortement que l'inhibition de la vélocité des fourches de réplication par les UVA est transitoire. Afin de confirmer ou non ces résultats, une cinétique plus complète de la vitesse de fourches a été réalisée. Pour ce faire, les 2 pulses successifs d'IdU et de CldU (30 minutes chacun) ont eu lieu soit immédiatement, soit 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 4 heures après irradiation de cellules MRC5Vi asynchrones (Figure 41.A). La vitesse moyenne des fourches a été calculée sur la base des signaux CldU. La figure 41.B montre clairement que le rayonnement UVA affecte la progression des fourches de réplication de manière transitoire. En effet, 4 à 5 heures environ après l'irradiation, la vitesse de fourches est restaurée (retour au niveau basal) totalement ou partiellement après une irradiation à 80 et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement.

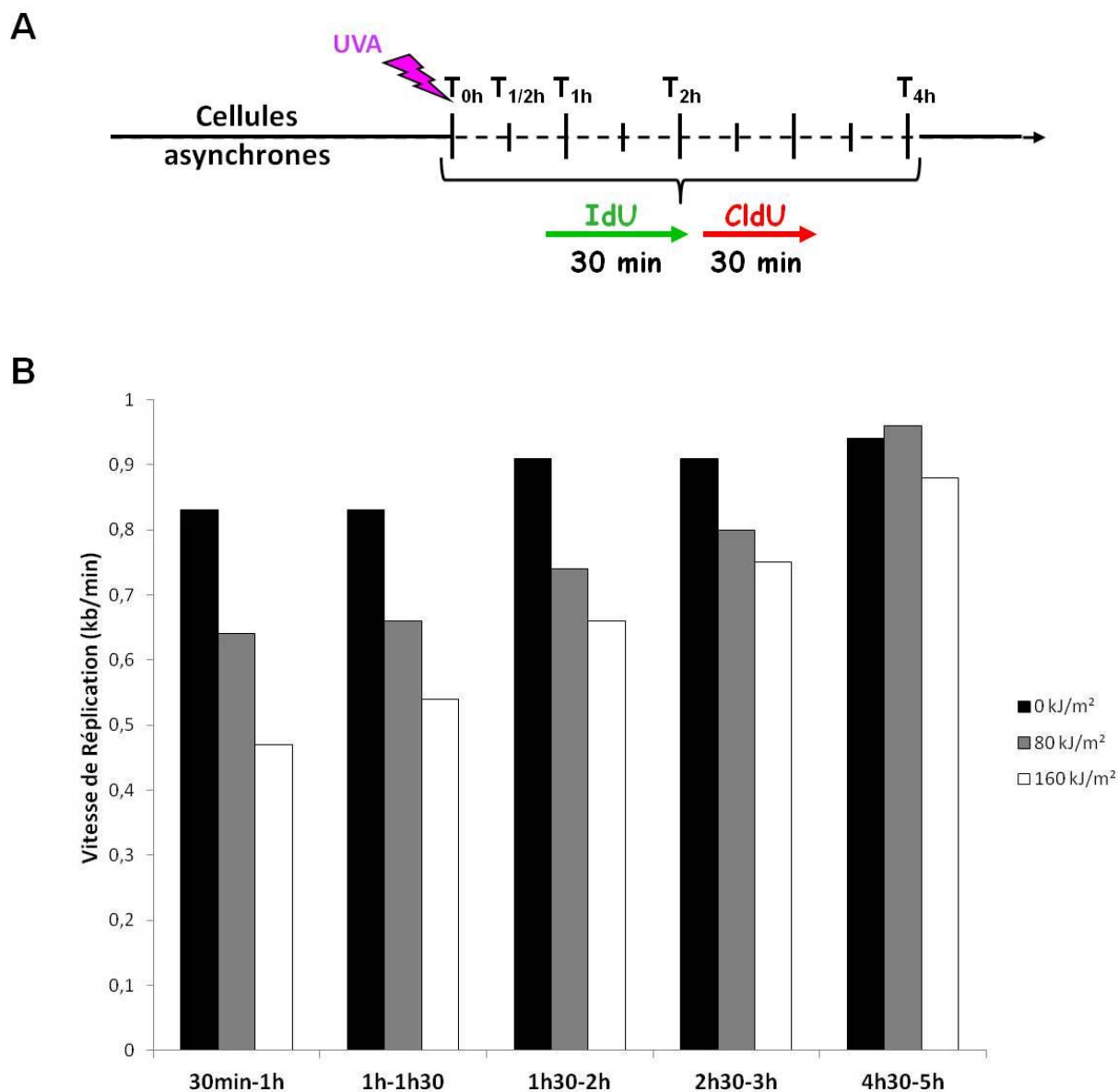


Figure 41 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.

A. Protocole expérimental : des fibroblastes humains MRC5Vi asynchrones ont incorporé de l'IdU (pendant 30 minutes) et du CldU (pendant 30 minutes) soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 4 heures après irradiation aux UVA (80 et 160 kJ/m²).

B. Les données de peignage moléculaire correspondent à la moyenne des vitesses de l'ensemble des fourches d'une même condition, et sont représentatives d'au moins deux expériences. (500-3000 fourches analysées).

A partir de ces données, nous avons cherché à déterminer plus précisément quel temps supplémentaire il faut aux cellules irradiées à une dose de 80 kJ/m² et 160 kJ/m² d'UVA pour terminer leur réplication. Pour ce faire, nous émettons les hypothèses suivantes : 1) le délai de réplication est uniquement dû à un effet sur les vitesses de fourches de réplication et 2) cet effet est transitoire et disparaît complètement 4 à 5 heures après l'irradiation. On a donc reporté, non pas en histogramme mais en nuage de points, les vitesses mesurées en fonction du temps en admettant que la vitesse des fourches est constante au sein du même intervalle de temps (i.e. entre 0 et 30 minutes, ou entre 30 et 60 minutes, etc...) (Figure 42).

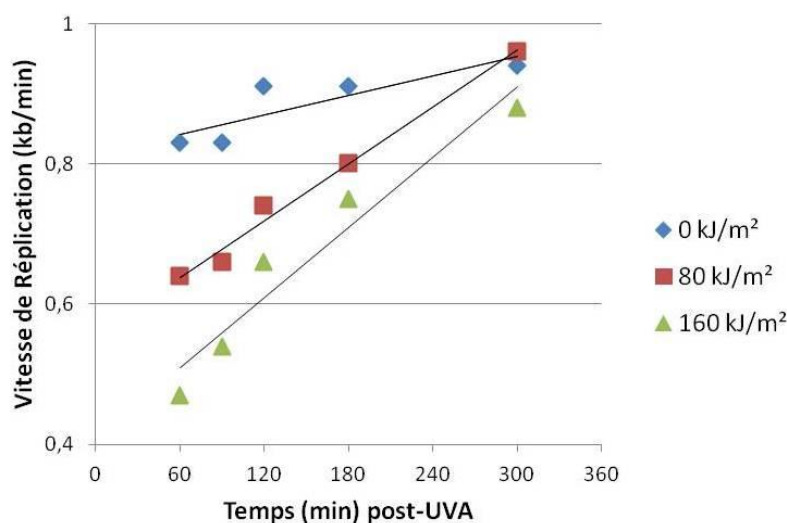


Figure 42 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.

Des fibroblastes humains MRC5Vi asynchrones ont incorporé de l'IdU et du CldU soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 4 heures après irradiation aux UVA (80 et 160 kJ/m²). Les données de ce graphique en nuage de points sont identiques à celles de la figure 41.

Nous avons alors effectué une régression linéaire sur chacune des courbes et obtenues les résultats suivants (Tableau 3) :

Dose	Equation de la régression linéaire	R ²
0 kJ/m ²	$y = 0,0005x + 0.8153$	0,7328
80 kJ/m ²	$y = 0,0014x + 0.5575$	0,9881
160kJ/m ²	$Y = 0,0017x + 0.41$	0,9346

Tableau 3 : Valeurs de l'équation obtenue à partir de la courbe de tendance linéaire.

La régression linéaire est acquise à partir des valeurs de vitesse de fourches en fonction du temps pour chaque dose d'UVA (voir figure 42). y=vélocité (kb/min) ; x=temps (minutes).

A partir de ces droites de régression, nous avons recalculé les valeurs théoriques de vitesse des fourches pour des intervalles de temps de 30 minutes et ce pour un temps total de 300 minutes (Tableau 4).

Vélocité théorique des fourches (kb/min)	0 à 30 min	30 à 60 min	60 à 90 min	90 à 120 min	120 à 150 min	150 à 180 min	180 à 210 min	210 à 240 min	240 à 270 min	270 à 300 min
0 kJ/m² UVA	0,83	0,85	0,86	0,88	0,89	0,91	0,92	0,94	0,95	0,97
80 kJ/m² UVA	0,60	0,64	0,68	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,98
160 kJ/m² UVA	0,46	0,51	0,56	0,61	0,67	0,72	0,77	0,82	0,87	0,92

Tableau 4 : Valeurs théoriques de vitesse des fourches.

Ces valeurs correspondent aux résultats de chacune des équations selon la dose d'UVA et l'intervalle de temps.

Pour chaque intervalle de temps et pour chaque dose d'irradiation, il est alors possible de déterminer la distance parcourue par une fourche de réplique ($d = \text{intervalle de temps} \times \text{vitesse}$), le différentiel de cette distance entre les cellules non irradiées et irradiées [$\Delta d = d(\text{cellules non irradiées}) - d(\text{cellules irradiées})$] et le temps supplémentaire qu'il faudrait aux fourches irradiées pour couvrir la même distance parcourue par une fourche non irradiée ($\Delta t = \Delta d / \text{vitesse}$), l'ensemble de ces valeurs est reporté dans le tableau 5.

Estimation de la distance parcourue (kb)	0 à 30 min	30 à 60 min	60 à 90 min	90 à 120 min	120 à 150 min	150 à 180 min	180 à 210 min	210 à 240 min	240 à 270 min	270 à 300 min
0 kJ/m ² UVA	24,9	25,4	25,8	26,3	26,7	27,2	27,6	28,1	28,5	29,0
80 kJ/m ² UVA	18,0	19,3	20,5	21,8	23,0	24,3	25,6	26,8	28,1	29,3
160 kJ/m ² UVA	13,8	15,4	16,9	18,4	20,0	21,5	23,0	24,5	26,1	27,6

Intervalle de temps (min.)		0 à 30	30 à 60	60 à 90	90 à 120	120 à 150	150 à 180	180 à 210	210 à 240	240 à 270	270 à 300	Différence total de temps (min.)
80 kJ/m ² UVA	Différence de distance (kb)	6,92	6,11	5,30	4,49	3,68	2,87	2,06	1,25	0,44	-0,37	
	Différence de temps (min.)	11,6	9,53	7,76	6,19	4,80	3,55	2,42	1,40	0,47	-0,37	
160 kJ/m ² UVA	Différence de distance (kb)	11,1	10,0	8,92	7,84	6,76	5,68	4,60	3,52	2,44	1,36	105
	Différence de temps (min.)	24,0	19,5	15,8	12,8	10,2	7,93	6,00	4,30	2,81	1,48	

Tableau 5 : Différences de distance et de temps.

A partir de ces données, on propose que le temps supplémentaire qu'il faudrait aux cellules asynchrones irradiées pour terminer leur réplication par rapport à des cellules non irradiées est d'environ 47 et 105 minutes à la dose de 80 kJ/m² et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement. Or, les données de cytométrie de flux montre qu'à la dose de 80 kJ/m² la durée de phase S est augmentée d'environ 2 heures (soit 120 minutes) et à la dose de 160 kJ/m² de 4 heures (soit 240 minutes).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé cette même étude à partir de cellules MRC5Vi synchronisées (S4R). La cinétique de vitesse de fourches en réponse aux UVA confirme les données précédemment obtenues, à savoir que les radiations UVA affectent de manière transitoire la vitesse moyenne des fourches de réplication (Figure 43). Cependant, les temps de récupération sont différents : les vitesses de fourches retournent à leur valeur initiale (niveau basal) au bout de 1h30 et 3 heures environ après irradiation à des doses respectives de 80 et 160 kJ/m² d'UVA (Figure 43). En appliquant la même approche théorique de calcul de vitesse et de distance parcourue en fonction du temps que celle utilisée pour les cellules asynchrones (voir tableaux 3, 4 et 5), on montre que pour des cellules irradiées en S4R, le retard de réplication qui serait imputable seulement aux vitesses de fourches est d'environ 20 et 60 minutes à la dose de 80 et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement.

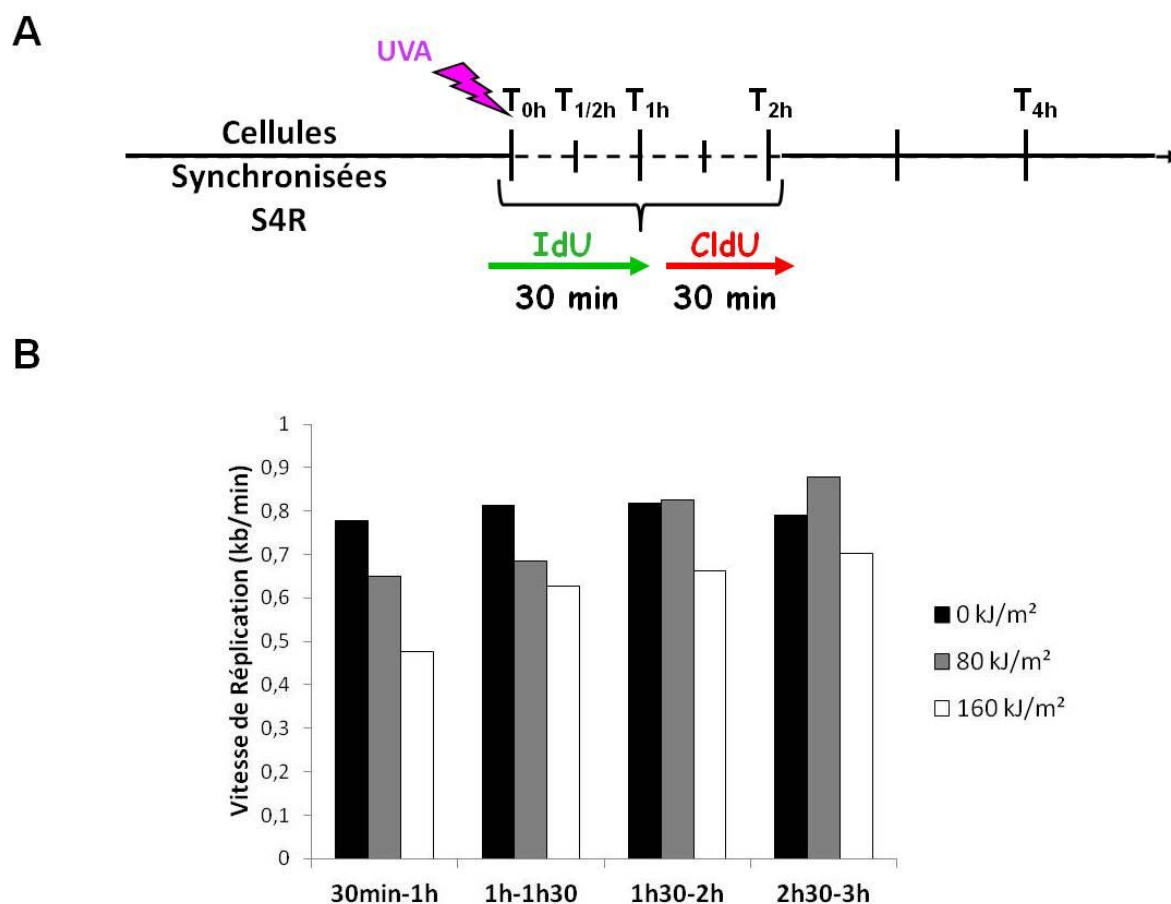


Figure 43 : Le rayonnement UVA réduit transitoirement la vitesse des fourches de réplication.

A. Protocole expérimental : des fibroblastes humains MRC5Vi sont synchronisés en début de phase S par l'APC, exposés aux UVA après 4 heures de relâchement (condition S4R), et cultivés en présence d'IdU puis de CldU soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure ou 2 heures après irradiation aux UVA (80 et 160 kJ/m²).

B. Les données de peignage moléculaire correspondent à la moyenne des vitesses de l'ensemble des fourches d'une même condition, et sont représentatives d'au moins deux expériences. (300-3000 fourches analysées).

En tenant compte de l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent, on peut dresser un premier bilan de l'effet des UVA sur le processus de réplication dans les cellules MRC5Vi, résumé dans le tableau 6 ci-dessous.

Dose d'UVA	0 kJ/m ²	80 kJ/m ²	160 kJ/m ²
Durée de la phase S (mesurée par cytométrie de flux sur cellules asynchrones, en S0R, en S4R :	8h	10h	12h
Différence entre cellules irradiées et non irradiées :		+2h	+4h
Vélocité des fourches en absence d'UVA (kb/min) :			
1- cellules asynchrones	0.8 – 1.6*	n/a	n/a
2- cellules S4R	0.6 – 1*	n/a	n/a
Temps de récupération des vitesses de fourches après UVA :			
1- cellules asynchrones	0h	4h	5h30**
2- cellules S4R	0h	2h	3h40***
Retard global de la phase S si dû uniquement aux vitesses de fourches :			
1- cellules asynchrones	0h	0h47 [#]	1h45 [#]
2- cellules S4R	0h	0h18 ^{##}	1h02 ^{##}

Tableau 6 : Récapitulatif des différents paramètres de la réplication obtenus.

* Valeurs minimale et maximale observées entre plusieurs expériences ; **Extrapolation à partir des données de la figure 42 ; ***Extrapolation à partir des données de la figure 43 ; [#]D'après les données du tableau 5 ; ^{##}D'après les données de la figure 43 ; n/a : non applicable.

L'information principale qui ressort de ce tableau est que le retard global de la phase S induit par les UVA ne peut pas s'expliquer uniquement par un effet sur les vitesses de fourches. En effet, à la dose de 80 kJ/m² d'UVA on observe un délai de phase S d'environ 2 heures (données de cytométrie de flux) alors que l'effet transitoire des UVA sur les vitesses n'allongerait la durée de cette phase que d'environ 20 minutes, et 50 minutes, si on considère respectivement les cellules S4R et asynchrones (voir tableau 6). Pour expliquer une telle différence, on peut donc penser que les UVA affectent aussi la densité de fourches. L'autre information qui ressort de ce tableau, et qui est directement reliée à la précédente, tient au fait que le temps de récupération des vitesses après UVA est plus court lorsque les cellules irradiées sont en pleine phase S (condition S4R) que lorsque celles-ci sont en asynchrones.

3. Mesure de la symétrie/asymétrie

Une autre information importante qui peut-être extraite des mesures de vitesse de fourches concerne la symétrie ou asymétrie des fourches divergentes issues d'une même origine. En effet, la présence ou non de dommages bloquants après UVA, tels que les cassures simples brins, les CPDs ou les adduits ADN-protéines (Epe, 2012), peuvent être une source d'obstacles au regard de la processivité des ADN polymérases (Locatelli et al, 2010 ; Parplys et al, 2012), et de ce fait, ralentir temporairement ces dernières jusqu'à ce que soit éliminé ces dommages (voir Introduction, II.C). Pour répondre à cette interrogation, des MRC5Vi asynchrones sont irradiées à la dose la plus élevée d'UVA (160 kJ/m²), puis cultivées séquentiellement avec de l'IdU et du CldU soit immédiatement, soit 4 heures post-UVA. Dans cette étude, seuls les événements comportant deux fourches divergentes issues d'une même origine ont été pris en compte. L'ensemble des rapports entre la vitesse de deux fourches issues d'une même origine est classé en intervalles, comme le démontre la figure 44. En comparaison avec l'échantillon non irradié, une dose de 160 kJ/m² d'UVA augmente d'environ 20% la proportion de fourches asymétriques (classe $\leq 0,6$) immédiatement après irradiation, c'est-à-dire au cours des 30 premières minutes (marquage IdU, Figure 44.A). Par contre, aucune différence significative n'est constatée entre les cellules irradiées et non irradiées que ce soit 30 minutes post-UVA (marquage CldU, Figure 44.A) ou 4 heures post-UVA (marquages IdU et CldU, Figure 44.B).

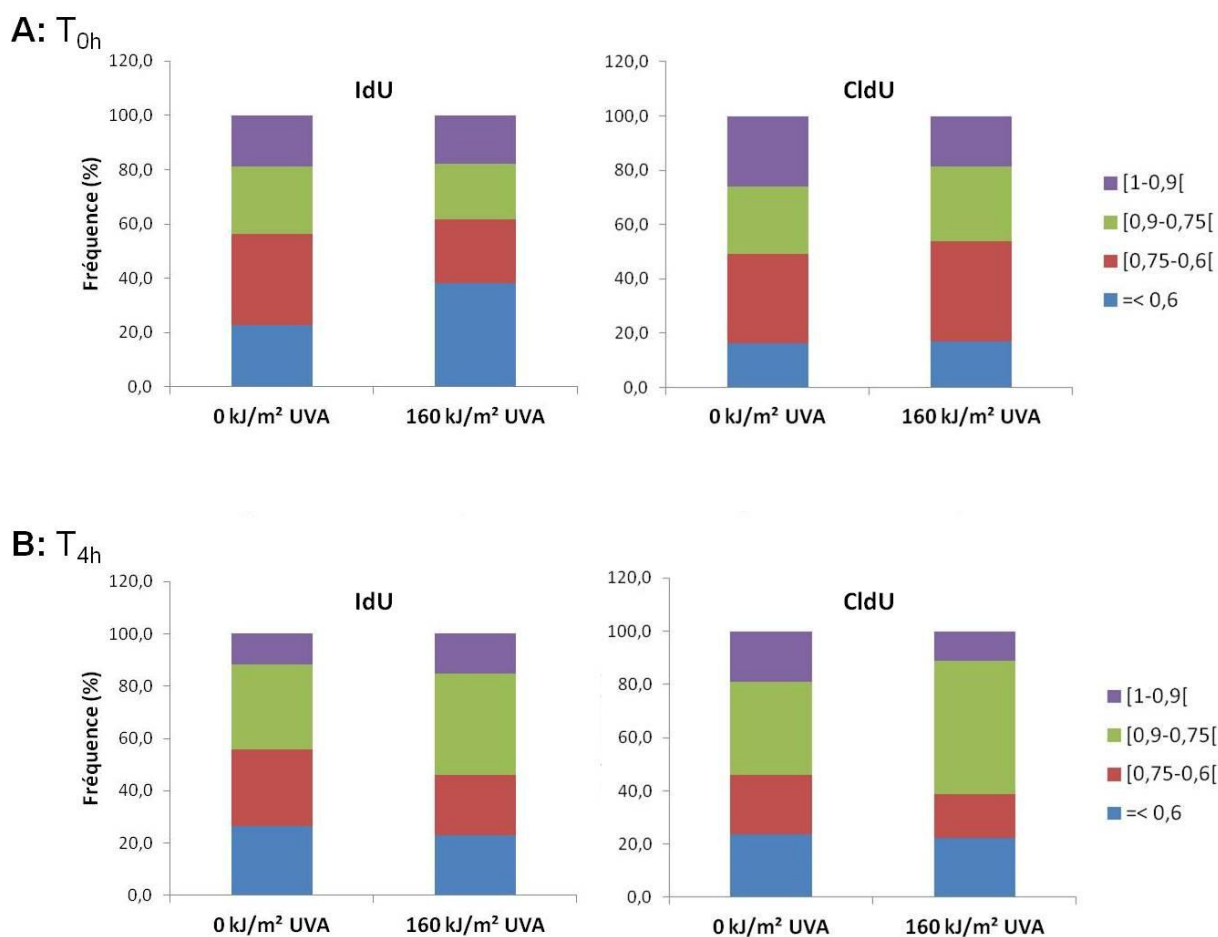


Figure 44 : Distribution de la symétrie et asymétrie des fourches après irradiation.

Des fibroblastes humains transformés MRC5Vi sont irradiés ou non à 160 kJ/m² d'UVA dans du MEMi, puis sont marqués successivement avec de l'IdU (30 minutes) et du CldU (30 minutes), soit immédiatement (A), soit 4 heures post-UVA (B). L'intervalle [1-0,9] indique une très forte symétrie alors que l'intervalle =< 0,6 indique une très forte asymétrie. Ces données sont issues d'une unique expérience. 13 à 161 paires de fourches analysées.

C. Conclusion

L'absence d'asymétrie de fourches 4 heures après l'irradiation UVA suggère très fortement l'absence de lésions à l'ADN qui seraient bloquantes pour la machinerie de réplication, ce qui confirme les résultats précédemment publiés (Girard et al, 2008). Même si on observe une augmentation de l'asymétrie de quelques fourches de réplication immédiatement après UVA, celle-ci est très transitoire puisque 30 minutes post-UVA la différence dans la vitesse des deux fourches divergentes s'estompent. Puisque l'on sait à partir des données de vitesse présentées dans la paragraphe précédent que celles-ci diminuent après UVA pour revenir à leur état basal plusieurs heures plus tard, on peut donc en conclure que la ou les cible(s) des radiations UVA n'est probablement pas directement la fourche de réplication ou l'ADN *per se* mais probablement un (ou des) facteur(s) qui, en agissant en *trans*, contribue(nt) à la progression normale des fourches de réplication.

Puisque les vitesses de fourche ne sont que transitoirement altérées par le rayonnement UVA, nous nous sommes demandés si la cause principale ne pouvait pas être une altération du pool de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs).

III. Evaluation du contenu intracellulaire en dNTPs après exposition aux UVA

A. Contexte

Une des explications plausibles à ce ralentissement de la progression des fourches de réplication serait un défaut du pool de dNTPs suite à une altération de la biosynthèse des dNTPs et/ou des modifications oxydatives des dNTPs en réponse aux radiations UVA. En effet, il est connu depuis longtemps qu'une dérégulation du pool de nucléotides affecte la vitesse de progression des fourches de réplication (Poli et al, 2012). Afin d'étayer cette hypothèse, une collaboration avec Jérôme Guitton (Laboratoire de pharmaco-toxicologie, CH, Lyon) a été établie afin de doser les dNTPs par HPLC (High Performance Liquid) couplée à de la spectrométrie de masse [HPLC-MS ; (Cohen et al, 2010 ; Cohen et al, 2009)] selon le protocole détaillé dans la partie « matériel et méthodes ».

B. Résultats

1. Mesure du niveau d'expression des dNTPs immédiatement après exposition aux UVA

Afin de corrélérer les niveaux d'expression de chacun de 4 dNTPs aux vitesses de fourches de réplication, et ce en fonction du temps et de la dose d'UVA, nous avons choisi de travailler, pour cette étude, uniquement avec des cellules synchronisées. Des cellules MRC5Vi synchronisées à l'APC et relâchées pendant 4 heures dans du milieu frais sans APC (condition S4R) sont exposées à 80 et 160 kJ/m² UVA dans du milieu MEMi en présence ou non d'azide de sodium. Immédiatement après irradiation, les échantillons sont congelés pour être analysés. Le résultat de cette analyse est présenté dans la figure 45. Tout d'abord, on observe que les niveaux d'expression de chacun des 4 dNTPs (exprimés en pmoles/10⁶ cellules) convergents tout à fait avec ceux de la littérature (Chen et al, 2009 ; Decosterd et al, 1999 ; Ferraro et al, 2010 ; North et al, 1980 ; Song et al, 2003). En effet, quelque soit le type cellulaire, la quantité intracellulaire de chacun des dNTPs suit la décroissance suivante : [TTP] > [dATP] > [dGTP] ≈ [dCTP]. En réponse au rayonnement UVA, on ne voit pas une modification spectaculaire du niveau basal de chacun des 4 dNTPs. Néanmoins, on observe de façon reproductible d'une expérience à l'autre, une légère augmentation du niveau basal des dNTPs en réponse aux UVA (Figure 45). De façon

intéressante, l'ajout de NaN_3 dans le milieu d'irradiation empêche cette faible augmentation (Figure 45).

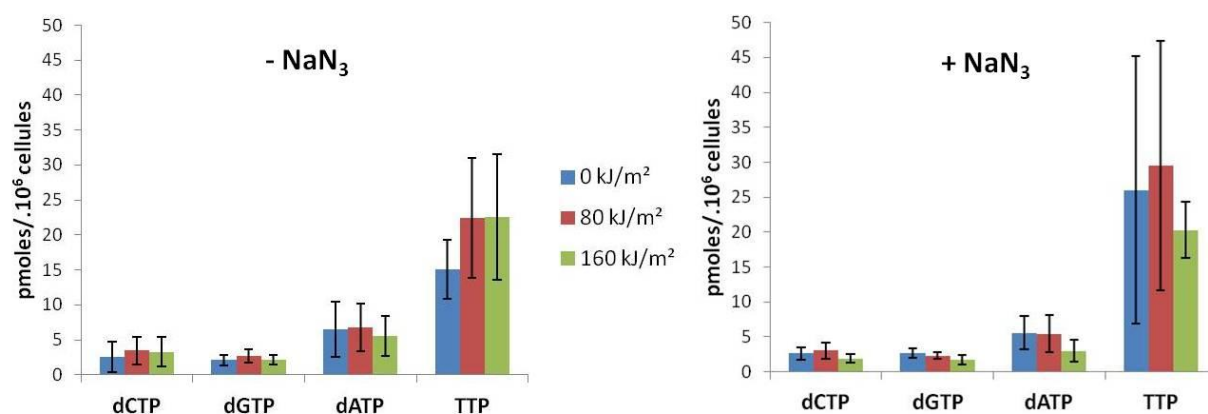


Figure 45 : Effet du NaN_3 sur le niveau intracellulaire de chacun des dNTPs immédiatement après UVA.

Des fibroblastes MRC5Vi synchronisés en milieu de phase S sont exposés aux radiations UVA (80 et 160 kJ/m^2), en absence ($-\text{NaN}_3$) ou en présence de NaN_3 ($+\text{NaN}_3$). Ensuite, les cellules sont rapidement recueillies, resuspendues dans du méthanol et plongées dans de l'azote liquide. Ensuite, les échantillons sont analysés par HPLC-MS. Les valeurs correspondent à la moyenne de quatre expériences.

2. Diminution transitoire et modérée des dNTPs

Pour déterminer le devenir du pool intracellulaire de chacun des dNTPs après UVA, nous avons établi une cinétique avec une fenêtre de temps de 4 heures qui correspond à la période pendant laquelle les vitesses de fourches retournent à la normale (voir tableau 6). En absence d'UVA, nous constatons une légère augmentation du niveau d'expression des dNTPs dès 30 minutes ($\times 1,3-1,7$), puis un retour à des valeurs normales au bout de 2 heures (Figure 46). Cet effet reflète probablement la remise en culture. Effectivement, le fait d'induire un choc thermique (passage des cellules de température ambiante à 37°C) peut engendrer une activation du métabolisme cellulaire telle que la voie de biosynthèse des dNTPs.

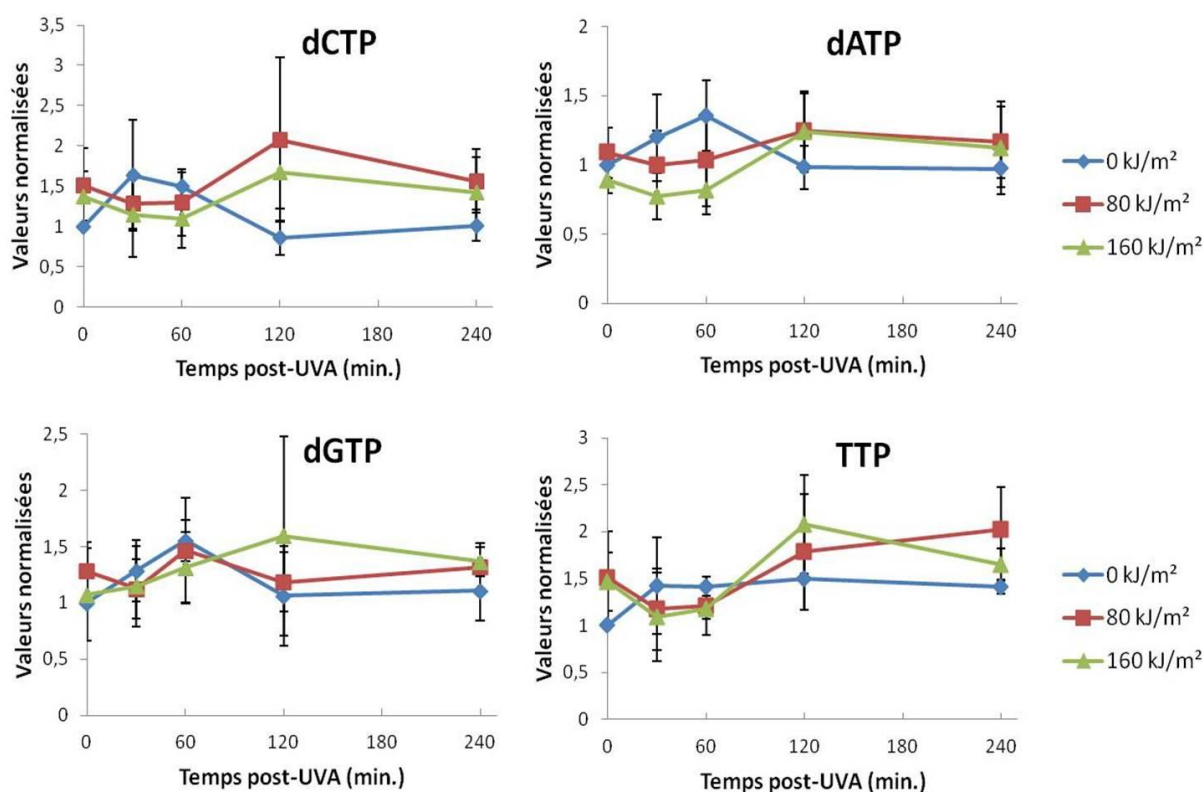


Figure 46 : Le pool de dNTPs est transitoirement et modérément réduit après UVA.

Des fibroblastes humains MRC5Vi sont synchronisés en début de phase S par l'APC et exposés à 80 ou 160 kJ/m² d'UVA après 4 heures de relâchement (condition S4R). Les échantillons sont récoltés soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure et 2 heures après UVA. Le dosage est réalisé par HPLC-MS. Les données ont été normalisées par rapport à la valeur obtenue pour chacun des dNTPs au temps 0 et en absence d'irradiation. Ces données correspondent à la moyenne de trois expériences.

En réponse au rayonnement UVA, on observe l'effet inverse de ce qui a été décrit pour les cellules non irradiées à savoir une légère diminution dès 30 minutes du niveau d'expression de chacun des 4 dNTPs, avec un effet plus prononcé pour le dATP, puis un retour à des valeurs basales au bout de 2 heures (Figure 46). Même si les différences ne semblent pas significatives, elles sont reproductibles d'une expérience à l'autre. La variabilité observée des données brutes d'une expérience à l'autre peut en partie s'expliquer par la réponse du détecteur de l'HPLC-MS qui fluctue d'une période à l'autre (performance de la colonne d'extraction, composition des autres phases mobiles injectées sur l'appareil, ...), surtout pour ce type de méthode.

Afin de déterminer si ces variations sont bien dues aux ROS produites par le rayonnement UVA, les cellules ont été irradiées en présence de NaN_3 et les dNTPs dosés immédiatement, 30 minutes ou 1 heure post-UVA. Dans ces conditions, on n'observe plus, dans le temps, de diminution de la quantité de dCTP, dGTP et TTP ce qui fait que 30 minutes après UVA, les quantités sont les mêmes que les cellules aient été irradiées en présence de NaN_3 ou non (Figure 47). En ce qui concerne le dATP, on observe toujours une légère différence entre cellules irradiées en présence de NaN_3 et cellules non irradiées, mais cette différence disparaît complètement 1 heure après UVA (Figure 47). L'ensemble de ces données suggèrent vraisemblablement que les UVA, *via* la production de ROS, affectent transitoirement et modestement le pool de dNTPs. Il est à noter que, à ce jour, nous n'avons pas été capables de doser la 8-oxo-2'-désoxyguanosine-5'-triphosphate (8-oxo-dGTP), l'un des produits majeurs de l'oxydation des bases par les UVA (Cadet et al, 2009).

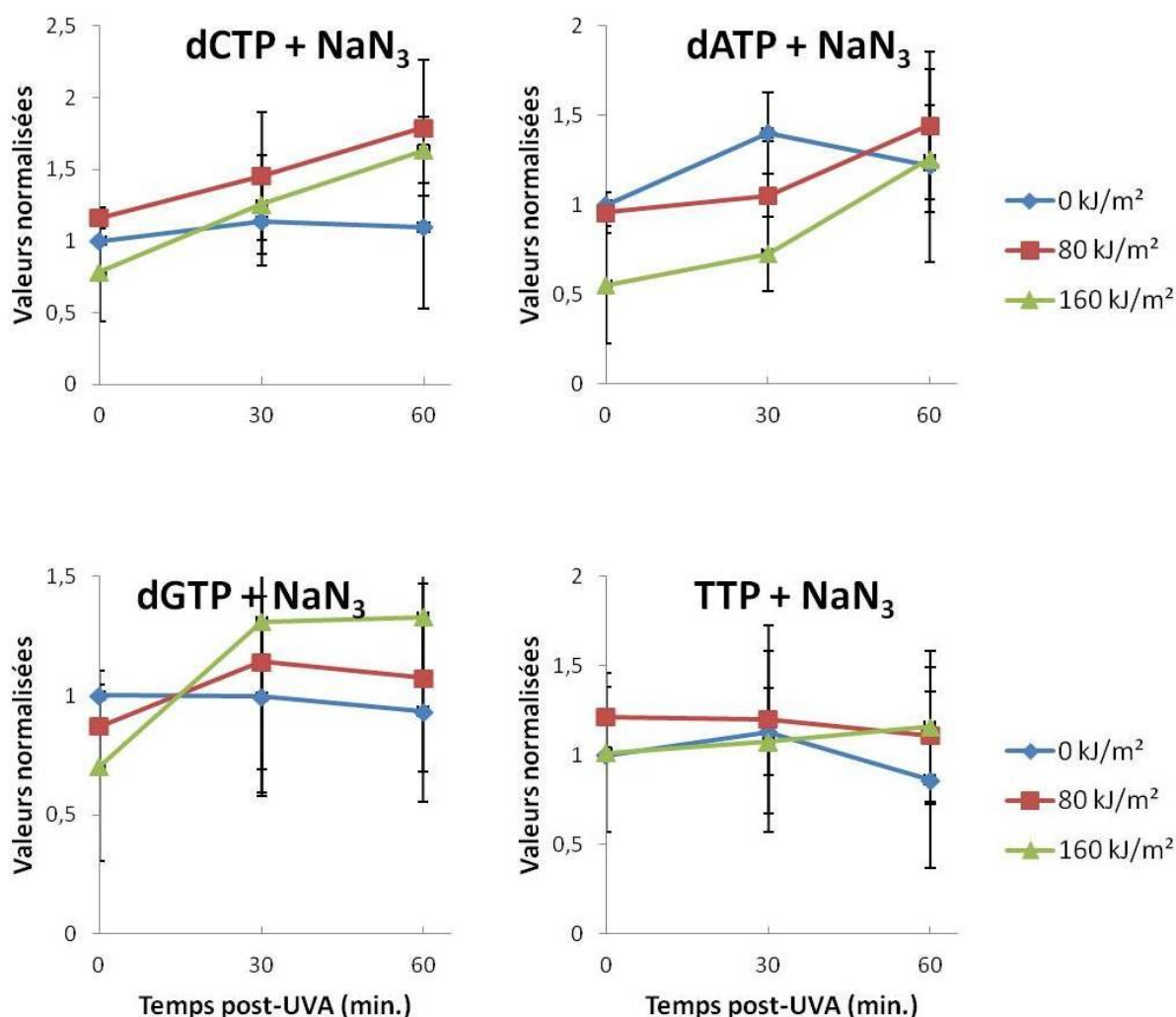


Figure 47 : Effet protecteur du NaN₃ sur les niveaux intracellulaires des 4 dNTPs durant une exposition aux UVA.

Des cellules MRC5Vi synchronisées (S4R) sont exposées ou non à 80 et 160 kJ/m²d'UVA en présence de NaN₃, puis sont remises en culture pendant des périodes définies. Pour chaque temps (0, 30 minutes et 1 heure), le niveau intracellulaire de chacun des dNTPs est dosé par HPLC-MS. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences.

3. Effet de la complémentation en nucléosides sur le retard de réplication induit par les UVA

En tenant compte des données précédentes, nous nous sommes alors demandés si la dérégulation, même faible et transitoire, du pool de dNTPs pouvait affecter la vitesse de progression des fourches de réplication. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons choisi de compléter les cellules en ribonucléosides immédiatement après irradiation et de mesurer la vélocité des fourches dans ces conditions. Dans un premier temps, les cellules sont incubées en absence ou en présence d'une concentration équimolaire de 100 μM de chacun des 4 ribonucléosides *i.e.* adénosine (A), guanosine (G), cytidine (C) et uridine (U) pendant 10 et 30 minutes, temps au bout desquels la quantité de dNTPs intracellulaires est dosée par HPLC-MS. Les ribonucléosides sont choisis car les formes mono-, di- et triphosphates de ces sous-précurseurs de nucléotides (dNMPs, dNDPs et dNTPs) ne pénètrent pas dans les cellules (Reichard, 1988). Par contre, les ribonucléosides traversent la membrane cellulaire par diffusion facilitée, puis sont convertis en désoxyribonucléosides par l'action de la ribonucléotide réductase (RNR), et ces derniers sont rapidement phosphorylés par des désoxyribonucléosides kinases (Reichard, 1988). Tout d'abord, on observe une augmentation significative de la quantité de chacun des quatre dNTPs (d'un facteur 1,4 à 4) lorsque les cellules sont incubées en présence de ribonucléosides, même si cette augmentation est similaire après 10 et 30 minutes d'incubation (Figure 48). Ensuite, on constate que le fait d'incuber les cellules avec 100 μM en ribonucléosides ne modifie pas la quantité intracellulaire relative d'un nucléotide par rapport à l'autre à savoir que $[\text{TTP}] \geq [\text{dGTP}] > [\text{dATP}] > [\text{dCTP}]$. Ces résultats suggèrent que la cellule régule l'import en nucléosides extracellulaires pour maintenir un équilibre dans le pool intracellulaire de dNTPs. Enfin, il est à noter que la concentration de 100 μM (soit environ 10^{17} en chaque nucléoside) permet de fournir à la cellule toute la quantité en dNTPs dont elle a besoin pour répliquer l'intégralité de son ADN. Partant de ces observations, nous avons décidé de déterminer les vitesses de fourches dans les cellules MRC5Vi exposées aux UVA et immédiatement remises en culture en présence successivement d'IdU, G, A et C puis de CldU, G, A et C à des concentrations équimolaires. De manière intéressante, l'addition de ribonucléosides après UVA permet de restaurer partiellement une vitesse de fourches dans les cellules irradiées proche de celle mesurée dans les cellules non irradiées, au moins pour la dose la plus faible (Figure 49). Bien que ce résultat soit issu d'une seule expérience, et reste donc à confirmer, il tend à montrer le lien étroit entre une dérégulation du pool de dNTPs et le ralentissement de la vitesse de fourches après UVA.

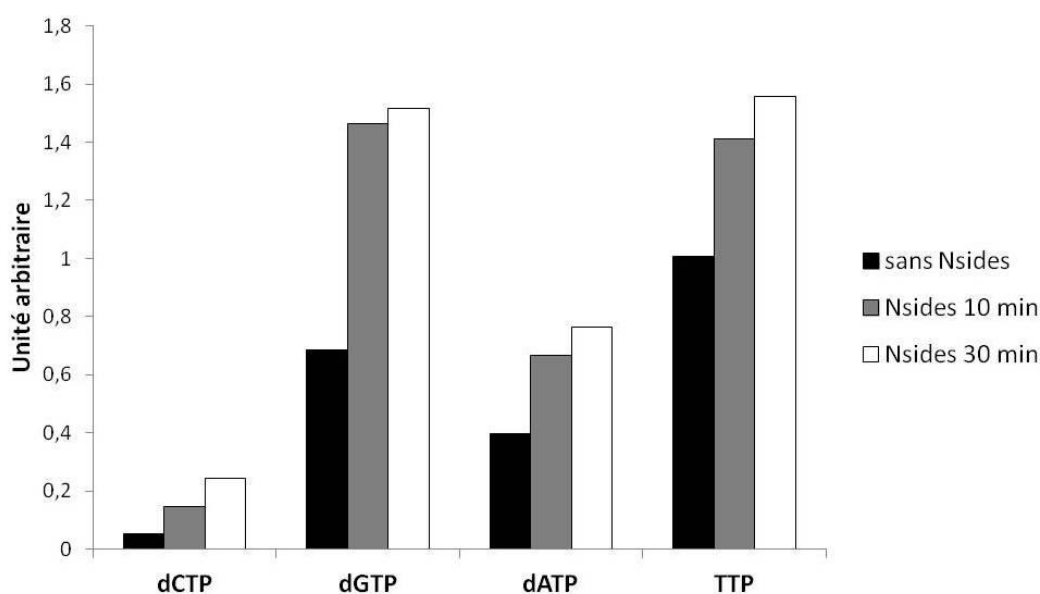


Figure 48 : Complémentation en ribonucléosides dans des fibroblastes MRC5Vi.

Des cellules MRC5Vi synchronisées (S4R) sont incubées 10 ou 30 minutes en présence d'une concentration équimolaire de ribonucléosides (100 μ M). Ensuite, les échantillons sont dosés par HPLC-MS. Les valeurs résultent d'une unique expérience. Nsides = ribonucléosides.

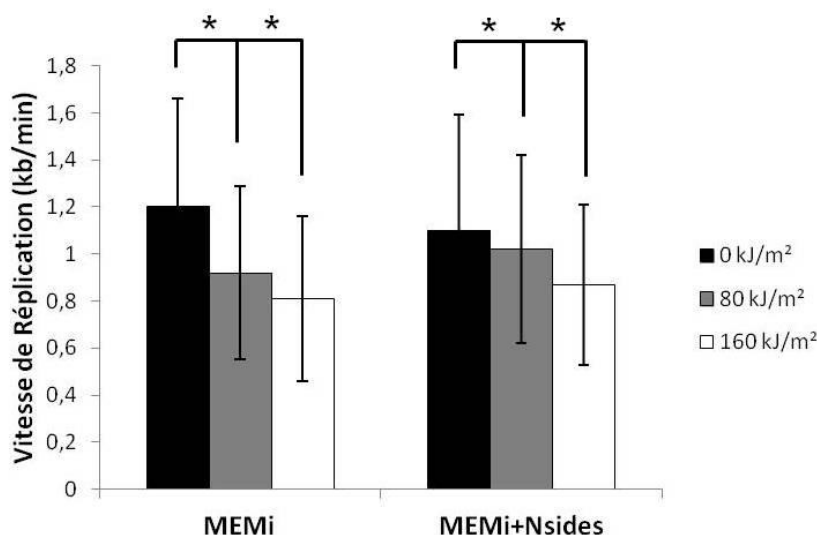


Figure 49 : Complémentation en ribonucléosides restaure partiellement l'élongation de la réplication après UVA.

Des cellules MRC5Vi asynchrones sont exposées ou non aux UVA (80 et 160 kJ/m²), puis incubées séquentiellement avec de l'IdU et du CldU plus ou moins adénosine, cytosine et guanosine à une concentration finale de 100 μ M. Ces données résultent d'une unique expérience (100-450 fourches analysées). Nsides = ribonucléosides. * : P<0,001 (two-tailed test).

Nous avons alors estimé l'impact de cette complémentation sur la réplication globale de l'ADN par cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules synchronisées en milieu de phase S (condition S4R) sont irradiées et immédiatement remises en culture pendant 4 heures en présence des 4 ribonucléosides avant d'être trypsinées. L'analyse par cytométrie en flux montre que l'ajout des ribonucléosides dans le milieu de culture après UVA ne permet pas de compenser le retard de réplication induit par les UVA (Figure 50).

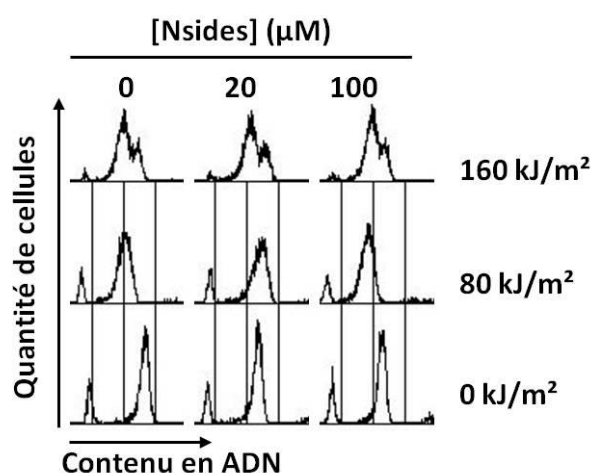


Figure 50 : Complémentation en ribonucléosides ne protège pas la réplication d'un retard après UVA.

Des MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S sont irradiées ou non aux UVA, puis remises 4 heures en culture en présence de 20 ou 100 μM de ribonucléosides (Nsides). Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les données sont issues d'une seule expérience.

C. Conclusion

Les résultats montrent que le rayonnement UVA induit une diminution modeste et transitoire du pool de dNTPs intracellulaires, qui est dépendante des ROS. La complémentation en ribonucléosides ne semble pas suffisante pour restaurer une vitesse normale de fourches immédiatement après UVA, ainsi que la réplication dans sa totalité, telle qu'elle est mesurée par cytométrie en flux. Même s'il pourrait exister une corrélation entre la quantité de dNTPs intracellulaires et la vitesse de fourches, ces données renforcent l'idée que le retard réplcatif induit par les radiations UVA ne s'explique pas seulement par un ralentissement de la phase d'élongation *via* le pool de dNTPs.

Aucune donnée ne nous permet de connaître l'origine de la diminution transitoire en dNTPs après UVA : soit les acteurs de la synthèse des dNTPs sont transitoirement inactivés et/ou les UVA oxydent le pool de dNTPs. Pour tester cette dernière hypothèse, nous avons cherché à doser la 8-oxodGTP dans les cellules comme marqueur biologique de stress oxydatif (Ilyasova et al, 2012 ; Loft et al, 2008). Malheureusement, les dosages n'ont pas été satisfaisants puisque les valeurs obtenues par HPLC-MS étaient supérieures à celle du dGTP intracellulaire, même en absence d'UVA (Guitton et Girard, données non montrées). En absence de stress exogène, le niveau intracellulaire de dGTP doit être 10 fois plus élevé que celui de la 8-oxodGTP (Fotouhi et al, 2011). Nous en avons conclu qu'il y a un problème de spécificité, probablement dû à une contamination par les ribonucléotides triphosphates (rGTP en particulier). La mise au point de cette technique, pour l'analyse des pools oxydés, doit être faite au laboratoire de J. Guitton avant de mettre en évidence une potentielle modification oxydative du pool par les UVA.

IV. Etude de la densité des fourches de réplication après irradiation aux UVA

A. Contexte

Les précédentes données obtenues à partir des analyses par cytométrie de flux et par peignage moléculaire (vitesse de fourches) ont démontré que le rayonnement UVA retarde fortement la réplication de l'ADN alors que la progression des fourches est altérée transitoirement. D'un point de vue quantitatif, ces résultats suggèrent donc que la vitesse de fourches n'est pas l'unique cause à ce retard de réplication induit par les UVA. A partir de résultats obtenus avec des fibroblastes humains transformés MRC5Vi, nous émettons l'hypothèse que les UVA induisent aussi une diminution du nombre d'origines actives. D'autres arguments sont en faveur de cette hypothèse. Ces arguments sont issus de données, présentées brièvement ci-dessous, qui furent obtenues à partir d'expériences réalisées avec des fibroblastes primaires humains de poumon (MRC5) et de peau (NHSF).

Tout d'abord, nous avons comparé la viabilité cellulaire des cellules primaires (MRC5) et transformées (MRC5Vi) en réponse à des doses croissantes d'UVA. On constate que les fibroblastes primaires sont légèrement plus sensibles aux UVA que ne le sont les cellules

transformées (Figure 51). En effet, l'IC₅₀ est à environ 80 kJ/m² d'UVA pour les MRC5 et 160 kJ/m² pour les MRC5Vi.

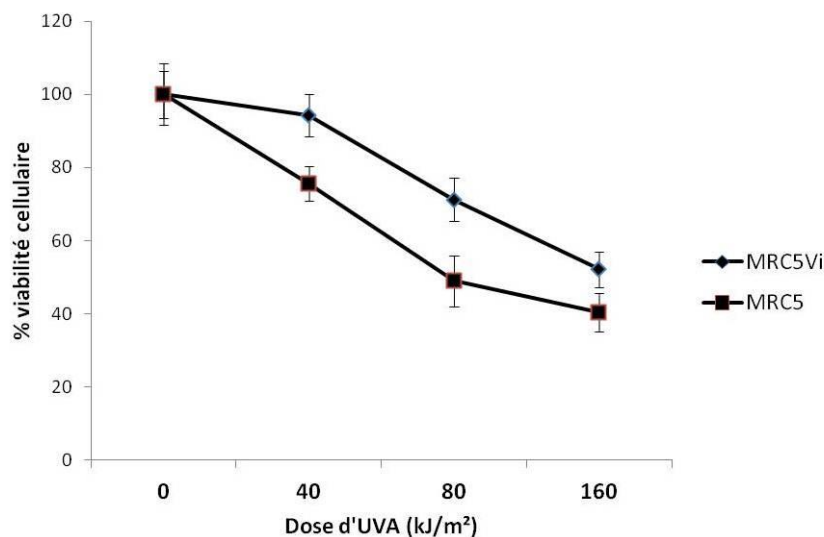
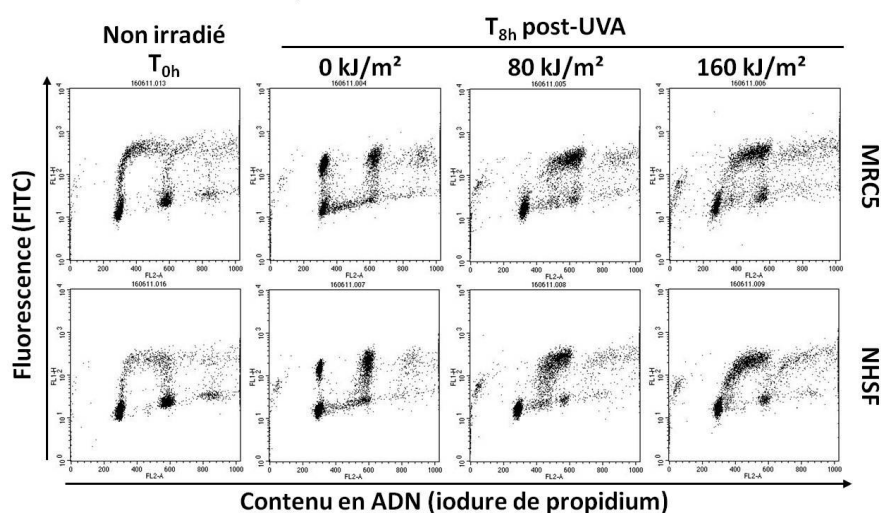


Figure 51 : Viabilité cellulaire des fibroblastes transformés MRC5Vi et primaires MRC5 en réponse aux radiations UVA.

Des fibroblastes humains transformés MRC5Vi et primaires MRC5 sont exposés ou non aux UVA (0, 40, 80, 160 kJ/m²), et remis en culture pendant 72 heures. La mesure de la viabilité se fait *via* un test MTT. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences.

Nous avons aussi analysé le cycle cellulaire des fibroblastes primaires MRC5 et NHSF par cytométrie de flux en réponse aux UVA. L'étude du devenir des cellules MRC5 et NHSF asynchrones préalablement marquées au BrdU, puis exposées aux UVA, atteste également d'un retard de réplication qui dépend de la dose d'UVA (Figure 52.A) et de la production de ROS, puisque celui-ci est abolit si l'irradiation des cellules se fait en MEMi contenant du NaN₃ ou en PBS (Figure 52.B). Il est intéressant de noter que la durée de la phase S dans ces fibroblastes primaires est similaire, environ 8 heures, à celle déjà observée avec les lignées MRC5Vi transformées. Par contre, et contrairement aux MRC5Vi, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux montre un blocage des cellules en G1 après UVA (données préliminaires), attestant que les MRC5 et les NHSF possèdent un point de contrôle G1/S (Figure 52).

A: BrdU → UVA → FACS à temps T



B: BrdU → UVA → FACS à T_{8h}

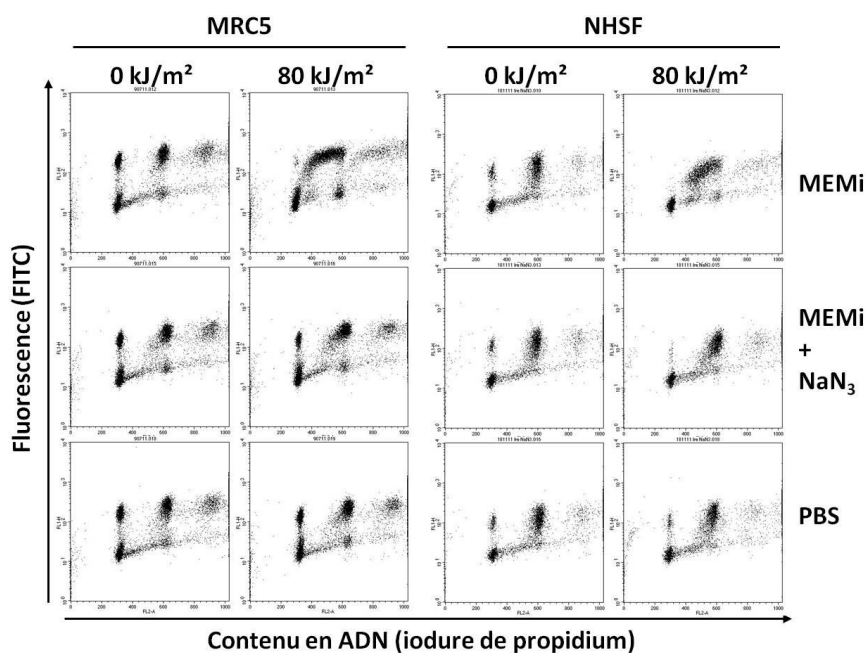


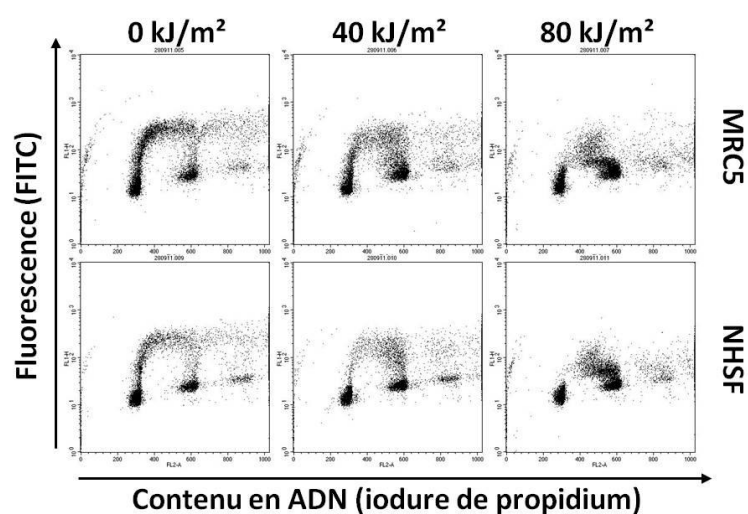
Figure 52 : Ralentissement de la phase S dans des cellules primaires asynchrones dépend des ROS générées par les UVA.

A. Des fibroblastes humains primaires MRC5 et de peau NHSF asynchrones ont incorporé du BrdU pendant 30 minutes, puis sont irradiés dans du MEMi à 80 et 160 kJ/m² UVA. Les cellules sont récoltées soit immédiatement, soit 8 heures post-irradiation. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

B. Les fibroblastes humains MRC5 et NHSF asynchrones sont incubés 30 minutes avec du BrdU, puis exposés à 80 kJ/m² d'UVA, en présence ou non de NaN₃ ou dans du PBS. 8 heures post-irradiation, les cellules sont récoltées. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont représentatifs de deux expériences différentes.

De plus, lorsque nous examinons l'état réplcatif de ces cellules 8 heures post-UVA, c'est-à-dire lorsque le BrdU est ajouté 8 heures après l'irradiation, nous observons une perte d'amplitude du signal BrdU qui est dépendante de la dose (Figure 53.A). Cette perte d'amplitude signifie que moins de BrdU a été incorporé dans l'ADN cellulaire après UVA. Une cinétique comprenant des temps intermédiaires a révélé que cette perte d'amplitude est immédiate, dès la fin de l'irradiation et se maintient 8 heures après l'irradiation (Figure 53.B). En fait, et pour être plus précis, dès le temps 4 heures post-UVA on observe deux populations de cellules en phase S : une population avec un contenu en BrdU « moyen » (BrdU^m) et une population avec un contenu en BrdU « faible » (BrdU^f). La première population correspond à des cellules qui étaient en phase G1 au moment de l'irradiation et la deuxième aux cellules qui étaient en phase S au moment de l'irradiation (Figure 53.B). Le profil de cytométrie au temps 8 heures post-UVA montre très nettement que la cinétique de réplcation des cellules BrdU^f est plus lente que la cinétique de réplcation des cellules BrdU^m . Cette observation avait déjà été faite avec les cellules transformées, mais la différence entre les deux populations était moins marquée (voir figure 31.B).

A: UVA → BrdU à T_{8h} → FACS



B: UVA → BrdU à temps T → FACS

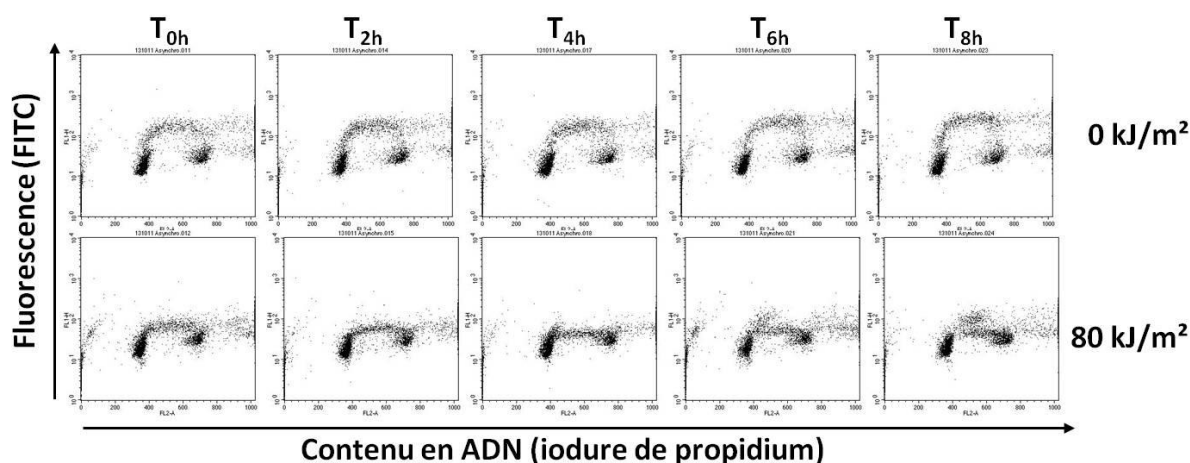


Figure 53 : Perte d'amplitude du signal BrdU après exposition aux UVA.

A. Des fibroblastes humains primaires MRC5 et de peau NHSF asynchrones sont irradiés dans du MEM sans rouge phénol (MEMi) à 40 et 80 kJ/m² UVA, puis ont incorporé du BrdU pendant 30 minutes soit immédiatement, soit 8 heures post-irradiation. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont représentatifs de trois expériences distinctes.

B. Des fibroblastes humains primaires MRC5 asynchrones sont irradiés dans du MEMi à 80 kJ/m² UVA, puis ont incorporé du BrdU pendant 30 minutes soit immédiatement, 2 heures, 4 heures, 6 heures ou 8 heures post-irradiation. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS). Les résultats sont issus d'une expérience unique et sont similaires à ceux obtenus à partir de NHSF (données non montrées).

A l'issue de ces résultats, nous avons émis deux hypothèses : les radiations UVA affectent à long terme la perméabilité des membranes, particulièrement dans les cellules primaires, réduisant l'entrée du BrdU, et/ou l'activation des origines. Afin de tester la première hypothèse, nous avons entrepris d'évaluer la quantité de BrdUTP intracellulaire détectable par HPLC-MS dans les cellules MRC5Vi et MRC5 asynchrones irradiées ou non. Pour ce faire, les cellules MRC5Vi ont été exposées à 160 kJ/m² d'UVA et les MRC5 à 80 kJ/m² [même IC₅₀, voir figure 51]. Le BrdU est ajouté 6 heures post-UVA ; rappelons également que dans une population de cellules MRC5Vi et MRC5 asynchrones, il y a environ 60% et 90%, respectivement, de cellules qui ne répliquent pas (cellules en GO/G1 et G2/M). Autrement dit, le dosage du BrdUTP intracellulaire reflète plutôt la diffusion facilitée du BrdU extracellulaire vers le compartiment intracellulaire, et la capacité de la cellule à transformer le BrdU en BrdUTP. Le tableau 7 montre que le rapport entre les niveaux de BrdUTP mesurés dans les cellules irradiées et non irradiées est quasiment identique dans les deux types cellulaires et avoisine la valeur de 0,8. En conséquence, l'effet des radiations UVA sur la perméabilité membranaire est trop faible pour rendre compte de l'inhibition d'incorporation de BrdU dans l'ADN des cellules, particulièrement les primaires. Nous proposons donc que le démarrage de la réplication au niveau d'origines latentes ou tardives est compromis par les radiations UVA. Par ailleurs, il est important de noter que par HPLC-MS nous n'avons pas retrouvé de BrdU dans les cellules (Guitton et Girard, communication personnelle), ce qui suggère fortement que les désoxyribonucléosides kinases intracellulaires sont fonctionnelles après UVA.

	Ratio BrdUTP irradié/non irradié	Barre d'erreur +/-
MRC5Vi	0,74	0,37
MRC5	0,8	0,12

Tableau 7 : La quantité intracellulaire de BrdUTP est similaire avant ou après UVA.

Des fibroblastes humains transformés MRC5Vi et primaires MRC5 sont exposés ou non à 160 kJ/m² et 80 kJ/m² d'UVA, respectivement, puis incubés pendant 6 heures à 37°C. Les cellules sont alors incubées pendant 30 minutes en présence de 10 µM de BrdU puis récoltées pour le dosage du BrdU et BrdUTP intracellulaires par HPLC-MS. Les données correspondent à la moyenne de deux expériences.

B. Résultats

Pour savoir si l'activation des origines latentes ou tardives est perturbée après irradiation aux UVA, nous avons étudié par peignage moléculaire la densité des origines actives. Initialement, notre objectif était d'évaluer aussi bien la distance inter-origines, qui ne s'adresse qu'à des origines relativement proches et ne concerne donc que l'initiation des origines au sein d'un même réplicon, que la densité des fourches, qui est une mesure indirecte de l'ensemble des origines actives à un temps T au sein du génome entier. Mais l'analyse de la distance inter-origines s'est avérée délicate parce que l'obtention de molécules d'ADN suffisamment longues (>300 kb) a été difficile malgré les nombreuses tentatives pour y remédier. C'est pourquoi, nous nous sommes focalisés seulement sur la densité des origines de réplication, c'est-à-dire sur le nombre de fourches par mégabase d'ADN. Dans un premier temps, cette étude a été réalisée à partir de fibroblastes MRC5Vi asynchrones. Les cellules sont exposées ou non aux radiations UVA et soit le double marquage IdU/CldU a lieu immédiatement après UVA soit 4 heures post-UVA. En absence de stress exogène, on obtient des densités de fourches avoisinant 1 fourche par mégabase (1 fourche/Mb au temps T_0 et 1,5 fourches/Mb au temps T_4) (Tableau 8), valeurs qui sont légèrement inférieures à celle décrite dans la littérature sur ce même type cellulaire [1,5-2 fourches/Mb ; (Despras et al, 2010)]. En réponse aux radiations UVA, on observe une diminution de la densité de fourches qui est dépendante de la dose d'UVA, observable immédiatement après UVA et qui perdure. En effet, on observe une inhibition de la densité de fourches d'environ 40-50% et 60-70%, aux doses de 80 kJ/m² et 160 kJ/m² d'UVA, respectivement, et ce aux temps T_0 et T_4 (Tableau 8).

Pour confirmer ces résultats, ces expériences ont été reproduites à partir de cellules MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S (condition S4R), irradiées et marquées soit immédiatement (T_0) soit 2 heures post-UVA (T_2). Tout d'abord, on observe une augmentation de la densité de fourches en absence de stress dans les cellules synchronisées en milieu de phase S, par rapport aux cellules asynchrones, puisque celle-ci est d'environ 2 fourches/Mb (Tableau 9). Néanmoins, nous constatons une baisse de la densité de fourches en réponse aux UVA qui, comme pour les cellules asynchrones, est dépendante de la dose, immédiate et perdure dans le temps (Tableau 9.A). Pour s'assurer de la validité des résultats, et montrer que cette inhibition est dépendante de la production de ROS induite par les UVA, les MRC5Vi synchronisées (condition S4R) sont également irradiées dans du PBS où aucun retard réplcatif et aucun ralentissement de fourches ne sont perceptibles (voir figures 35.B et 40). Les valeurs obtenues montrent qu'il n'y a pas ou très peu d'effet des radiations UVA sur la densité de fourches en absence de photosensibilisateurs et donc de production de ROS (Tableau 9.B).

Exper. 1/ Exper. 2	Nombre de signaux vert-rouge	Longueur d'ADN étiré et répliqué (Mb)	Densité (fourches/Mb)	Densité moyenne (fourches/Mb)	Pourcentage d'origines inactives
T₀ 0 kJ/m² UVA	186/178	204/217	0,91/0,82	0,86	
T₀ 80 kJ/m² UVA	98/208	226/344	0,43/0,60	0,54	38
T₀ 160 kJ/m² UVA	72/150	345/139	0,21/1,08	0,46	47
T₄ 0 kJ/m² UVA	181/158	158/165	1,15/0,95	1,05	
T₄ 80 kJ/m² UVA	115/116	205/247	0,56/0,47	0,51	51
T₄ 160 kJ/m² UVA	133/110	365/540	0,36/0,20	0,27	75

Tableau 8 : Inactivation des origines après exposition aux UVA dans des MRC5Vi asynchrones.

Des fibroblastes humains transformés MRC5Vi asynchrones sont irradiés dans du MEMi à 80 et 160 kJ/m² UVA, puis ont incorporé successivement de l'IdU et du CldU soit immédiatement ou 4 heures post-UVA. Une fois que l'ADN est peigné, puis immunomarcqué, l'analyse de la densité a pris part. La densité est définie comme le rapport entre le nombre d'origines actives et la longueur totale d'ADN en répllication soit 47 % à T₀ ou 55 % à T₄. Les résultats correspondent à la moyenne pondérée (en fonction de la longueur d'ADN) de deux expériences.

A

Exper. 1/Exper. 2	Nombre de signaux vert-rouge	Longueur d'ADN étiré (Mb)	Densité (fourches/Mb)	Densité moyenne (fourches/Mb)	Pourcentage d'origines inactives
T₀ 0 kJ/m² UVA	1296/933	519/371	2,50/2,51	2,50	
T₀ 80 kJ/m² UVA	1506/762	555/408	2,71/1,87	2,35	6
T₀ 160 kJ/m² UVA	687/312	346/344	1,99/0,91	1,45	42
T₂ 0 kJ/m² UVA	660/963	262/472	2,52/2,04	2,21	
T₂ 80 kJ/m² UVA	584/377	349/308	1,67/1,22	1,46	34
T₂ 160 kJ/m² UVA	259/369	165/344	1,57/1,07	1,23	44

B

	Nombre de signaux vert-rouge	Longueur d'ADN étiré (Mb)	Densité (fourches/Mb)	Pourcentage d'origines inactives	
MEMi	T₀ 0 kJ/m² UVA	458	405	1,13	
	T₀ 160 kJ/m² UVA	182	229	0,80	30
	T₂ 0 kJ/m² UVA	357	283	1,26	
	T₂ 160 kJ/m² UVA	79	164	0,48	62
PBS	T₀ 0 kJ/m² UVA	268	263	1,02	
	T₀ 160 kJ/m² UVA	161	190	0,85	17
	T₂ 0 kJ/m² UVA	168	158	1,06	
	T₂ 160 kJ/m² UVA	236	157	1,50	-41

Tableau 9 : Inactivation des origines après exposition aux UVA dans des MRC5Vi synchronisées est dépendante des ROS produites par les UVA.

Des fibroblastes MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S (S4R) sont irradiés dans du MEMi (A et B) ou dans du PBS (B) à 80 et 160 kJ/m² UVA, puis sont incubés séquentiellement avec de l'IdU et du CldU soit immédiatement ou 2 heures post-UVA. La densité est définie comme le rapport entre le nombre d'origines actives et la longueur totale d'ADN en répllication soit 82 % à T₀ ou 78 % à T₂ si MEMi soit 83 % à T₀ ou 76 % à T₂ si PBS.

A. Les résultats correspondent à la moyenne pondérée (en fonction de la longueur d'ADN) de deux expériences.

B. Les résultats sont issus d'une expérience unique.

C. Conclusion

Les données de ce chapitre montrent clairement que les radiations UVA, *via* la production de ROS, inhibent l'activation des origines. Non seulement cet effet est immédiat mais qui plus est, se maintient dans le temps. En effet, que ce soit sur cellules asynchrones ou synchronisées en milieu de phase S, on observe toujours une forte diminution de la densité de fourches 4 heures (cellules asynchrones) ou 2 heures (cellules synchronisées) post-radiation. Rappelons ici que les données de vitesse de fourches et de pool de dNTPs montrent que dans ces mêmes conditions expérimentales, ces valeurs sont revenues à la normale (voir chapitres II et III). Autrement dit, les espèces réactives de l'oxygène générées par le rayonnement UVA impactent la réplication en affectant temporairement la vélocité des fourches et durablement l'activation des origines latentes et/ou tardives (Figure 54).

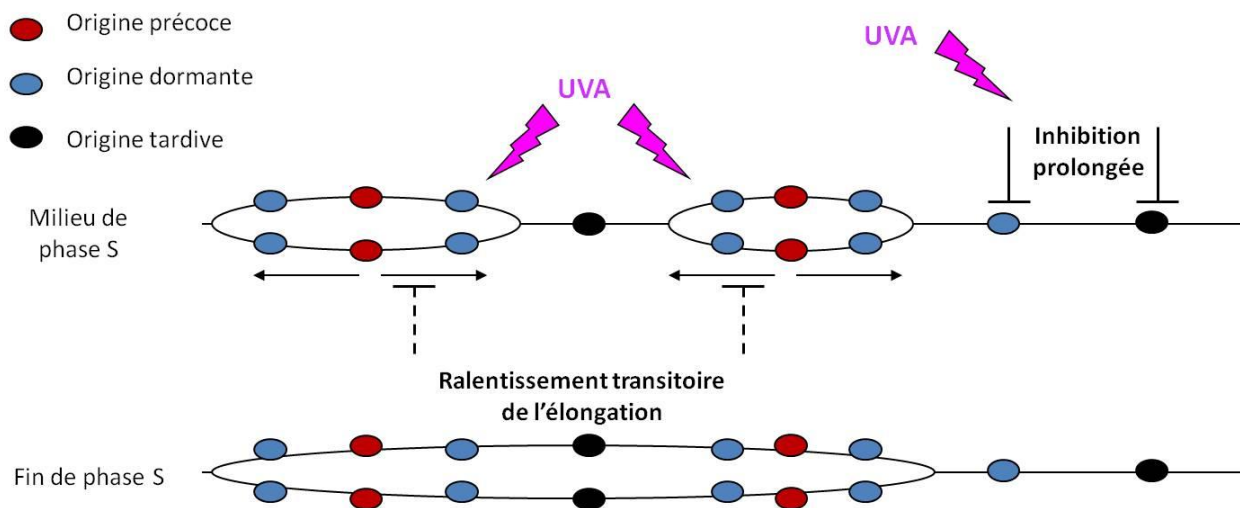


Figure 54 : Mécanisme du retard réplcatif induit par les radiations UVA.

Ce retard de réplication en réponse aux UVA est la résultante d'un ralentissement transitoire des fourches (trait en pointillé) et d'une inactivation prolongée des origines (trait plein).

V. Étude de l'expression et des modifications oxydatives des protéines de la réplication en réponse aux radiations UVA

A. Contexte

Comme il a été indiqué dans le préambule, nous pensons que les principales cibles des ROS générés par les UVA sont les protéines et que ce sont les dommages aux protéines et non à l'ADN, qui sont la principale cause de la perturbation de la réplication. En effet, l'oxydation des protéines par les radiations UVA peut conduire à la formation de liaisons covalentes réversibles [ponts disulfures intra- et/ou inter-moléculaires ; (Girard et al., manuscrit soumis)] ou irréversibles (Girard et al, 2011 ; Montaner et al, 2007). La formation de ces liaisons peut affecter la structure tridimensionnelle (liaisons intra-moléculaires) ou même la masse moléculaire (liaisons inter-moléculaires) de la protéine, changements qui peuvent être mis en évidence par la technique du western-blot. Des modifications oxydatives plus subtiles telles que la formation de di-tyrosines, de protéines-HNE ou protéines-MDA (marqueurs de la peroxydation lipidique), de protéines carbonylées peuvent également être détectées par western-blot en utilisant des anticorps spécifiques de ces modifications oxydatives au niveau des protéines. Toutes ces modifications sont également susceptibles d'être formées par les radiations UVA (Bulteau et al, 2002 ; Mizdrak et al, 2008 ; Pygmalion et al, 2010 ; Tebbe et al, 1997).

Dans les paragraphes précédents, nous avons montré que les radiations UVA diminuent modérément et transitoirement le pool de dNTPs. En admettant que cette mesure du pool reflète l'activité de la ribonucléotide réductase (RNR), un des acteurs majeurs dans la biosynthèse des dNTPs (voir Introduction, I.B), on peut alors envisager que les UVA modifient transitoirement une des deux sous-unités ou les deux sous-unités de la RNR.

De même, l'inhibition de l'initiation de la réplication au niveau des origines latentes et/ou tardives suggèrent qu'une ou plusieurs protéines du complexe pré-IC soi(en)t modifiée(s) durablement par les UVA et être ainsi non fonctionnelle(s), ou bien que les UVA modifient la localisation de l'une de ces protéines de la fraction chromatinienne (fraction insoluble) vers la fraction non chromatinienne (fraction soluble).

Nous avons donc entrepris d'étudier le devenir de ces protéines par western-blot en utilisant des gels d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence de SDS) et soit réductrices (présence de réducteur de ponts disulfures tel que le β -mercaptoéthanol (β -mer) ou le DTT dans les échantillons) soit non réductrices (sans β -mer ou DTT dans les échantillons). Concernant l'étude des protéines du complexe pré-IC, les échantillons obtenus à partir des fractions solubles et insolubles sont uniquement analysés en condition dénaturantes et réductrices. L'étude de ces protéines est grandement facilitée par le fait que des anticorps spécifiques de chacune de ces protéines sont disponibles.

Si notre hypothèse s'avère juste, nous espérons pouvoir identifier une ou plusieurs protéines, participant activement à la réplication, sensibles au stress oxydatif. Il sera alors intéressant de rechercher quels sont les types de modifications oxydatives impliqués dans ces processus d'oxydation.

B. Résultats

1. Ribonucléotide réductase

La ribonucléotide réductase (RNR) est un complexe hétérodimérique formé de 4 sous-unités, 2 x R1 associées à 2 x R2, soit 2 x R1 associées à 2 x p53R2 (voir Introduction, I.B). Pour évaluer l'expression de chacune de ces sous-unités, des MRC5Vi synchronisées en milieu de phase S (conditions S4R) sont exposées ou non aux radiations UVA, puis remises en culture durant différentes périodes de temps. Ces conditions expérimentales correspondent à celles utilisées pour le dosage du pool de dNTPs (voir chapitre III). Après lyse cellulaire, il en résulte des extraits de protéines solubles totales qui sont analysés par gel d'électrophorèse de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) dans des conditions réductrices (+ β) ou non réductrices (- β). La figure 55.A montre que la sous-unité R1 est modifiée immédiatement après UVA. Cette modification correspond à un retard de migration électrophorétique de la protéine qui est réversible aussi bien dans les cellules, puisqu'il n'est plus détectable 10 minutes après irradiation (condition - β) mais également *in vitro*, puisqu'il disparaît lorsque les échantillons - β sont mis en présence de β -mercaptoéthanol (condition + β). Par contre, nous n'observons pas de différence dans l'expression ni dans le profil de migration des deux autres sous-unités, la sous-unité R2 et la sous-unité p53R2 (Figure 55.A). On montre que cette modification est dépendante de l'oxygène singulet produit par les UVA, puisqu'elle n'apparaît pas lorsque les cellules sont exposées aux

UVA en présence de NaN_3 (Figure 55.B), se forme aussi immédiatement après UVA dans des cellules asynchrones ou synchronisées en début de phase S mais pas après UVC (Girard et Graindorge, données non montrées). L'ensemble de ces observations montrent très clairement que la sous-unité R1 subit une modification oxydative réversible qui implique la formation d'un ou plusieurs pont(s) disulfure(s) inter-moléculaire(s) entre la sous-unité R1 et un autre partenaire (R2, p53R2, autres protéines X). Il est donc extrêmement tentant de proposer qu'il existe bien une corrélation entre la sensibilité de la R1 au stress oxydatif et la quantité de dNTPs intracellulaires post-UVA.

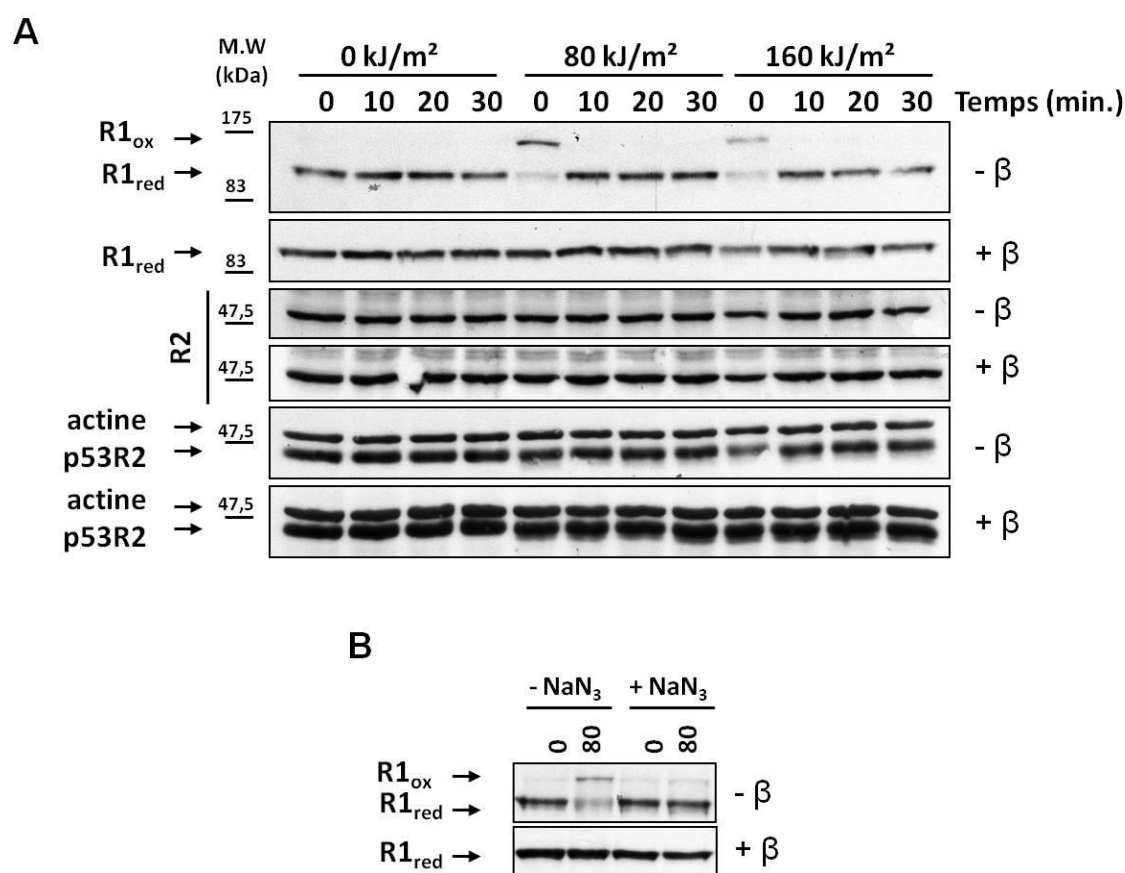


Figure 55 : Modification oxydative et transitoire de R1, immédiatement après UVA.

Des fibroblastes MRC5Vi synchronisés en milieu de phase S (S4R) sont irradiés ou non dans du MEMi en absence (A) ou présence (B) de 10 mM NaN_3 . Les cellules sont lysées immédiatement, 10 minutes, 20 minutes ou une demi-heure post-UVA. Les extraits protéiques sont analysés en présence ou non de β -mercaptoéthanol. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les gels sont représentatifs de 2 expériences distinctes. M.W.= marqueur de poids moléculaire. R1_{ox} = R1 oxydée ; R1_{red} = R1 réduite.

2. Acteurs protéiques de la machinerie répllicative

Nous avons vu au chapitre IV que les UVA inhibent l'initiation de la réplication à partir d'origines latentes et/ou tardives c'est-à-dire au niveau d'origines qui ont tout le matériel protéique déjà en place pour que les fourches de réplication démarrent. Nous nous sommes alors demandé si les UVA altéraient un de ces facteurs protéiques liés à la chromatine. Pour étudier ces protéines, nous avons choisi d'irradier les fibroblastes MRC5Vi synchronisés en début de phase S (condition S0R), puis de faire des extraits de protéines solubles totales (fraction soluble) ou insolubles (fraction chromatinienne) soit immédiatement (T_{0h}), 4 heures (T_{4h}) ou bien 8 heures (T_{8h}) après irradiation. Les extraits sont analysés par western-blot en condition dénaturante et réductrice. Nous avons choisi d'étudier plus particulièrement les protéines Cdc6, Cdc7/Dbf4, Cdc45, MCM2 (protéine totale et phosphorylée), ORC2, PCNA et RPA32. Afin de mesurer l'effet de la synchronisation par l'aphidicholine et l'effet des UVA sur l'activation du point de contrôle intra-S dépendant des kinases ATR et Chk1, nous avons aussi étudié ces protéines. L'analyse par western-blot de ces protéines est présentée dans la figure 56 (gels de gauche pour la fraction de protéines totales solubles et gels de droite pour la fraction chromatinienne).

Tout d'abord, on montre bien que la synchronisation à l'APC induit une phosphorylation de la kinase Chk1 au niveau de la sérine 345 (Chk1Ser345) (Figure 56 ; fraction soluble) comme précédemment observé [voir figure 32.B ; (Brown & Baltimore, 2003)]. Il est à noter que nous n'avons pas détecté de protéines Chk1 associée à la chromatine alors que nous détectons la kinase apicale ATR dans cette même fraction (Figure 56 ; fraction insoluble). On observe aussi que si la phosphorylation de la kinase Chk1 s'atténue fortement au cours du temps dans les échantillons non irradiés, celle-ci reste néanmoins plus importante dans les échantillons irradiés, ce qui confirme bien nos données publiées (Girard et al, 2008). La présence de cette phosphorylation est indicative d'un stress réplcatif induit par les UVA. Dans nos conditions expérimentales, on ne détecte pas la kinase Cdc7/Dbf4 dans la fraction chromatinienne (Figure 56 ; fraction insoluble).

Si on s'intéresse tout d'abord à ce qui se passe immédiatement après UVA (T_{0h}), même si on observe une légère augmentation de la protéine ATR liée à la chromatine dans les échantillons irradiés vs non irradiés, peu de différences notables sont observables pour les autres protéines (Figure 56 ; fraction insoluble). Néanmoins, en utilisant l'anticorps dirigé contre la protéine ORC2, on observe l'apparition d'une bande supplémentaire dont la migration électrophorétique est au-dessus de celle de la protéine ORC2 seule (Figure 56 ; fraction

insoluble, bande la plus basse) et qui est dépendante de la dose d'UVA. Nous ne savons pas à ce jour si cette bande est une réelle modification de la protéine ORC2 ou bien si l'anticorps utilisé reconnaît aussi une autre protéine dont l'intensité augmente après UVA. Lorsqu'on s'intéresse à la quantité de protéines dans la fraction chromatiniennne aux temps 4 heures (milieu de phase S) post-UVA, on observe une légère augmentation des protéines MCM2, Cdc45, PCNA et RPA32 (Figure 56, fraction insoluble). Puisqu'au temps 4 heures, toutes les cellules sont encore en phase S, cette différence suggère que la quantité de complexe de pré-initiation (pré-IC) est plus importante dans les cellules irradiées *vs* non irradiées. En conséquence, et même si nous n'avons analysé que quelques protéines du complexe pré-IC, la forte diminution de la densité de fourches observée après UVA ne semble donc pas être due à une diminution de ces complexes, mais est probablement causée par leur incapacité d'initier correctement la réplication.

L'analyse de la distribution de ces protéines dans la fraction soluble ne montre pas de différence significative entre les échantillons issus de cellules irradiées ou non irradiées (Figure 56 ; fraction soluble). On peut juste noter l'apparition de l'hyper-phosphorylation de la protéine RPA32 au temps 8 heures dans les échantillons non irradié et irradié à la dose de 80 kJ/m² d'UVA mais pas à celle de 160 kJ/m². Puisque cette hyper-phosphorylation conduit à un changement conformationnel de la protéine RPA qui régule négativement son activité dans le processus de réplication (Binz et al, 2004), on peut penser que cette hyper-phosphorylation de RPA32 coïncide avec la fin de la réplication dans les cellules.

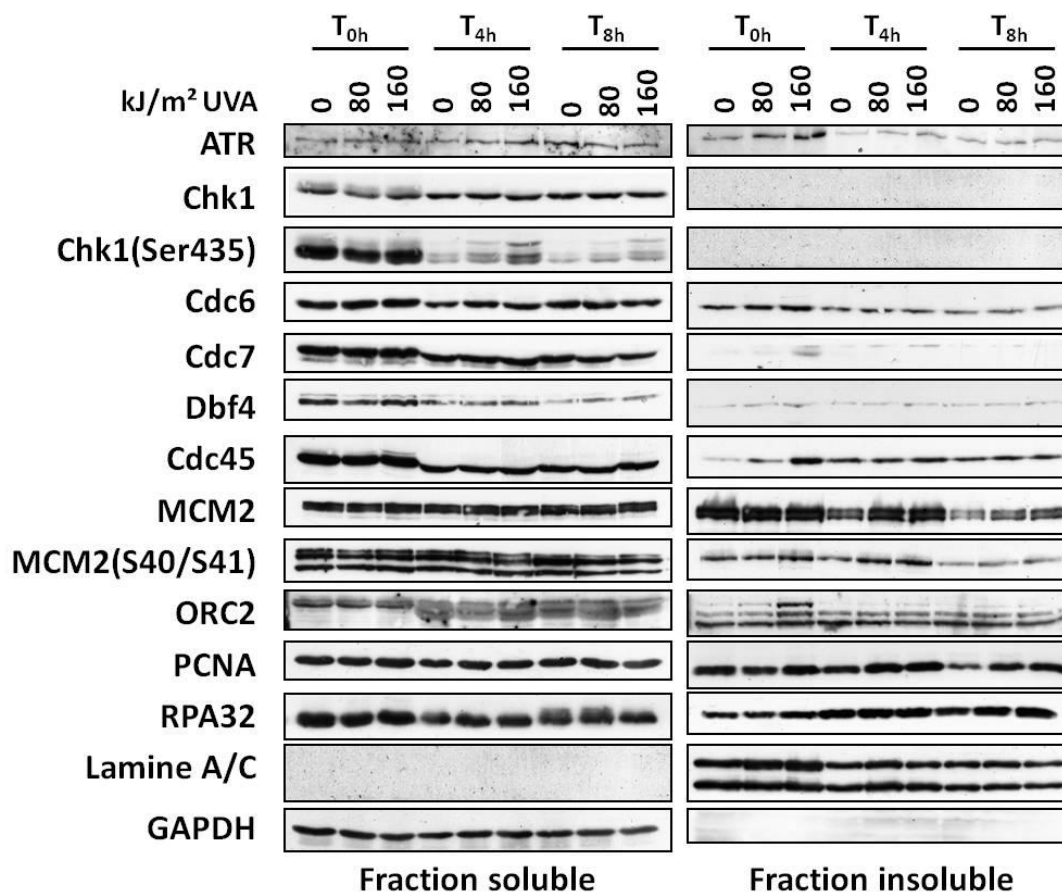


Figure 56 : Effet du rayonnement UVA sur la quantité de protéines ATR, Chk1, Cdc6, Cdc7, Dbf4, Cdc45, MCM2, ORC2, PCNA et RPA32 liées ou non à la chromatine.

Les cellules MRC5Vi sont synchronisées à l'APC et irradiées aux doses de 80 et 160 kJ/m² en absence d'APC (condition S0R). Les cellules sont alors soit lysées immédiatement soit remises en culture dans du milieu frais, et lysées 4 heures ou 8 heures post-irradiation. Les extraits de protéines solubles totales et insolubles liées à la chromatine sont préparés comme décrit dans le « matériel et méthodes ». Les extraits sont analysés par SDS-PAGE en condition réductrice. La lamine A/C est utilisée comme marqueur de charge des protéines chromatinienne et la GAPDH comme marqueur de charge des protéines solubles. Les gels sont représentatifs de 2 expériences distinctes.

C. Conclusion

Ces données soulignent que les radiations UVA provoquent une modification oxydative et réversible de la sous-unité R1. Or le pool de dNTPs après exposition aux UVA est transitoirement abaissé. Ces deux observations conduisent à supposer qu'il existe une corrélation entre le pool de dNTPs et l'expression de la R1 vis-à-vis du rayonnement UVA. Néanmoins, la différence constatée entre les temps de récupération du pool de dNTPs (60 à 90 minutes) et le temps de réduction de la forme oxydée de la R1 (moins de 10 minutes) suggère que cette oxydation ne peut pas à elle-seule expliquer un lien causal entre oxydation de la RNR et dérégulation du pool de dNTPs. On ne peut pas exclure d'autres formes d'oxydation qui modifieraient aussi bien la sous-unité R1 que les deux autres sous-unités de la RNR (R2 et p53R2) et en conséquence leurs activités sur une période de temps plus longue. D'autre part, comme nous n'observons pas de baisse d'expression de l'un des acteurs de la réplication après UVA, parmi les protéines analysées ; nous émettons l'hypothèse qu'il existe une « autre » protéine qui pourrait subir une modification oxydative après UVA, rendant ainsi impossible son recrutement à la chromatine et engendrerait donc une perte d'activation des origines. Enfin, l'absence de variation persistante des protéines du complexe pré-RC (ORC2, MCM2, Cdc6) renforce l'idée que les origines de réplication sont compétentes pour répliquer, mais pas nécessairement activées.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. Discussion :

Le mécanisme de réplication est gouverné par deux composantes majeures qui sont l'élongation des fourches et l'activation des origines. De plus, la réplication de l'ADN est préservée grâce au point de contrôle intra-S (voie ATR/Chk1). En effet, ce « checkpoint » régule l'activation des origines, la vitesse des fourches et la stabilisation des fourches en condition de stress ou au cours d'une phase S dite normale [voir Introduction, I.C.2 ; (Conti et al, 2007 ; Kaufmann, 2010 ; Scorah & McGowan, 2009 ; Segurado & Tercero, 2009)]. Il est important de noter qu'en absence de stress exogène, un phénomène de compensation peut prendre part au cours de la réplication. Par exemple, la répression d'ATR ou de Chk1 conduit conjointement à une sur-activation des origines latentes (ou dormantes) et à un ralentissement de la progression des fourches de réplication (Marheineke & Hyrien, 2004 ; Petermann et al, 2008 ; Petermann et al, 2010 ; Scorah & McGowan, 2009 ; Shechter et al, 2004 ; Syljuasen et al, 2005). De même, Courbet et al. ont observé que dans des cellules de hamster chinois, la diminution de vitesse de fourches est compensée par une mobilisation des origines latentes (Courbet et al, 2008). Autrement dit, lorsque la progression des fourches est diminuée, l'activation des origines est augmentée, et vice et versa. Il en résulte que la durée de la phase S est globalement inchangée. La dynamique de ces deux paramètres est également étroitement liée au pool de dNTPs intracellulaires (Gon & Beckwith, 2006 ; Odsbu et al, 2009). Par exemple, Odsbu et al. ont montré, *via* des mutants pour la RNR avec des degrés d'inactivité distincts, que la réduction de la vitesse des fourches est proportionnelle à la disponibilité modérément réduite en nucléotides, pouvant même conduire à un blocage de fourches si le pool devient considérablement limitant (Odsbu et al, 2009).

A contrario, des stress exogènes tels que les radiations UVC ou la camptothécine (CPT qui est un inhibiteur de la topoisomérase I), inducteurs de lésions dans l'ADN, activent le checkpoint intra-S *via* la voie ATR/Tim/Chk1, et provoquent un retard réplcatif (Despras et al, 2010 ; Seiler et al, 2007 ; Unsal-Kacmaz et al, 2007). Juste après le traitement, l'activation du checkpoint intra-S conduit à une diminution du nombre d'origines actives, en inhibant l'activation des origines tardives, et à une réduction de la vitesse des fourches de réplication (Seiler et al, 2007 ; Unsal-Kacmaz et al, 2007) alors que plusieurs heures après le traitement, l'effet perdure sur l'activation des origines mais pas sur les vitesses de fourches (Despras et al., 2010). L'inhibition du checkpoint intra-S atténue fortement l'inhibition de la réplication induite par ces stress (Despras et al, 2010 ; Seiler et al, 2007 ; Unsal-Kacmaz et al, 2007) même si la matrice d'ADN

reste endommagée. Une autre conséquence du stress réplicatif est l'activation des origines dormantes au sein d'un même réplicon bien que le checkpoint intra-S soit activé (Ge et al, 2007).

Mes travaux de thèse reposent sur l'observation suivante : le rayonnement UVA induit un retard réplicatif global, visible par cytométrie en flux, qui est dépendant de la production des ROS, et en particulier de l'oxygène singulet, dans des cellules de mammifères (Girard et al, 2008). En utilisant différentes approches pour inhiber le checkpoint intra-S, les auteurs ont également montré que ce ralentissement ne requiert pas de point de contrôle intra-S fonctionnel (Girard et al, 2008). Etant donné le caractère multiparamétrique de la réplication de l'ADN, nous avons donc étudié l'impact des radiations UVA à la fois sur l'élongation des fourches et sur l'activation des origines. En effet, nous nous attendions à ce que le déficit de l'une des 2 composantes ou la combinaison des 2 réunies puissent être à l'origine de ce problème réplicatif.

Par la technique du peignage moléculaire, nous avons clairement mis en évidence que les radiations UVA impactent, immédiatement et défavorablement, la vitesse des fourches et la densité des origines actives. Néanmoins, si le ralentissement des vitesses de fourches est transitoire, l'inhibition de l'activation des origines est plus prolongée. De façon surprenante, l'effet des UVA sur les vitesses de fourches et sur les origines rappelle l'effet des UVC ou du CPT sur ces mêmes paramètres (voir ci-dessus) bien que dans le cas des radiations UVA, mais pas des UVC ou du CPT, cela soit indépendant de l'activation du checkpoint intra-S. Par ailleurs, il est important de garder à l'esprit que l'inhibition de la réplication par les UVA n'est pas la conséquence de dommages à l'ADN mais est dépendante des ROS, alors qu'après UVC ou CPT, l'inhibition de la réplication est une conséquence directe de dommages à l'ADN.

A. UVA et vitesse des fourches de réplication

En s'intéressant de plus près à l'élongation de la réplication post-UVA, nous avons tenté de déterminer le principal facteur qui contribue à cette diminution temporaire des vitesses de fourches. Premièrement, nous avons exclu la présence de dommages bloquants induits par les UVA comme la cause de cette baisse de vitesse des fourches. Par exemple, les lésions CPDs et (6-4)-PP sont responsables d'un blocage de progression de fourches (Griffiths et al, 1990). Cependant, la production en faible quantité de dommages à l'ADN (CPDs TT, 8-oxoguanine et cassures de brins) post-UVA n'est pas suffisante pour ralentir la progression des fourches (Girard et al, 2008). En accord avec cette première observation, nous n'avons pas observé d'asymétrie de fourches après irradiation aux UVA (voir figure 44) qui aurait pu témoigner de la présence de lésions bloquantes (Despras et al, 2010). De même, l'ubiquitination de PCNA à la

chromatine, protéine qui confère une haute processivité aux ADN polymérase et qui joue un rôle pivot dans la synthèse translésionnelle (Kannouche & Lehmann, 2004) est un bon indicateur de blocage de fourches en réponse à un grand nombre de stress génotoxiques (Zlatanou et al, 2011). Cependant, nous n'avons jamais détecté l'ubiquitination de PCNA après UVA (Girard et al, 2011).

Le ralentissement de la progression des fourches peut également s'expliquer par une indisponibilité des dNTPs, substrats essentiels dans l'étape d'élongation (voir Introduction, I.B). Or, il est intéressant de prendre en considération que le pool de dNTPs détermine la progression des fourches en condition de stress (Poli et al, 2012). Nos données montrent que les radiations UVA conduisent à une diminution transitoire et modérée du pool de dNTPs intracellulaires (voir figure 46) et que cette baisse pourrait expliquer l'effet sur les vitesses. Néanmoins, une expérience de complémentation par addition de ribonucléosides a montré que l'ajout de ribonucléosides post-UVA n'est pas suffisant pour restaurer une vitesse de fourches « normale » (voir figure 49) ce qui suggère que la diminution du pool de dNTPs intracellulaires n'est probablement pas la seule cause du ralentissement des fourches. Cependant, il s'agit d'une expérience unique qui doit être confirmée.

Nous envisageons deux principales causes pour interpréter cette baisse transitoire du pool de dNTPs intracellulaires : les radiations UVA par l'intermédiaire des ROS induisent une perte d'activité de la RNR et/ou une oxydation des dNTPs. Cette dernière possibilité peut être envisagée puisque les bases de l'ADN sont sensibles à l'oxydation médiée par les ROS (Kamiya, 2003). Par ailleurs, si les dNTPs sont oxydés, et donc modifiés chimiquement au cours de l'irradiation, ces pools oxydés ne seront pas identifiés dans nos conditions d'analyse (HPLC/MS), ce qui se traduira par une diminution du pool de dNTPs intacts. Notre étude montre que la présence de ROS intracellulaires perdure environ 1 heure après irradiation (voir figure 36). Or, ce temps est comparable à la baisse du pool de dNTPs post-UVA. Ainsi, cette concordance ne souligne-t-elle pas un lien causal ? Même si plus de 70 modifications oxydatives de bases ont été identifiées à ce jour, un nombre restreint d'entre elles ont été effectivement identifiées au niveau de l'ADN cellulaire dont la 7,8-dihydro-8-oxodéoxyguanosine (8oxodG) et la 2-hydroxy-déoxyadénosine (2-OH-dA) (Cadet et al, 2002 ; Kasai, 2002). De part son faible potentiel rédox, la guanine est particulièrement vulnérable à l'oxydation et l'oxygène singulet formé après UVA par une photosensibilisation de type II (voir Introduction II.B.1) peut conduire à la formation de 8-oxodGTP (Neeley & Essigmann, 2006). Néanmoins, nous montrons que parmi les 4 bases, c'est le dATP qui paraît être le plus affecté post-UVA et non le dGTP. Nous avons également constaté que le rayonnement UVA, *via* la production de ROS, occasionne

immédiatement une augmentation, certes modeste, essentiellement du pool de dCTP et TTP (voir figure 45). Cette augmentation pourrait donc être le reflet d'une non-consommation des dNTPs dans une situation où les fourches de réplication ralentissent fortement. N'oublions pas que par peignage moléculaire, nous ne sommes pas en mesure d'analyser la vitesse des fourches dans un temps très court (<10 minutes) après UVA. L'absence d'augmentation du pool de dGTP et dATP pourrait alors s'expliquer par l'oxydation de ces deux bases au cours de l'irradiation. En tenant compte de l'ensemble de ces observations, il est tout à fait envisageable que les UVA oxydent le pool de dNTPs, essentiellement au niveau du dGTP et dATP. Il serait donc important de mesurer les quantités de 8-oxodGTP et 2-OH-dATP présentes après UVA.

L'autre hypothèse proposée pour rendre compte de la diminution transitoire du pool de dNTPs serait une inhibition transitoire de l'activité de la RNR. En effet, les travaux d'Odsbu et al. montrent que la vitesse des fourches de réplication dépend de la concentration en dNTPs qui elle-même dépend de l'activité de la RNR (Odsbu et al, 2009). Par ailleurs, il est connu que l'activité de la RNR est régulée par l'état rédox de la cellule (Gon & Beckwith, 2006). Par exemple, la RNR est sensible au stress oxydatif induit par H₂O₂ et son activité décroît en réponse à des concentrations croissantes d'H₂O₂ (Zahedi Avval & Holmgren, 2009). De plus, Camier et al. ont observé que l'accumulation d'une forme oxydée de la sous-unité R1 conduit à une baisse de dNTPs et à un allongement de phase S (Camier et al, 2007). Nous avons montré que la sous-unité R1 de la RNR, mais pas les sous-unités R2 et p53R2, est immédiatement oxydée par les radiations UVA (R1_{ox}), que cette oxydation concerne la formation de ponts disulfures intra et/ou intermoléculaires et dès 10 minutes post-UVA, la sous-unité est de nouveau réduite (R1_{red}) dans les cellules (voir figure 55). Même si l'on ne connaît pas l'effet de cette modification oxydative sur l'activité de la RNR, il est peu probable que celle-ci puisse expliquer la baisse transitoire du pool de dNTPs puisque le temps de restauration à une expression normale de R1 est plus rapide que celui d'un retour à un niveau basal des dNTPs. Ce que nous apprennent aussi ces résultats, c'est que la RNR est la cible du stress oxydatif généré par les UVA. Par la technique du western-blot, nous n'avons testé que des modifications qui donnent lieu à un changement dans le poids moléculaire apparent de la protéine. Mais d'autres types de modifications oxydatives sont envisageables (Shacter, 2000). Ainsi, la sous-unité R2 possède deux radicaux tyrosines et un site ferrique, qui sont tous deux nécessaires à l'activité enzymatique de la protéine (Nordlund & Reichard, 2006). Les ROS produites par les UVA peuvent potentiellement induire la formation de produits oxydés tels que les di-tyrosines (Shacter, 2000) et ainsi modifier l'activité de la RNR. D'autre part, les produits issus de la peroxydation lipidique ont la capacité de se lier aux résidus cystéines des protéines (Uchida, 2000). Etant donné que les UVA induisent de la peroxydation

lipidique (voir Introduction, II.C.3), il est aussi possible que les cystéines du site actif de la sous-unité R1 (Figure 57) puissent subir ce type de modification oxydative (non détectable par western-blot). En tenant compte de l'ensemble de ces données, il semble donc important de doser directement l'activité de la RNR en réponse au rayonnement UVA, afin de savoir si elle est responsable de la chute momentanée du pool de dNTPs. Il est possible de quantifier précisément l'activité intracellulaire de la RNR post-UVA par une méthode qui ne nécessite pas d'avoir recours à des substrats fluoro- ou radio-marqués (Huang & Tzeng, 2012). S'il s'avère que l'activité de la RNR est effectivement inhibée transitoirement en réponse aux UVA, il serait alors intéressant de rechercher d'éventuelles modifications oxydatives au sein des sous-unités R1, R2 et p53R2. Cette étude pourrait se faire en immuno-précipitant la RNR avant et après UVA, suivi d'une digestion trypsique et d'une analyse par spectrométrie de masse des fragments générés.

En condition non-réductrice, le fait d'observer un déplacement de la mobilité électrophorétique de la sous-unité R1 vers les hauts poids moléculaires (poids moléculaire de $R1_{red}=90$ kDa, poids moléculaire de $R1_{ox}=120-130$ kDa) suggère qu'il existe une interaction protéique entre R1 et une autre protéine X (voir figure 55). Ce poids moléculaire est compatible avec une interaction R1/R2 ou R1/p53R2 (90kDa+46kDa ou 90kDa+39kDa, respectivement). Néanmoins, étant donné que les niveaux d'expression des sous-unités R2 et p53R2 restent inchangées après UVA (pas de baisse d'intensité de la bande à la taille attendue, voir figure 55), et que nous n'avons pas mis en évidence, par western-blot, la formation d'une bande de haut poids moléculaire en utilisant des anticorps dirigés contre R2 ou p53R2, nous sommes tentés d'exclure toute implication de ces deux sous-unités dans cette putative interaction protéique.

L'activité de la RNR est régulée par les thiorédoxines (Trx) et les glutarédoxines (Grx) (Holmgren & Sengupta, 2010 ; Meyer et al, 2009) qui sont des protéines d'oxydo-réduction qui facilite la réduction d'autres protéines par formation de ponts disulfures entre résidus cystéine [(Meyer et al, 2009) ; (Figure 57)]. Bien que ce soient de petites protéines (environ 12 kDa), on ne peut exclure qu'en réponse à une exposition aux radiations UVA, la formation de ponts disulfures entre la sous-unité R1 et une Trx ou une Grx ne conduise à un hétérodimère (R1/Trx ou R1/Grx) dont la migration électrophorétique en gel non réducteur correspond à une protéine de 130-140 kDa. Pour confirmer ou non cette hypothèse, il faudrait inhiber l'expression de la thiorédoxine 1 (Trx1) ou de la glutarédoxine 1 (Grx1) par ARN interférence et analyser l'oxydation de R1 par western-blot dans des conditions non réductrices. Si l'une ou l'autre de ces deux protéines interagit avec la sous-unité R1, alors leur inhibition devrait faire disparaître $R1_{ox}$ après UVA. Le choix de Trx1 et Grx1 se justifie par le fait que ce sont des enzymes cytosoliques (Meyer et al, 2009) comme l'est la RNR (Pontarin et al, 2008).

Camier et al. ont observé que dans des cellules de levure *S. cerevisiae* déficientes pour les thiorédoxines, une forme oxydée de la sous-unité R1 s'accumule car elle ne peut plus être réduite. Cette forme oxydée de la protéine migre moins vite que la forme réduite sur gel de polyacrylamide en condition non réductrice (Camier et al, 2007). Se peut-il que la forme R1_{ox} observée après UVA (Figure 55) puisse correspondre à la formation d'un pont disulfide intra-moléculaire qui serait réduit très rapidement par Trx1 ? L'inhibition de Trx1 dans les cellules humaines devrait donc permettre de différencier entre la formation d'un pont disulfure inter- et intra-moléculaire.

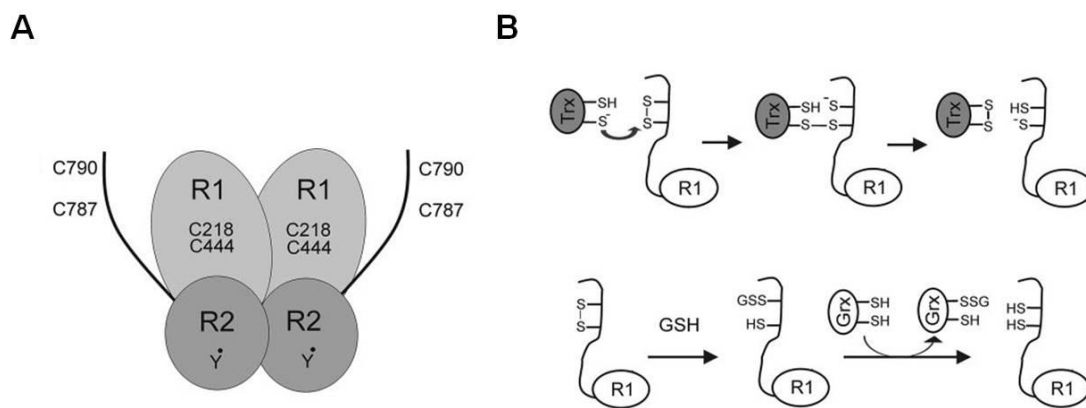


Figure 57 : Etat oxydo-rédox de la sous-unité R1.

A. Schéma de la R1 et ses résidus cystéines.

B. 2 voies réductrices des ponts disulfures de R1 : thiorédoxines (Trx) et glutathion (GSH)/glutarédoxine (Grx)

D'après (Zahedi Avval & Holmgren, 2009).

En conclusion, il est tout à fait envisageable que le rayonnement UVA, *via* la production de ROS, agit non seulement directement au niveau des dNTPs en oxydant partiellement le pool de dATP et/ou dGTP mais également au niveau de la RNR en oxydant, entre autre, la sous-unité R1. La combinaison des deux effets conduit à une baisse transitoire du pool de dNTPs qui cause alors une diminution des vitesses de fourches. Or, les expériences de complémentation en ribonucléosides vont partiellement dans le sens d'un rôle du pool de dNTPs sur la vélocité des fourches.

B. UVA et activation des origines

Nous avons précédemment énoncé que le retard global de réplication de l'ADN ne repose pas seulement sur l'élongation, mais qu'il est également la conséquence d'une inactivation prolongée de l'activation des origines latentes et/ou tardives. En effet, grâce au peignage moléculaire, nous avons observé que le rayonnement UVA diminue drastiquement la densité des fourches sur une longue période (voir tableaux 8 et 9). De plus, l'expérience de complémentation en ribonucléosides a montré que l'élongation à elle-seule ne pouvait pas expliquer ce retard global.

Chk1 est une kinase essentielle pour préserver la stabilité du génome (Goto et al, 2012) et est requise pour inhiber l'initiation des origines tardives en réponse à des dommages à l'ADN (Despras et al, 2010 ; Seiler et al, 2007). Nous avons montré que si les radiations UVA activent la voie ATR/Chk1, celle-ci n'est pas responsable du retard global de réplication [(Girard et al, 2008), voir figure 6 de ce manuscrit]. Il est assez surprenant d'observer l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire sans apparente contribution de leurs parts sur la réplication. Pour comprendre au niveau moléculaire si Chk1 joue un rôle dans le ralentissement de la réplication après UVA (vitesse des fourches et activation des origines), nous proposons de mesurer ces paramètres dans des cellules déficientes pour l'expression de Chk1 (par ARN interférence).

D'autre part, nous nous sommes demandés quelle était l'origine de cette inhibition des origines. Nous tenons pour acquis que cette inhibition est dépendante de la production de ROS induite par les UVA et non d'un effet direct des UVA puisqu'il n'y a pas d'inhibition en absence de ROS (cas de l'irradiation dans le PBS, voir tableau 9). Pour expliquer cette baisse de densité des fourches post-UVA, plusieurs arguments sont en faveur d'un effet direct ou indirect des ROS au niveau du complexe pré-IC. En effet, notre étude a montré que les cellules MRC5Vi irradiées en G1 entrent normalement en phase S (voir figure 31), et donc que les UVA ne doivent affecter que modérément l'établissement du complexe pré-RC. Par ailleurs, l'inhibition de l'activation des origines est observée dans des cellules irradiées en milieu de phase S c'est-à-dire dans une configuration où toutes les origines sont apprêtées pour être initiées (complexe « pré-IC »). Nous avons émis l'hypothèse que le stress oxydatif généré par le rayonnement UVA pouvait modifier oxydativement une protéine de ce complexe ou alors changer sa localisation subcellulaire. L'étude par western-blot de quelques uns des acteurs protéiques impliqués dans ce complexe, et associés à la chromatine, n'a guère permis de mettre en évidence l'implication de l'un d'entre eux dans ce phénomène (voir figure 56). En effet, après UVA, nous n'avons observé ni la diminution d'une protéine associée à la chromatine ni l'apparition d'une forme modifiée d'une

de ces protéines. Bien que nous n'ayons pas exploré toutes les protéines associées aux origines de réplication, les UVA ne semblent pas modifier leur interaction avec l'ADN. A ce jour, nous n'avons pas d'explication rationnelle qui puissent rendre compte de cette inhibition. Mais dans la dernière partie, consacrée aux perspectives, nous proposons des expériences pour essayer de comprendre le mécanisme.

Pour finaliser cette discussion, nous avons fait figurer un schéma qui a pour objectif de résumer l'ensemble des résultats acquis au cours des précédentes expériences (détaillées dans la partie « Résultats »), et ainsi de représenter le mécanisme qui gouverne ce retard réplcatif induit par les radiations UVA (Figure 58). Les différentes hypothèses que nous avons pu émettre au cours de la discussion y sont également illustrées. Globalement, ce modèle hypothétique du retard réplcatif souligne que le rayonnement UVA engendre :

- 1) une diminution transitoire et modeste du pool de dNTPs,
- 2) un ralentissement de la progression des fourches de réplication (trait en pointillé),
- 3) une modification oxydative de la sous-unité R1 de la RNR et
- 4) une inhibition prolongée de l'activation des origines latentes et/ou tardives (trait plein).

Sur cette figure deux principales suppositions y sont représentées :

- 1) une oxydation du pool de dNTPs ?
- 2) une baisse de la quantité en dNTPs qui est liée à une inactivation de la RNR ?

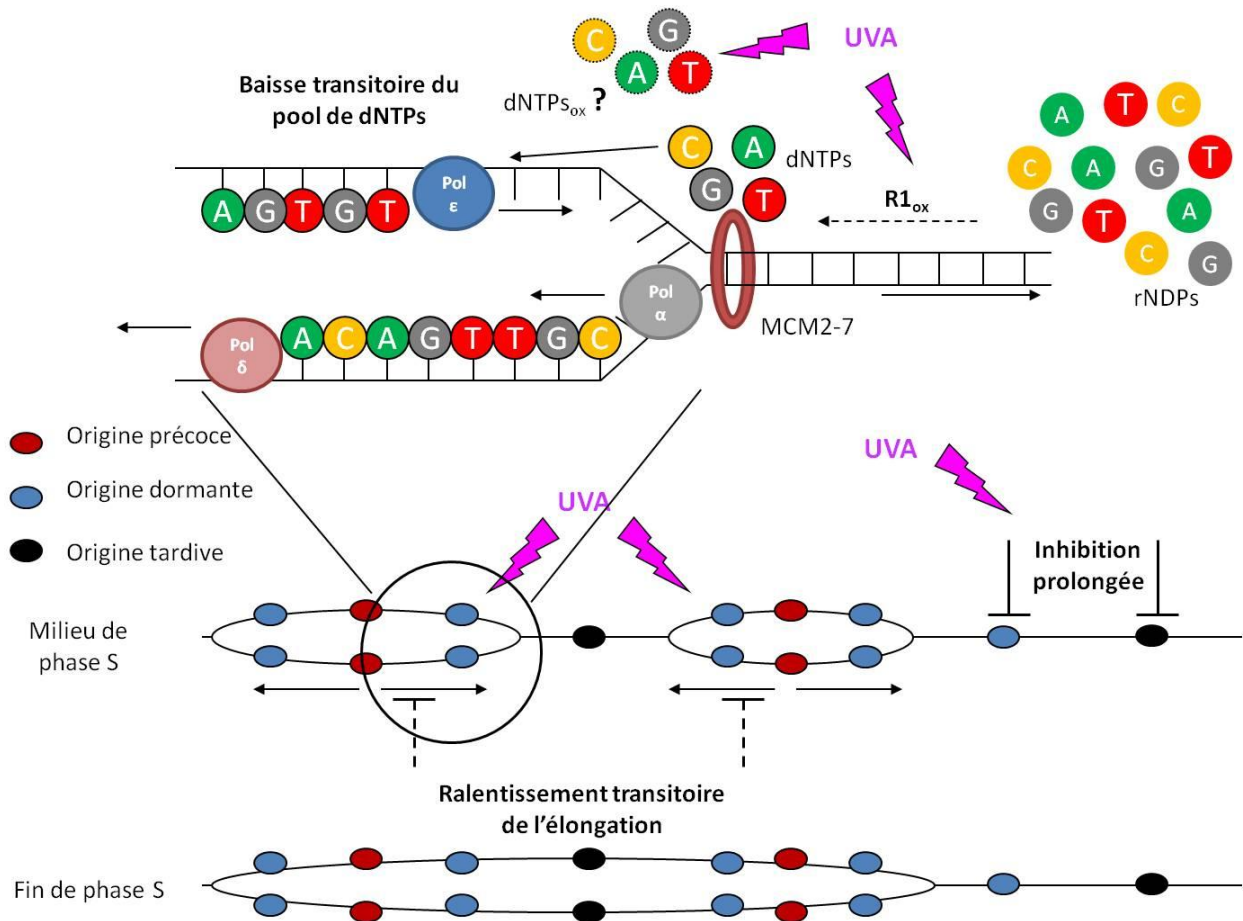


Figure 58 : Modèle hypothétique du retard réplcatif induit par les radiations UVA.

Ce retard de réplcation en réponse aux UVA est la résultante d'un déficit immédiat, transitoire ou prolongé des acteurs de la réplcation de l'ADN.

II. Perspectives :

Dans la précédente section, les causes potentielles du ralentissement de fourches après irradiation ont pu clairement être définies (oxydation du pool de dNTPs et/ou inhibition transitoire de l'activité de la RNR) et nous avons proposé un certain nombre d'expériences pour étayer nos hypothèses. En revanche, l'origine de l'inactivation des origines post-UVA n'est pas encore comprise. Dans cette seconde section, nous proposons donc un certain nombre d'expériences, non seulement pour essayer de préciser le mécanisme d'inhibition, mais aussi pour évaluer, à plus long terme, les conséquences de cette perturbation de la réplication sur la stabilité du génome.

A. Isoler un facteur particulier dont la déficience pourrait expliquer l'inactivation des origines post-UVA

Une des questions qui restent en suspens est la suivante : est-ce que l'effet sur la machinerie de réplication est un effet direct, auquel cas la cible serait un facteur localisé dans le noyau, ou bien indirect, auquel cas la cible serait plutôt cytosolique ? A ce jour, nous favorisons l'hypothèse d'une cible cytoplasmique pour les raisons suivantes: i) la quantité de dommages induits par les UVA dans nos conditions est très faible (Girard et al., 2008), ii) la sous-unité R1 qui localise essentiellement dans le cytosol (Pontarin et al., 2008, PNAS) est oxydée par les UVA, et iii) la riboflavine (vitamine B₂) qui est le principal photosensibilisateur dans nos conditions (Girard et al, 2008 ; Mahns et al, 2003), localise essentiellement dans le cytosol (Huang et al, 2003 ; Phelps et al, 2004). Afin de répondre à cette question, nous proposons d'utiliser le « Cell free System ». Effectivement, cette technique offre l'avantage d'étudier *in vitro* la réplication de l'ADN en traitant indépendamment la fraction nucléaire et cytoplasmique (Krude, 2006 ; Marheineke et al, 2005). Il a été démontré qu'*in vitro* les noyaux de cellules synchronisées en fin de G1 par la mimosine sont compétents pour répliquer leurs chromosomes (dans un état pré-IC), mais qu'ils perdent un facteur diffusible nécessaire à l'activation de la machinerie répliquative (Nasheuer et al, 2002). Or l'apport de ce facteur issu d'un extrait cytosolique de cellules en phase S ou en asynchrone permet d'initier rapidement la réplication (Krude, 2000). Notre approche est donc de reconstituer *in vitro* une réplication de l'ADN en mélangeant le noyau de cellules synchronisées à la mimosine et irradiées ou non, avec le cytoplasme de cellules synchronisées à l'aphidicholine et irradiées ou non. Ainsi, en réalisant différentes combinaisons (noyaux irradiés + cytoplasmes non irradiés ou noyaux non irradiés +

cytoplasmes irradiés), nous pourrions savoir si le rayonnement UVA altère la fonction d'un facteur, diffusible et présent dans le cytosol, qui est nécessaire à l'initiation de la réplication.

B. L'inactivation des origines est-elle liée à un remodelage de la chromatine post-UVA ?

Les modifications chromatiniennes peuvent influencer la fréquence d'activation des origines (Conner & Aladjem, 2012), et diverses études décrivent que les ROS sont impliquées dans le remodelage chromatinien (Monks et al, 2006 ; Sundar et al, 2010). De ce fait, ne pourrions-nous pas imaginer que les radiations UVA induisent des modifications de la chromatine qui conduisent à une inactivation des origines. Puisque l'acétylation des histones corrèle avec l'activation des origines (Aggarwal & Calvi, 2004), nous pourrions suggérer qu'une irradiation UVA diminue l'acétylation des histones *via* une surexpression de l'histone déacétylase (HDAC) ou une perte de fonction des histones acétyltransférases (HATs), rendant ainsi une majorité d'origines inactives. Prieur et al. ont montré que l'inhibition de l'activité de HAT p300 altère la progression de la phase S (Prieur et al, 2011). D'autres types de changements épigénétiques tels que la méthylation des histones et la position des nucléosomes, qui sont d'importants modulateurs de l'activité des origines (Dorn & Cook, 2011) pourraient également être des cibles potentielles des ROS induites par les radiations UVA.

C. Quel est le pattern spatio-temporel des foyers de réplication après exposition aux UVA ?

Il serait intéressant de connaître le profil spatial des foyers de réplication après une exposition aux UVA qui permettrait alors d'en déduire le pattern spatio-temporel de l'activation des origines de réplication post-UVA et ainsi de savoir qui, des origines précoces ou tardives, sont les plus sensibles à l'irradiation (voir Introduction, I.A.4). Les résultats obtenus par cytométrie de flux avec un marquage au BrdU post-UVA montrent que l'incorporation du BrdU est altérée immédiatement après UVA dans les cellules primaires et en milieu ou fin de réplication dans les cellules transformées (voir figures 53 et 31.B). Cette dynamique de réplication peut être étudiée par immunofluorescence en utilisant des analogues de bases (BrdU, CldU ou IdU) (Conti et al, 2010 ; Taddei et al, 2001). L'incorporation de ces analogues représente les sites de synthèse de l'ADN qui seront visualisés par immunofluorescence au niveau de foyers de réplication. Ces foyers sont organisés selon des profils distincts en fonction de la progression de la phase S, allant d'un profil diffus en début de phase S jusqu'à une

régionalisation périphérique en fin de réplication, comme illustré sur la figure 59. Etant donné que nous suspectons une inactivation des origines tardives dans les cellules transformées, nous nous attendons à observer un profil moins régionalisé 8 heures post-UVA, par comparaison à celui de la fin de phase S de l'échantillon non irradié.

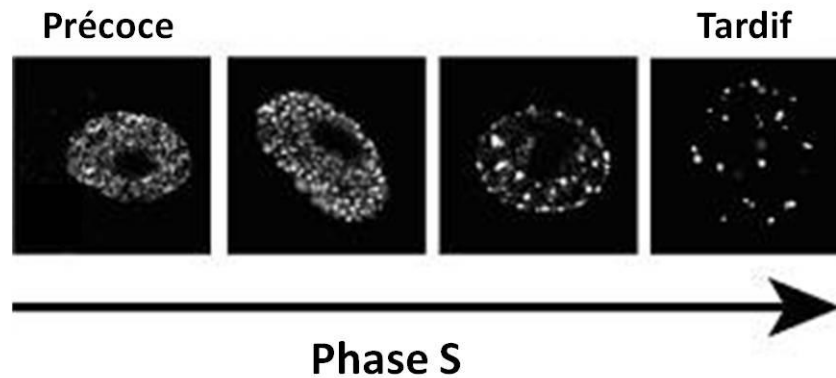


Figure 59 : Profil spatio-temporel des foyers de réplication durant la phase S.

Des cellules ont incorporé pendant 10 minutes du BrdU, puis sont remises pendant différentes périodes de temps avant que ne soient visualisés les profils distincts de foyers de réplication (allant d'un profil diffus en début de phase S jusqu'à une régionalisation périphérique en fin de réplication par immunofluorescence.

D'après (Taddei et al, 2001).

D. Stress oxydatif et retard répliatif ?

Pour savoir si cette inhibition de la réplication peut s'appliquer à d'autres types de stress oxydant, nous avons réalisé en parallèle une autre étude avec la ménadione (MN ; 2-méthyl-1,4-naphthoquinone, vitamine K₃). La ménadione est une quinone connue pour induire du stress oxydatif soit en augmentant les ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou en déplaçant le glutathion réduit (GSH) (Kossenjans et al, 1996 ; McAmis et al, 2003). L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux, montre que la MN engendre un retard répliatif, dont l'ampleur dépend de la concentration en MN (PM Girard et D Graindorge, données non publiées). Le N-acétylcystéine (NAC) est un antioxydant dont l'action est de stimuler la synthèse de GSH et de piéger les ROS (Gurer & Ercal, 2000). L'emploi de NAC au cours du traitement à la MN prévient le retard de réplication. Donc, contrairement au retard répliatif induit par les UVA qui est dépendant de l'¹O₂, celui provoqué par la MN est dépendant d'H₂O₂. D'autre part, ce ralentissement s'avère être également indépendant de Chk1 (PM Girard et D Graindorge, résultats non publiés). L'ensemble de ces données suggère fortement qu'il existe des similitudes

entre le mécanisme d'action des UVA et celui de la MN sur la réplication de l'ADN. Mais, des spécificités propres à chacun apparaissent également, en particulier le type de ROS induites. A ce stade de l'étude, il serait maintenant intéressant d'évaluer les deux principaux paramètres de la réplication, l'élongation *via* les vitesses de fourches et l'activation des origines *via* la densité en réponse à la MN.

E. UVA et instabilité génétique ?

Des travaux indiquent que chez les eucaryotes toute perturbation de la réplication de l'ADN peut conduire à une instabilité génétique et à une prédisposition tumorale (Lambert et al, 2007 ; Tourriere & Pasero, 2007). Le fait que dans nos conditions expérimentales, les radiations UVA conduisent à un retard réplcatif, il est alors possible que cette perturbation puisse provoquer de l'instabilité génétique. Dans un premier temps, il serait intéressant de mesurer des paramètres tels que la formation de micronoyaux et les échanges de chromatide-sœurs (SCE) dans nos conditions expérimentales (Wischermann et al, 2008). L'étude de la formation de micronoyaux est un bon indicateur d'aberrations chromosomiques (Fenech, 2002). Et il a été montré que le rayonnement UVA est directement un inducteur de micronoyaux (Emri et al, 2000 ; Shorrocks et al, 2004). Cependant pour savoir si c'est le retard réplcatif, *via* la production de ROS, qui est la source de l'instabilité génétique, nous comparerons le nombre de micronoyaux (irradiation dans du MEMi) à celui obtenu dans des conditions où ce ralentissement est aboli (irradiation dans du PBS). En parallèle, nous analyserons la fréquence des SCE dans ces mêmes conditions expérimentales. A ce jour et à ma connaissance, aucune évaluation de la fréquence de SCE après UVA n'a été réalisée. Seules des expériences combinant psoralène avec UVA furent entreprises et démontrent que cette combinaison conduit à une élévation du nombre de SCE (Baysal et al, 2003).

Enfin, il semble extrêmement important de s'intéresser aussi à l'instabilité génétique au niveau des sites fragiles suite à une exposition au rayonnement UVA. En effet, depuis quelques années maintenant, un concept émerge comme quoi la plupart des aberrations chromosomiques survenant dans les cancers résultent d'une réplication perturbée, préférentiellement au niveau des sites fragiles (Franchitto & Pichierri, 2011). Récemment, Ozeri-Galai et al., ont montré qu'un stress réplcatif modéré occasionne une augmentation des pauses de fourches de réplication au niveau de sites fragiles, sans activation de nouvelles origines (Ozeri-Galai et al, 2011). Ces auteurs proposent que cette réplication perturbée conduit à l'instabilité chromosomique observée au niveau de ces sites fragiles. Qu'en est-il donc de la réplication de l'ADN au niveau des sites

fragiles dans des cellules exposées au rayonnement UVA et dans des conditions où le stress oxydatif serait plus ou moins important ?

MATÉRIEL & MÉTHODES

1. Culture cellulaire

Cette étude a été réalisée à partir de fibroblastes de poumon humains transformés (MRC5Vi) et primaires (MRC5) et de fibroblastes normaux de peau (NHSF pour « Normal Human Skin Fibroblasts »). Ces trois modèles cellulaires sont cultivés dans du milieu de culture MEM (Eurobio) complété avec 10 % sérum de veau (PAA), pénicilline/streptavidine, L-glutamine, acides aminés non essentiels et du pyruvate de sodium (Eurobio). Les cellules sont cultivées à 37°C dans ce milieu complet avec une teneur atmosphérique en CO₂ de 5% et d'humidité de 95%. Au quotidien, ces cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² (TPP). Pour les expériences d'irradiation, les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri de 40, 60 ou 100 mm de diamètre (TPP) dans des volumes respectifs de milieu complet de 2, 3 et 8 ml.

2. Synchronisation cellulaire à l'aphidicoline (APC)

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri, mises à l'incubateur pendant une nuit, puis synchronisées en début de phase S en les incubant avec 5 µg/ml d'aphidicoline (*Nigrospora sphaerica*, Sigma-Aldrich) pendant 16 à 18 heures. Après deux étapes de lavage avec du milieu de culture frais pour éliminer cet agent, la reprise du cycle cellulaire est effective. L'APC est préparée à une concentration initiale de 5 mg/ml dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

3. Traitements

i. Irradiation aux UVA

Les cellulesensemencées sont préalablement lavées avec du PBS 1X ou du milieu d'irradiation MEM 1X sans rouge de phénol (milieu MEMi, Gibco) ou du PBS 1X si indiqué. Ensuite, les cellules sont exposées en phase exponentielle de croissance, sans couvercle, au rayonnement émanant d'une lampe Sellamed 4000 (Sellas, Dr Sellmeier, Allemagne), ayant une distribution spectrale comprise entre 340 et 440 nm environ (voir www.sellamed.com). Les doses reçues sont de 40, 80 et 160 kJ/m² à un débit de dose de 50 mW/cm² (soit 0,5 kJ/m²/sec) d'UVA. Les temps d'exposition sont de 1'20'', 2'40'' et 5'20'', respectivement. La distance de la source UVA à la surface du milieu est d'environ 20 cm et la température du milieu n'excède pas 37°C même après 5'20'' d'exposition.

ii. Traitement avec les antioxydants

L'azide de sodium (NaN_3 , Sigma-Aldrich) et le N-acétyl-L-cystéine (NAC, Sigma-Aldrich) sont préparés à une concentration initiale de 1 M dans de l'eau ultra-pure. La dissolution du NAC est favorisée en rajoutant quelques gouttes de soude concentrée. Les antioxydants sont ajoutés dans le milieu MEMi à une concentration finale de 10 mM au moment de l'irradiation, c'est-à-dire au moment où a lieu la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

iii. Complémentation en ribonucléosides

La complémentation avec les 4 ribonucléosides (adénosine, guanosine, cytidine, et uridine) est accomplie à une concentration finale de 20 ou 100 μM . Les ribonucléosides sont ajoutés immédiatement après l'irradiation. Pour les expériences de peignage moléculaire, seules l'adénosine, la cytidine et la guanosine sont ajoutés pour éviter que l'uridine n'entre en compétition avec l'iododésoxyuridine (IdU) ou le chlorodésoxyuridine (CldU). Pour les expériences de cycle cellulaire analysées en cytométrie en flux, les ribonucléosides sont présents tout au long de l'incubation.

4. Mesure de la viabilité cellulaire : test MTT

Les cellules sontensemencées à $2,5 \cdot 10^4$ cellules par boîte de 40 mm de diamètre. Chaque condition est effectuée en duplicate. Le lendemain, ces dernières sont exposées à des doses croissantes d'UVA, puis remises en culture. Au bout de 72 heures, le milieu est retiré, les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X et 1 ml de milieu frais complet contenant 0,5 mg/ml de sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, Sigma-Aldrich) est ajouté. Une boîte de référence, dépourvue de cellules et contenant le réactif, est également préparée. Après une incubation à 37°C d'environ 3 heures, temps qui permet à la succinate déshydrogénase intracellulaire de transformer les sels de tétrazolium en cristaux insolubles de formazan, 1 ml d'isopropanol 100% :HCl 37% (96 :4 vol :vol) est ajouté afin de dissoudre ces cristaux et le tout est mis sous agitation douce durant 2 heures à l'obscurité. Le dosage de chaque échantillon se fait par une lecture colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre ($\lambda=570 \text{ nm}$).

5. Cytométrie en flux

i. Cycle cellulaire

Les cellules sontensemencées à une densité de 3 à 5.10^5 cellules par boîte de 40 mm de diamètre. Si nécessaire, l'APC est ajoutée au milieu de culture comme décrit ci-dessus pendant 16 à 18 heures. Le marquage des cellules au BrdU (concentration initiale de 10 mM, concentration finale de 10 μ M) s'effectue à 37°C pendant 30 minutes soit avant l'irradiation, soit à des temps différents après l'irradiation. Après une étape de lavage dans le PBS 1X, les cellules sont décollées par ajout de 1 ml de trypsine (Eurobio). Après ajout de 2 ml de milieu complet, les cellules sont transférées dans un tube Falcon de 15 ml. S'il y a une nécessité, les cellules sont détachées de la boîte en les grattant à l'aide d'un râteau. La boîte est rincée avec 2 ml de PBS 1X qui sont ensuite transférés dans le tube de 15 ml. Après une étape de centrifugation de 5 minutes à 1500 rpm, le surnageant est retiré, le culot cellulaire est lavé dans 5 ml de PBS1 X, resuspendu dans 100 μ l de PBS 1X et fixé dans 5 ml d'Ethanol 70% froid. Les tubes sont conservés à 4°C pendant une fenêtre de temps comprise entre 2 heures et 3 jours. A l'issue de cette étape de fixation, les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé, puis le culot cellulaire est remis en suspension dans 3 ml d'une solution de lavage (TBS-0.5% BSA). Après une nouvelle étape de centrifugation, les culots cellulaires sont remis en suspension dans 100 μ l d'acide chlorhydrique 2M fraîchement préparé pour dénaturer l'ADN double brin et incubés 20 minutes à température ambiante. Après ajout de 3 ml de tampon de lavage et centrifugation, les résidus d'acide sont neutralisés par ajout de 500 μ l de borate de sodium 0,1 M pH 8.6 (Sigma) pendant 2 minutes à température ambiante. Après ajout de 2 ml de tampon de lavage, les cellules sont lavées de nouveau 2 fois dans du tampon de lavage puis remises en suspension dans 100 μ l de TBS-0.5% BSA-0.5% Tween20 contenant de l'anticorps monoclonal de souris FITC-anti-BrdU (dilution 1/7, clone 3D4, BD Biosciences) pendant 45 à 60 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Les tubes sont agités toutes les 10 minutes. Au bout de cette incubation, 3 ml de tampon de lavage sont ajoutés, les cellules centrifugées et les culots cellulaires remis en suspension dans 500 μ l de solution de lavage contenant 10 μ g/ml d'iodure de propidium (Sigma, #P4864) et 0,2mg/ml de RNase A (Sigma, #R5503). Les tubes sont incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes au minimum. Dans le cas où l'étude est réalisée à partir de cellules synchronisées à l'APC, les étapes d'incubation avec du BrdU et avec l'anticorps FITC-anti-BrdU ne sont pas nécessaires. Les échantillons sont maintenus à 4°C, prêts à être analysés pour l'analyse du cycle cellulaire. L'acquisition et l'analyse des données se fait à partir d'un FACSCalibur en utilisant le programme CellQuest Pro (Becton Dickinson).

ii. Mesure des ROS

Les cellules synchronisées à l'APC sont lavées deux fois avec du milieu complet, puis remises en culture pendant 4 heures. L'irradiation aux UVA se fait en présence ou non d'antioxydants. Le milieu d'irradiation est éliminé et la sonde dihydrorhodamine 123 (DHR123, Life Technologies, Invitrogen, #D632) est ajoutée à du milieu frais à une concentration finale de 10 μ M soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure ou 4 heures post-UVA. Cette sonde possède la particularité d'être perméante et ne devient fluorescente seulement s'il y a oxydation intracellulaire, particulièrement en présence de peroxydes (Qin et al, 2008). La sonde n'est pas présente au cours de l'irradiation pour éviter qu'elle ne subisse une modification oxydative, et de ce fait, occasionnerait un biais dans les résultats (Boulton et al, 2011). Après une étape de lavage avec du PBS 1X, les cellules sont détachées en les trypsinant et en les grattant si besoin est. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube Falcon de 15 ml, centrifugée 5 minutes à 1500 rpm, les culots sont rincés avec 2 ml de TBS-0.5% BSA, et remis en suspension dans 500 μ l de TBS-0.5% BSA. Les échantillons sont immédiatement analysés par cytométrie en flux.

6. Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont directement lysées sur boîte par ajout d'un tampon de lyse (300 μ l pour une boîte de 40 mm et 500 μ l pour une boîte de 60 mm de diamètre) contenant les composés suivants : 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2/6H_2O$, 10 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM β -glycérophosphate et 0.5% Triton X100. A ce tampon sont rajoutés extemporanément 1 mM d'orthovanadate de sodium, un mix d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche, Complete mini EDTA free) et 10 mM de N-éthylmaléimide (NEM, Sigma-Aldrich). Le NEM est un alkylant des thiols (fonction -SH) et prévient l'oxydation artéfactuelle des thiols au cours de l'extraction et/ou de la migration électrophorétique en conditions non réductrices (voir paragraphe ci-dessous). La lyse dure 5 minutes sur la glace et le surnageant contenant les protéines solubles totales est transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml (si 300 μ l de surnageant) ou dans un tube Falcon de 15 ml (si 500 μ l de surnageant). A ce stade, les boîtes sont conservées sur la glace pour en extraire les protéines chromatiniennes (voir ci-dessous). La concentration en protéines solubles est déterminée par la méthode de Bradford qui est une méthode colorimétrique.

Les protéines sont précipitées par ajout de 5 volumes d'acétone froid et les tubes conservés pendant 1 heure au minimum à -20°C . Après une centrifugation pendant 20 minutes à 20000 g et à température ambiante, le surnageant est aspiré et le culot protéique est séché à l'air libre jusqu'à évaporation totale du solvant. Le culot est remis en suspension dans un tampon de charge 1.5X SDS non réducteur (75mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 0.15% bleu de bromophénol, 15% glycérol) à une concentration finale de 3 ou 5 μg de protéines/ μl . Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Une partie de chaque échantillon est alors transférée dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et du β -mercaptoéthanol y est ajouté à la concentration finale de 1.5%.

La fraction chromatinienne (fraction de protéines insolubles) qui reste liée à la surface de la boîte est obtenue en rajoutant 500 μL de tampon de lyse et en grattant. La suspension résultante est transférée dans un tube eppendorf de 1,5 ml. La boîte est de nouveau lavée par ajout de 500 μl de tampon de lyse qui sont ajoutés à la première fraction. Les tubes sont centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes à 4°C , le surnageant est alors éliminé et les culots sont repris dans un tampon de charge 1.5X SDS réducteur (75mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 0.15% bleu de bromophénol, 15% glycérol, 1.5% β -mercaptoéthanol) dont le volume est égal à la moitié du volume de tampon de charge de la fraction soluble. Tous les échantillons protéiques sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être analysés par western-blot.

7. Western-blot

La séparation des protéines se fait en gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Deux types de matrice sont préparées : l'empilement des protéines se fait dans un gel d'acrylamide à 5% (acrylamide :bis-acrylamide 37.5 :1, Eurobio) préparé dans du tampon Tris-HCl 0,125 M pH6.8, 0.1% SDS et la séparation des protéines se fait dans un gel d'acrylamide, dont le pourcentage d'acrylamide varie de 6.5 à 10 % en fonction de la résolution souhaitée, et préparé dans du tampon Tris-HCl 0,19 M pH 8.9, 0.1% SDS. De 20 à 30 μg d'extrait protéique (pour les fractions solubles) et 10 μl (pour les fractions chromatiniennes) sont déposés par puit et la migration se fait dans un tampon de migration électrophorétique 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS. Un marqueur de poids moléculaires (Prestained Protein Marker, Broad range, New England Biolabs) est déposé comme contrôle de migration. La migration des protéines se déroule à voltage constant (entre 110 et 140 volts) et ampérage variable (de 50 à 90 mA) pendant 1h30 à 2 heures.

La seconde étape consiste à transférer les protéines présentes dans le gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose (Protran BA83 0.2 μm , Whatman) au sein d'une structure en sandwich composée de papier Whatman, le tout humidifié dans du tampon de transfert [25 mM Tris-Base, 192 mM Glycine, 20% Ethanol (ou 15% si protéines de haut poids moléculaire), 0,01% SDS] sous un champ électrique constant de 20 volts maximum et entre 200 et 400 mA pendant 1 heure, temps nécessaire pour obtenir un transfert complet.

Il en résulte l'obtention d'une membrane pourvu de protéines qui peuvent être préalablement révélées dans leur globalité à l'aide d'une solution de rouge ponceau (Sigma), puis rincée à l'eau distillée. Ensuite, la membrane est lavée deux fois dans du TBS-0.1% Tween (TBS-T) pour éliminer le rouge ponceau et ainsi poursuivre sur une étape de saturation avec 5% (poids/volume) de lait en poudre écrémé (Régilait) dissout dans du TBS-T, à température ambiante et sous agitation constante. Au bout d'une heure de saturation, la membrane est lavée 3 fois dans du TBS-T, et ainsi prête à être incubée en présence d'un anticorps primaire (dilué dans 5% BSA/TBS-T selon le tableau 10) dirigé contre la protéine d'intérêt. L'incubation avec l'anticorps primaire a lieu toute la nuit à 4°C en chambre froide, exceptée pour l'actine (1 heure à température ambiante). Les anticorps primaires sont généralement gardés à 4°C ou -20°C pour être utilisés au moins 2 ou 3 fois. Les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes avec du TBS-T puis incubées pendant 1 heure à température ambiante sous agitation en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase [peroxidase goat anti-mouse IgG (H+L), peroxidase goat anti-rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch, et peroxidase donkey anti-goat IgG, Santa Cruz Biotechnology] dilué au 1/10000 (anti-mouse et anti-rabbit) et 1/1000 (anti-goat) dans 5% de lait/TBS-T. A la fin de l'incubation, les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes dans le tampon TBS-T, et les protéines révélées par chimioluminescence en utilisant comme solution soit le « Western lightning Plus-ECL » (Perkin Elmer) ou le « ECL™ Western Blotting Detection Reagents » (GE Healthcare). Les signaux de luminescence sont capturés à l'abri de la lumière sur un film d'autoradiographie (Hyperfilm™, GE Healthcare) et révélés en passant les films dans une développeuse Curix 60 (AGFA HealthCare).

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	Anticorps	Dilution	Anticorps secondaire HRP
Actine	42	Sigma (#A1978)	1/5000	Souris
Chk1 Ser345	56	Cell Signaling (#2348)	1/2000	Lapin
Chk1	56	Santa Cruz (#sc-8408)	1/200	Souris
R1	90	Cell Signaling (#3388)	1/1000	Lapin
R2	46	Calbiochem (#PC540)	1/100	Lapin
p53R2	39	Abcam (#ab8105)	1/1000	Lapin
ORC2	70	Santa Cruz (#sc-28742)	1/300	Lapin
MCM2	125	Cell Signaling (#3619)	1/1000	Lapin
Cdc45	65	Cell Signaling (#3673)	1/1000	Lapin
PCNA	36	Santa Cruz (#sc-56)	1/1000	Souris
RPA32	32	Abcam (#ab2626)	1/2500	Lapin
MCM2 (S40/S41)	110	Bethyl (#A300-788A)	1/2500	Lapin
Cdc7	55	Novus (#NB120-10535)	1/5000	Souris
Dbf4	76	Novus (#NBP1-68173)	1/10000	Lapin
Cdc6	62	Novus (#NB200-581)	1/100	Souris
ATR	250	Santa Cruz (#sc-1887)	1/300	Chèvre
Lamine A/C	69/62	Santa Cruz (#sc-376248)	1/300	Souris
GAPDH	37	Santa Cruz (#sc-137179)	1/300	Souris

Tableau 10 : Liste des différents anticorps primaires utilisés au cours de cette étude.

8. Peignage moléculaire

i. Silanisation des lamelles

Des lamelles carrées de 22x22mm (Menzel Gläser) sont déposées sur un portoir en téflon. Avant traitement, l'ensemble des lamelles est nettoyé tout d'abord dans un bain d'acétone pur, puis dans un bain de méthanol pur soumis pendant 20 minutes à une sonication (Diagenode Bioruptor) à une fréquence modérée pour éliminer toutes impuretés. Ensuite, les lamelles sont séchées dans un four à 110°C pendant 1 heure, puis remises à température ambiante pendant 15 minutes. Dans un second temps, les lamelles sont baignées au sein d'un dessiccateur dans une solution de triméthoxy (7-octen-1-yl) silane (80%, Sigma-Aldrich) diluée au 1/1000 dans de l'heptane pur (Sigma-Aldrich) durant toute la nuit, sous vide, pour éviter une polymérisation du silane. Le lendemain, des étapes successives de sonication à basse fréquence de 5 minutes chacune sont réalisées dans l'heptane pur, heptane/éthanol (1 :1, vol :vol), éthanol pur, puis dans l'eau ultra-pure. La silanisation se termine par un séchage des lamelles à température ambiante et à l'abri de tous volatiles (particules de poussière). Le stockage a lieu dans des boîtes hermétiques à l'abri de la lumière.

ii. Peignage

Les cellules MRC5Vi asynchrones sontensemencées à 5.10^5 à J-1 dans des boîtes rondes de 40 mm de diamètre pour obtenir à J0 des cellules en phase exponentielle de croissance. Pour la synchronisation à l'APC, les cellules sontensemencées à J-2 à une densité de $2,5.10^5$ et l'APC est ajoutée à J-1. A J0, et en fonction de la condition expérimentale choisie, les cellules sont d'abord 1) incubées en présence d'IdU, 2) irradiées puis 3) incubées en présence de CldU, ou bien elles sont d'abord 1) irradiées puis 2) incubées en présence successivement d'IdU et de CldU. L'incubation en présence des analogues de bases (à une concentration finale de 100 μ M) se fait pendant 30 ou 40 minutes. Entre chaque incubation, les cellules sont rincées rapidement avec du milieu complet. A la fin de l'incubation avec le CldU et pour permettre une réplication sans analogue de base, les cellules sont incubées avec 1 mM de thymidine (Sigma) pendant 30 minutes à 37°C. Le marquage de l'ADN cellulaire par l'IdU et le CldU se fait soit immédiatement, 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 4 heures post-UVA. Pour arrêter les expériences, les cellules sont lavées dans le PBS 1X, trypsinées, et éventuellement grattées, centrifugées et remises en suspension dans du PBS 1X. La concentration des cellules se détermine par comptage à l'aide d'un cellomètre (Auto T4, Nexcelom Biosciences, Ozyme). La suspension cellulaire est centrifugée de nouveau et les cellules remises en suspension dans de la

trypsine à une concentration de 4.10^3 ou 2.10^3 cellules asynchrones/ μl ou 2.10^3 ou 1.10^3 cellules synchronisées/ μl . Cinquante microlitres de suspension cellulaire sont mélangés à 50 μl d'agarose « low melting » 1.2% (Agarose, type VII, Sigma-Aldrich) préalablement fondue et maintenue dans un bain-marie à 42°C. Chaque mélange « suspension cellulaire+agarose » (soit 100 μl) est coulé dans le puit d'un moule et le tout placé 30 minutes à 4°C pour rendre compacte l'agarose et faciliter ainsi la manipulation des petits morceaux de gel nommés « plugs ». Les « plugs » sont incubés 1 heure dans une solution hautement saline (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 M NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 0.2% NP40) à 4°C avec une légère agitation. Les cellules sont déprotéinisées en incubant les plugs pendant 48 heures à 42°C dans un tampon PK (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA pH8, 0.5% SDS, 0.4 mg/ml de protéinase K (Euromedex) avec un renouvellement de l'enzyme au bout de 24 heures. Les « plugs » sont lavés 3 fois 30 minutes dans du TNE50 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8) à température ambiante. A ce stade, soit les « plugs » sont stockés dans 0,5 M EDTA pH 8 à 4°C pour une utilisation ultérieure, soit ils sont fondus dans un tube eppendorf de 2mL contenant 1.5 ml de MES-E (150 mM MES pH 5.7, 1 mM EDTA pH 8) à 68°C pendant 30 minutes. A partir du moment où l'ADN se retrouve en solution, il faut éviter toute manipulation de pipetage qui pourrait engendrer des cassures de l'ADN. Avant l'étape finale de peignage, l'agarose fondu contenu dans la solution d'ADN est digérée par l'ajout de 500 μl de MES-E contenant 1,5 μl de β -agarase (New England Biolabs) pendant 48 heures à 42°C avec l'ajout additionnel de 1,5 μl d'enzyme au bout de 24 heures d'incubation. Les molécules d'ADN sont peignées sur une lamelle de verre silanisée le jour-même ou bien la solution est stockée à 4°C de plusieurs jours à plusieurs semaines. Le peignage de l'ADN est réalisé par le biais d'un appareillage spécifique (Molecular Combing System, Bio-Rad) qui permet d'étirer à vitesse constante (300 $\mu\text{m}/\text{sec}$) et ainsi obtenir un facteur d'extension de 2 kb/ μm . La lamelle peignée est ensuite incubée toute la nuit dans un four à 60°C dans le but que la déshydratation facilite l'accrochage irréversible de l'ADN à la surface de verre silanisée.

iii.Immunofluorescence

Les lamelles peignées sont remises à température ambiante 15 minutes avant l'étape de dénaturation de 15 minutes dans une solution contenant 0,5 M NaOH et 1 M NaCl, sous agitation douce. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS 1X. L'immuno-marquage de chaque lamelle débute par l'ajout de 25 μl d'une solution BlockAid (Invitrogen) contenant les anticorps primaires mouse anti-BrdU pour révéler l'IdU (dilution 1/5, BD Biosciences, #556028) et rat anti-BrdU pour révéler le CldU (dilution 1/25, AbD Serotec, #OBT0030). Les lamelles

sont incubées pendant 1 heure à température ambiante puis lavées 3 fois 5 minutes avec du PBS 1X. La révélation des anticorps primaires se fait par ajout de 25 µl d'une solution BlockAid contenant les anticorps secondaires goat anti-mouse Alexa 488 (dilution 1/25, Invitrogen, #A11029) et goat anti-rat Alexa 555 (dilution 1/25, Invitrogen, #A21434). L'incubation se fait pendant 30 minutes à température ambiante. L'ADN simple-brin est révélé par ajout de 25 µl d'une solution Blockaid contenant l'anticorps mouse anti-ssDNA (dilution 1/100, Millipore, #MAB3034). Après une incubation de 45 minutes à température ambiante, les lamelles sont lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X. L'anticorps primaire est révélé en incubant successivement les lamelles pendant 30 minutes à température ambiante avec 25 µl d'une solution d'anticorps secondaires dilués au 1/50 dans du BlockAid (1^{er} anticorps = Rabbit anti-mouse Alexa 350, Invitrogen, #A21062 et 2^{ème} anticorps = goat anti-rabbit Alexa 350, Invitrogen, #A21068). Après les dernières étapes de lavage (3 fois 5 minutes dans PBS 1X), les lamelles sont montées sur lames en utilisant du milieu de montage (Mounting media Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen, #P36930). Une fois la lamelle montée, cette dernière peut être stockée à l'abri de la lumière et à 4°C.

iv.Acquisition des images

L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope 3D (Leica DM RXA + caméra Cool SNAP HQ) complété d'un objectif 40X à immersion et d'une platine motorisée. Après avoir réglé les paramètres d'acquisition, en particulier la mise au point de chacun des filtres sous Métamorph (Rhodamine pour l'émission de fluorescence à 555 nm, FITC pour l'émission à 488 nm et DAPI pour l'émission à 350 nm), un programme permettant une prise automatique de 100 photos successives est lancé.

9. Dosage des dNTPs par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)

i.Préparation des échantillons

Les cellules sontensemencées à 5×10^5 cellules par boîte de 10 cm de diamètre à J-4 avant l'irradiation:

a) pour doser les dNTPs, les cellules sont incubées à J-1 en présence d'APC. Le jour J, environ 4.10^6 cellules sont lavées 2 fois avec du milieu frais pour éliminer l'agent de synchronisation et relâchées pendant 4 heures pour obtenir des cellules en milieu de phase S (condition S4R). A ce moment-ci, les cellules sont irradiées ou non aux UVA (en présence ou non de NaN_3), puis récoltées immédiatement ou remises en culture pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 4 heures.

b) pour doser le BrdU et le BrdUTP : au jour J, les cellules asynchrones sont irradiées ou non, remises en culture pendant 4 heures, puis incubées 30 minutes avec $10 \mu\text{M}$ de BrdU. Le contrôle interne correspond à un échantillon cellulaire non irradié et ne contenant aucune trace de BrdU.

Pour chaque condition, les cellules sont rincées avec du PBS 1X, trypsinées, comptées, et centrifugées. Après avoir éliminé le surnageant, les culots cellulaires sont lavés une fois avec du PBS 1X et remis en suspension (15'' de vortex) dans $500 \mu\text{l}$ de méthanol 60% froid. Puis ils sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et stockés jusqu'au dosage à -80°C .

ii.Dosage des dNTPs

Le dosage du pool des 4 dNTPs (dATP, dGTP, dCTP et TTP) est réalisé par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS) selon la méthode décrite par Cohen et al. (Cohen et al, 2009).

iii.Dosage du BrdU et BrdUTP

En ce qui concerne le dosage du BrdUTP, la méthode employée est identique à celle utilisée pour doser les dNTPs (Cohen et al, 2009). En revanche, le dosage du BrdU a été réalisé en accord avec les instructions publiées pour quantifier le 5-FU et ses métabolites (Cohen et al, 2010).

10. Analyse des données brutes

i. Traitement des images par Image J

A l'issue de l'acquisition des images, il est possible de créer une mosaïque de l'ensemble des photos acquises par l'intermédiaire du logiciel Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.) pourvu du plugin « Stitch grid of images » développé par Stephan Preibisch. Ainsi, une analyse des distincts paramètres de réplication (vitesse de fourches, asymétrie/symétrie de fourches et densité des origines actives) peut être mise en œuvre. Les données obtenues à partir du marquage IdU (vert) ne prennent en compte que les événements de réplication précoces (c'est-à-dire ceux où l'origine a été activée avant que n'ait eu lieu l'incorporation de l'IdU d'où une absence de marquage entre les deux signaux verts), alors que ceux issus du second marquage CldU (rouge) comptabilisent à la fois les événements de réplication précoces et intermédiaires. Les signaux issus de l'activation d'origines tardives sont exclus de l'analyse car ce sont des événements rares.

ii. Quantification des dNTPs

La concentration de chaque dNTP (dATP, dGTP, dCTP, TTP) endogène est calculée à partir d'une gamme étalon (courbe de calibration) de leur analogue marqué avec un isotope stable, et est exprimée en pmoles/ 10^6 cellules. Si indiqué, les valeurs de dNTPs obtenues à partir des échantillons irradiés sont normalisées par rapport à celle de l'échantillon non irradié, en utilisant pour ce dernier une valeur de référence égale à 1.

11. Test statistique

Pour évaluer la significativité de la vitesse des fourches entre des échantillons non irradié et irradié, un test Mann Whitney est réalisé semi-manuellement à partir de l'adresse : <http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>. La différence est hautement significative lorsque $P < 0,001$ (symbolisé par *); mais ne l'est pas si $P \geq 0,05$ (symbolisé par **) ou $P < 0,01$.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**: 2177-2196
- Afaq F, Mukhtar H (2001) Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B* **63**: 61-69
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4954-4959
- Aggarwal BD, Calvi BR (2004) Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* **430**: 372-376
- Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204-217
- Alabert C, Groth A (2012) Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 153-167
- Aladjem MI, Rodewald LW, Kolman JL, Wahl GM (1998) Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science* **281**: 1005-1009
- Allemand JF, Bensimon D, Jullien L, Bensimon A, Croquette V (1997) pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys J* **73**: 2064-2070
- Allen C, Ashley AK, Hromas R, Nickoloff JA (2011) More forks on the road to replication stress recovery. *J Mol Cell Biol* **3**: 4-12
- Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M (2003) Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* **114**: 385-394
- Araki H (2011) Initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotic cells; contribution of yeast genetics to the elucidation. *Genes Genet Syst* **86**: 141-149
- Autier P, Dore JF, Eggermont AM, Coebergh JW (2011) Epidemiological evidence that UVA radiation is involved in the genesis of cutaneous melanoma. *Curr Opin Oncol* **23**: 189-196
- Bae SH, Bae KH, Kim JA, Seo YS (2001) RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature* **412**: 456-461
- Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Baumler W (2006) Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J* **91**: 1452-1459
- Balakrishnan L, Bambara RA (2011) Eukaryotic lagging strand DNA replication employs a multi-pathway mechanism that protects genome integrity. *J Biol Chem* **286**: 6865-6870
- Balogh TS, Velasco MV, Pedriali CA, Kaneko TM, Baby AR (2011) Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. *An Bras Dermatol* **86**: 732-742
- Banfalvi G (2011) Overview of cell synchronization. *Methods Mol Biol* **761**: 1-23

- Banrud H, Stokke T, Moan J, Berg K (1995) S phase arrest and induction of multinucleated cells after exposure to ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* **16**: 1087-1094
- Banyasz A, Vaya I, Changenet-Barret P, Gustavsson T, Douki T, Markovitsi D (2011) Base pairing enhances fluorescence and favors cyclobutane dimer formation induced upon absorption of UVA radiation by DNA. *J Am Chem Soc* **133**: 5163-5165
- Baran N, Lapidot A, Manor H (1991) Formation of DNA triplexes accounts for arrests of DNA synthesis at d(TC)_n and d(GA)_n tracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 507-511
- Baysal V, Sahin F, Erel A, Oruk S, Menevse S (2003) The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. *J Dermatolog Treat* **14**: 22-25
- Bell SP (2002) The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev* **16**: 659-672
- Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374
- Bell SP, Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128-134
- Ben-Yehoyada M, Gautier J, Dupre A (2007) The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair (Amst)* **6**: 914-922
- Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, Croquette V, Heslot F, Bensimon D (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* **265**: 2096-2098
- Bensimon D, Simon AJ, Croquette VV, Bensimon A (1995) Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models. *Phys Rev Lett* **74**: 4754-4757
- Berbenetz NM, Nislow C, Brown GW (2010) Diversity of eukaryotic DNA replication origins revealed by genome-wide analysis of chromatin structure. *PLoS Genet* **6**
- Berezney R, Dubey DD, Huberman JA (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* **108**: 471-484
- Bermejo R, Lai MS, Foiani M (2012) Preventing replication stress to maintain genome stability: resolving conflicts between replication and transcription. *Mol Cell* **45**: 710-718
- Bermudez VP, Farina A, Raghavan V, Tappin I, Hurwitz J (2011) Studies on human DNA polymerase epsilon and GINS complex and their role in DNA replication. *J Biol Chem* **286**: 28963-28977
- Besaratinia A, Kim SI, Bates SE, Pfeifer GP (2007) Riboflavin activated by ultraviolet A1 irradiation induces oxidative DNA damage-mediated mutations inhibited by vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5953-5958
- Besaratinia A, Synold TW, Chen HH, Chang C, Xi B, Riggs AD, Pfeifer GP (2005) DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10058-10063

- Besaratinia A, Yoon JI, Schroeder C, Bradforth SE, Cockburn M, Pfeifer GP (2011) Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J* **25**: 3079-3091
- Besnard E, Babled A, Lapasset L, Milhavet O, Parrinello H, Dantec C, Marin JM, Lemaitre JM (2012) Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 837-844
- Binz SK, Sheehan AM, Wold MS (2004) Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1015-1024
- Biverstal A, Johansson F, Jenssen D, Erixon K (2008) Cyclobutane pyrimidine dimers do not fully explain the mutagenicity induced by UVA in Chinese hamster cells. *Mutat Res* **648**: 32-39
- Bjorklund S, Skog S, Tribukait B, Thelander L (1990) S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* **29**: 5452-5458
- Blow JJ, Ge XQ, Jackson DA (2011) How dormant origins promote complete genome replication. *Trends Biochem Sci* **36**: 405-414
- Blumenthal AB, Kriegstein HJ, Hogness DS (1974) The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**: 205-223
- Boos D, Sanchez-Pulido L, Rappas M, Pearl LH, Oliver AW, Ponting CP, Diffley JF (2011) Regulation of DNA replication through Sld3-Dpb11 interaction is conserved from yeast to humans. *Curr Biol* **21**: 1152-1157
- Borsuk E, Czolowska R (2010) Factors engaged in reactivation of DNA replication in the nuclei of growing mouse oocytes introduced into the cytoplasm of parthenogenetic one-cell embryos. *Int J Dev Biol* **54**: 21-31
- Boulton S, Anderson A, Swalwell H, Henderson JR, Manning P, Birch-Machin MA (2011) Implications of using the fluorescent probes, dihydrorhodamine 123 and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, for the detection of UVA-induced reactive oxygen species. *Free Radic Res* **45**: 139-146
- Bozzoni I, Baldari CT, Amaldi F, Buongiorno-Nardelli M (1981) Replication of ribosomal DNA in *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* **118**: 585-590
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 208-219
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10124-10128
- Brem R, Karran P (2012) Multiple forms of DNA damage caused by UVA photoactivation of DNA 6-thioguanine. *Photochem Photobiol* **88**: 5-13

- Brewer BJ (1994) Intergenic DNA and the sequence requirements for replication initiation in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 196-202
- Broderick R, Nasheuer HP (2009) Regulation of Cdc45 in the cell cycle and after DNA damage. *Biochem Soc Trans* **37**: 926-930
- Brown EJ, Baltimore D (2003) Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev* **17**: 615-628
- Bruls WA, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L (1984) Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* **40**: 485-494
- Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A (2008) Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* **44**: 927-929
- Budai M, Reynaud-Angelin A, Szabo Z, Toth S, Ronto G, Sage E, Grof P (2004) Effect of UVA radiation on membrane fluidity and radical decay in human fibroblasts as detected by spin labeled stearic acids. *J Photochem Photobiol B* **77**: 27-38
- Bulteau AL, Moreau M, Nizard C, Friguet B (2002) Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* **32**: 1157-1170
- Burhans WC, Weinberger M (2007) DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res* **35**: 7545-7556
- Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**: 1040-1052
- Cadet J, Douki T, Frelon S, Sauvaigo S, Pouget JP, Ravanat JL (2002) Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med* **33**: 441-449
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Di Mascio P (2009) Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem Photobiol Sci* **8**: 903-911
- Cadoret JC, Meisch F, Hassan-Zadeh V, Luyten I, Guillet C, Duret L, Quesneville H, Prioleau MN (2008) Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15837-15842
- Camier S, Ma E, Leroy C, Pruvost A, Toledano M, Marsolier-Kergoat MC (2007) Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radic Biol Med* **42**: 1008-1016
- Campbell JL (1993) Yeast DNA replication. *J Biol Chem* **268**: 25261-25264
- Casas-Delucchi CS, Cardoso MC (2011) Epigenetic control of DNA replication dynamics in mammals. *Nucleus* **2**: 370-382

- Cayrou C, Coulombe P, Puy A, Rialle S, Kaplan N, Segal E, Mechali M (2012) New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle* **11**: 658-667
- Cayrou C, Coulombe P, Vigneron A, Stanojcic S, Ganier O, Peiffer I, Rivals E, Puy A, Laurent-Chabalier S, Desprat R, Mechali M (2011) Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Res* **21**: 1438-1449
- Cerqueira NM, Fernandes PA, Ramos MJ (2007) Ribonucleotide reductase: a critical enzyme for cancer chemotherapy and antiviral agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**: 11-29
- Chabes A, Georgieva B, Domkin V, Zhao X, Rothstein R, Thelander L (2003a) Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**: 391-401
- Chabes AL, Bjorklund S, Thelander L (2004) S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem* **279**: 10796-10807
- Chabes AL, Pflieger CM, Kirschner MW, Thelander L (2003b) Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3925-3929
- Chadwick CA, Potten CS, Nikaido O, Matsunaga T, Proby C, Young AR (1995) The detection of cyclobutane thymine dimers, (6-4) photolesions and the Dewar photoisomers in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects. *J Photochem Photobiol B* **28**: 163-170
- Chen P, Liu Z, Liu S, Xie Z, Aimiwu J, Pang J, Klisovic R, Blum W, Grever MR, Marcucci G, Chan KK (2009) A LC-MS/MS method for the analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels. *Pharm Res* **26**: 1504-1515
- Chen S, de Vries MA, Bell SP (2007) Orc6 is required for dynamic recruitment of Cdt1 during repeated Mcm2-7 loading. *Genes Dev* **21**: 2897-2907
- Chevalier S, Blow JJ (1996) Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 815-821
- Choi JH, Lindsey-Boltz LA, Kemp M, Mason AC, Wold MS, Sancar A (2010) Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 13660-13665
- Cimprich KA, Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 616-627
- Clayton DA (2003) Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life* **55**: 213-217
- Cohen S, Jordheim LP, Megherbi M, Dumontet C, Guitton J (2010) Liquid chromatographic methods for the determination of endogenous nucleotides and nucleotide analogs used in cancer therapy: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**: 1912-1928

- Cohen S, Megherbi M, Jordheim LP, Lefebvre I, Perigaud C, Dumontet C, Guitton J (2009) Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 3831-3840
- Conner AL, Aladjem MI (2012) The chromatin backdrop of DNA replication: Lessons from genetics and genome-scale analyses. *Biochim Biophys Acta* **1819**: 794-801
- Conti C, Leo E, Eichler GS, Sordet O, Martin MM, Fan A, Aladjem MI, Pommier Y (2010) Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage. *Cancer Res* **70**: 4470-4480
- Conti C, Seiler JA, Pommier Y (2007) The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses. *Cell Cycle* **6**: 2760-2767
- Courbet S, Gay S, Arnoult N, Wronka G, Anglana M, Brison O, Debatisse M (2008) Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* **455**: 557-560
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* **4**: 836-844
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2004) Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat Res* **556**: 135-142
- D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Pagano M (2012) Cyclin F-Mediated Degradation of Ribonucleotide Reductase M2 Controls Genome Integrity and DNA Repair. *Cell* **149**: 1023-1034
- Daboussi F, Courbet S, Benhamou S, Kannouche P, Zdzienicka MZ, Debatisse M, Lopez BS (2008) A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *J Cell Sci* **121**: 162-166
- Dardalhon D, Angelin AR, Baldacci G, Sage E, Francesconi S (2008) Unconventional effects of UVA radiation on cell cycle progression in *S. pombe*. *Cell Cycle* **7**: 611-622
- Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, Vaisica JA, Thevakumaran N, Marjavaara L, Myers CL, Chabes A, Shirahige K, Brown GW (2012) Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J* **31**: 895-907
- Davies MJ (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 761-770
- De Fabo EC, Noonan FP, Fears T, Merlino G (2004) Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res* **64**: 6372-6376
- de Gruijl FR (1999) Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* **35**: 2003-2009

- de Laat A, van der Leun JC, de Gruijl FR (1997) Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice. *Carcinogenesis* **18**: 1013-1020
- de Laat A, van Tilburg M, van der Leun JC, van Vloten WA, de Gruijl FR (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol* **63**: 492-497
- De Piccoli G, Katou Y, Itoh T, Nakato R, Shirahige K, Labib K (2012) Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol Cell* **45**: 696-704
- Decosterd LA, Cottin E, Chen X, Lejeune F, Mirimanoff RO, Biollaz J, Coucke PA (1999) Simultaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **270**: 59-68
- Delmolino LM, Saha P, Dutta A (2001) Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. *J Biol Chem* **276**: 26947-26954
- DePamphilis ML (1993) Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 434-441
- DePamphilis ML (2003) The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* **310**: 1-15
- Dereli-Oz A, Versini G, Halazonetis TD (2011) Studies of genomic copy number changes in human cancers reveal signatures of DNA replication stress. *Mol Oncol* **5**: 308-314
- Desany BA, Alcasabas AA, Bachant JB, Elledge SJ (1998) Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* **12**: 2956-2970
- Despras E, Daboussi F, Hyrien O, Marheineke K, Kannouche PL (2010) ATR/Chk1 pathway is essential for resumption of DNA synthesis and cell survival in UV-irradiated XP variant cells. *Hum Mol Genet* **19**: 1690-1701
- Dhar SK, Delmolino L, Dutta A (2001) Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* **276**: 29067-29071
- Didier C, Emonet-Piccardi N, Beani JC, Cadet J, Richard MJ (1999) L-arginine increases UVA cytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line: potential role of nitric oxide. *FASEB J* **13**: 1817-1824
- Diffey BL (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* **28**: 4-13
- Diffley JF (2010) The many faces of redundancy in DNA replication control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **75**: 135-142
- Diffley JF (2011) Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 3545-3553

- Dorn ES, Cook JG (2011) Nucleosomes in the neighborhood: new roles for chromatin modifications in replication origin control. *Epigenetics* **6**: 552-559
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003) Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* **42**: 9221-9226
- Drobetsky EA, Turcotte J, Chateauneuf A (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2350-2354
- Drosopoulos WC, Kosiyatrakul ST, Yan Z, Calderano SG, Schildkraut CL (2012) Human telomeres replicate using chromosome-specific, rather than universal, replication programs. *J Cell Biol* **197**: 253-266
- Drouin R, Lemieux N, Richer CL (1990) Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma* **99**: 273-280
- Duncker BP, Chesnokov IN, McConkey BJ (2009) The origin recognition complex protein family. *Genome Biol* **10**: 214
- Eklund H, Uhlin U, Farnegardh M, Logan DT, Nordlund P (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* **77**: 177-268
- Emri G, Wenczl E, Van Erp P, Jans J, Roza L, Horkay I, Schothorst AA (2000) Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J Invest Dermatol* **115**: 435-440
- Epe B (2012) DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochem Photobiol Sci* **11**: 98-106
- Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* **238**: 223-233
- Eydmann T, Sommariva E, Inagawa T, Mian S, Klar AJ, Dalgaard JZ (2008) Rtf1-mediated eukaryotic site-specific replication termination. *Genetics* **180**: 27-39
- Fachinetti D, Bermejo R, Cocito A, Minardi S, Katou Y, Kanoh Y, Shirahige K, Azvolinsky A, Zakian VA, Foiani M (2010) Replication termination at eukaryotic chromosomes is mediated by Top2 and occurs at genomic loci containing pausing elements. *Mol Cell* **39**: 595-605
- Fenech M (2002) Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* **181-182**: 411-416
- Ferraro P, Franzolin E, Pontarin G, Reichard P, Bianchi V (2010) Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res* **38**: e85
- Foote CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* **54**: 659
- Forsburg SL (2004) Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 109-131

- Forsburg SL (2008) The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochem Soc Trans* **36**: 114-119
- Fotouhi A, Skiold S, Shakeri-Manesh S, Osterman-Golkar S, Wojcik A, Jenssen D, Harms-Ringdahl M, Haghdoost S (2011) Reduction of 8-oxodGTP in the nucleotide pool by hMTH1 leads to reduction in mutations in the human lymphoblastoid cell line TK6 exposed to UVA. *Mutat Res* **715**: 13-18
- Fourtanier A, Moyal D, Seite S (2012) UVA filters in sun-protection products: regulatory and biological aspects. *Photochem Photobiol Sci* **11**: 81-89
- Franchitto A, Pichierra P (2011) Understanding the molecular basis of common fragile sites instability: role of the proteins involved in the recovery of stalled replication forks. *Cell Cycle* **10**: 4039-4046
- Francis LI, Randell JC, Takara TJ, Uchima L, Bell SP (2009) Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2-7 helicase for Cdc7-Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev* **23**: 643-654
- Frederick JE, Snell HE, E.K. H (1989) Solar ultraviolet radiation at the Earth's surface. *Photochem Photobiol* **50**: 443-450
- Gaboriau F, Morliere P, Marquis I, Moysan A, Geze M, Dubertret L (1993) Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem Photobiol* **58**: 515-520
- Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**: 358-366
- Gao F, Luo H, Zhang CT (2012) DeOri: a database of eukaryotic DNA replication origins. *Bioinformatics* **28**: 1551-1552
- Ge XQ, Blow JJ (2010) Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* **191**: 1285-1297
- Ge XQ, Jackson DA, Blow JJ (2007) Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. *Genes Dev* **21**: 3331-3341
- Gilbert DM (2007) Replication origin plasticity, Taylor-made: inhibition vs recruitment of origins under conditions of replication stress. *Chromosoma* **116**: 341-347
- Gilbert DM, Miyazawa H, DePamphilis ML (1995) Site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extract requires nuclear structure. *Mol Cell Biol* **15**: 2942-2954
- Gillespie PJ, Blow JJ (2010) Clusters, factories and domains: The complex structure of S-phase comes into focus. *Cell Cycle* **9**: 3218-3226
- Girard PM, Francesconi S, Pozzebon M, Graindorge D, Rochette PJ, Drouin R, Sage E (2011) UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes. *Journal of Physics: Conference Series* **261**

- Girard PM, Pozzebon M, Delacote F, Douki T, Smirnova V, Sage E (2008) Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* **7**: 1500-1516
- Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* **63**: 103-113
- Girotti AW, Kriska T (2004) Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal* **6**: 301-310
- Gon S, Beckwith J (2006) Ribonucleotide reductases: influence of environment on synthesis and activity. *Antioxid Redox Signal* **8**: 773-780
- Gon S, Napolitano R, Rocha W, Coulon S, Fuchs RP (2011) Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 19311-19316
- Gorman AA, Rodgers MA (1992) Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photochem Photobiol B* **14**: 159-176
- Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M (2012) Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci*
- Griffiths TD, Taft SA, Ling SY (1990) Effect of UV light on DNA replication and chain elongation in Chinese hamster UV61 cells. *Mutat Res* **236**: 51-58
- Grof P, Ronto G, Sage E (2002) A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight. *J Photochem Photobiol B* **68**: 53-59
- Gueroi Z, Place C, Freyssingeas E, Berge B (2002) Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6005-6010
- Gurer H, Ercal N (2000) Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* **29**: 927-945
- Hakansson P, Hofer A, Thelander L (2006) Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* **281**: 7834-7841
- Halliday GM, Agar NS, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Jones AM (2005) UV-A fingerprint mutations in human skin cancer. *Photochem Photobiol* **81**: 3-8
- Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* **16**: 33-50
- Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* **31**: 261-272
- Heffernan TP, Unsal-Kacmaz K, Heinloth AN, Simpson DA, Paules RS, Sancar A, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK (2007) Cdc7-Dbf4 and the human S checkpoint response to UVC. *J Biol Chem* **282**: 9458-9468

- Heichinger C, Penkett CJ, Bahler J, Nurse P (2006) Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J* **25**: 5171-5179
- Heller RC, Kang S, Lam WM, Chen S, Chan CS, Bell SP (2011) Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell* **146**: 80-91
- Herrick J, Bensimon A (1999a) Imaging of single DNA molecule: applications to high-resolution genomic studies. *Chromosome Res* **7**: 409-423
- Herrick J, Bensimon A (1999b) Single molecule analysis of DNA replication. *Biochimie* **81**: 859-871
- Herrick J, Stanislawski P, Hyrien O, Bensimon A (2000) Replication fork density increases during DNA synthesis in *X. laevis* egg extracts. *J Mol Biol* **300**: 1133-1142
- Hill HZ, Hill GJ (2000) UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. *Pigment Cell Res* **13 Suppl 8**: 140-144
- Holmberg C, Fleck O, Hansen HA, Liu C, Slaaby R, Carr AM, Nielsen O (2005) Ddb1 controls genome stability and meiosis in fission yeast. *Genes Dev* **19**: 853-862
- Holmgren A, Sengupta R (2010) The use of thiols by ribonucleotide reductase. *Free Radic Biol Med* **49**: 1617-1628
- Hua XH, Newport J (1998) Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. *J Cell Biol* **140**: 271-281
- Huang M, Kim JM, Shiotani B, Yang K, Zou L, D'Andrea AD (2010) The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response. *Mol Cell* **39**: 259-268
- Huang SN, Phelps MA, Swaan PW (2003) Involvement of endocytic organelles in the subcellular trafficking and localization of riboflavin. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 681-687
- Huang SW, Tzeng HF (2012) Simultaneous determination of deoxycytidine diphosphate and deoxycytidine triphosphate by capillary electrophoresis with transient isotachophoretic stacking: a sensitive monitoring method for ribonucleotide reductase activity. *Electrophoresis* **33**: 536-542
- Huberman JA, Riggs AD (1966) Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**: 599-606
- Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163
- Hultqvist M, Olsson LM, Gelderman KA, Holmdahl R (2009) The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol* **30**: 201-208
- Hyrien O (2000) Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* **82**: 5-17

- Ibuki Y, Toyooka T, Shirahata J, Ohura T, Goto R (2007) Water soluble fraction of solar-simulated light-exposed crude oil generates phosphorylation of histone H2AX in human skin cells under UVA exposure. *Environ Mol Mutagen* **48**: 430-439
- Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM (2006) Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol* **26**: 1098-1108
- Ikehata H, Ono T (2011) The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* **52**: 115-125
- Il'yasova D, Scarbrough P, Spasojevic I (2012) Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta* **413**: 1446-1453
- Im JS, Ki SH, Farina A, Jung DS, Hurwitz J, Lee JK (2009) Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 15628-15632
- Ito K, Inoue S, Yamamoto K, Kawanishi S (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J Biol Chem* **268**: 13221-13227
- Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T (2011) HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. *Cancer Res* **71**: 5621-5625
- Jackman J, O'Connor PM (2001) Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 8**: Unit 8 3
- Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* **140**: 1285-1295
- Jiang Y, Rabbi M, Kim M, Ke C, Lee W, Clark RL, Mieczkowski PA, Marszalek PE (2009) UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys J* **96**: 1151-1158
- Jones RM, Petermann E (2012) Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* **443**: 13-26
- Jordheim LP, Galmarini CM, Dumontet C (2005) [Metabolism, mechanism of action and resistance to cytotoxic nucleoside analogues]. *Bull Cancer* **92**: 239-248
- Kamiya H (2003) Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res* **31**: 517-531
- Kamiya H (2004) Mutagenicities of 8-hydroxyguanine and 2-hydroxyadenine produced by reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* **27**: 475-479
- Kamiya H (2010) Mutagenicity of oxidized DNA precursors in living cells: Roles of nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes, and translesion synthesis DNA polymerases. *Mutat Res* **703**: 32-36

- Kanke M, Kodama Y, Takahashi TS, Nakagawa T, Masukata H (2012) Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components. *EMBO J* **31**: 2182-2194
- Kannouche PL, Lehmann AR (2004) Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. *Cell Cycle* **3**: 1011-1013
- Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Runger TM (2006) Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol* **126**: 667-675
- Karnani N, Dutta A (2011) The effect of the intra-S-phase checkpoint on origins of replication in human cells. *Genes Dev* **25**: 621-633
- Karnani N, Taylor CM, Malhotra A, Dutta A (2010) Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection. *Mol Biol Cell* **21**: 393-404
- Kasai H (2002) Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* **33**: 450-456
- Katafuchi A, Nohmi T (2010) DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: their efficiency and template base preference. *Mutat Res* **703**: 24-31
- Katz EJ, Sirover MA (1987) DNA nucleotide excision-repair synthesis is independent of perturbations of deoxynucleoside triphosphate pool size. *Mutat Res* **183**: 249-256
- Kaufmann WK (2010) The human intra-S checkpoint response to UVC-induced DNA damage. *Carcinogenesis* **31**: 751-765
- Kaur M, Khan MM, Kar A, Sharma A, Saxena S (2012) CRL4-DDB1-VPRBP ubiquitin ligase mediates the stress triggered proteolysis of Mcm10. *Nucleic Acids Res*
- Kawanishi S, Hiraku Y (2001) Sequence-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous and exogenous photosensitizers. *Curr Probl Dermatol* **29**: 74-82
- Kelly TJ, Brown GW (2000) Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* **69**: 829-880
- Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 239-267
- Kobayashi T (2006) Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats--collaboration of recombination, cohesion, and condensation. *Genes Genet Syst* **81**: 155-161
- Kodadek T (1998) Mechanistic parallels between DNA replication, recombination and transcription. *Trends Biochem Sci* **23**: 79-83
- Kolberg M, Strand KR, Graff P, Andersson KK (2004) Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1699**: 1-34

- Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR (1991) Photoprotection by melanin. *J Photochem Photobiol B* **9**: 135-160
- Kossenjans W, Rymaszewski Z, Barankiewicz J, Bobst A, Ashraf M (1996) Menadione-induced oxidative stress in bovine heart microvascular endothelial cells. *Microcirculation* **3**: 39-47
- Kowalczyk CI, Priestner MC, Pearson AJ, Saunders RD, Bouffler SD (2006) Wavelength dependence of cellular responses in human melanocytes and melanoma cells following exposure to ultraviolet radiation. *Int J Radiat Biol* **82**: 781-792
- Kozmin S, Slezak G, Reynaud-Angelin A, Elie C, de Rycke Y, Boiteux S, Sage E (2005) UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13538-13543
- Kreitz S, Ritzi M, Baack M, Knippers R (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem* **276**: 6337-6342
- Krude T (2000) Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J Biol Chem* **275**: 13699-13707
- Krude T (2006) Initiation of chromosomal DNA replication in mammalian cell-free systems. *Cell Cycle* **5**: 2115-2122
- Kukimoto I, Igaki H, Kanda T (1999) Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* **265**: 936-943
- Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabes A (2011) Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res* **39**: 1360-1371
- Kumar D, Viberg J, Nilsson AK, Chabes A (2010) Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res* **38**: 3975-3983
- Kvam E, Tyrrell RM (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* **18**: 2379-2384
- Kvam E, Tyrrell RM (1999) The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol* **113**: 209-213
- Labit H, Goldar A, Guilbaud G, Douarche C, Hyrien O, Marheineke K (2008) A simple and optimized method of producing silanized surfaces for FISH and replication mapping on combed DNA fibers. *Biotechniques* **45**: 649-652, 654, 656-648
- Lafuente A, Molina R, Palou J, Castel T, Moral A, Trias M (1995) Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma. MMM group. Multidisciplinary Malignant Melanoma Group. *Br J Cancer* **72**: 324-326
- Lambert S, Carr AM (2005) Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* **87**: 591-602

- Lambert S, Froget B, Carr AM (2007) Arrested replication fork processing: interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair (Amst)* **6**: 1042-1061
- Lambert S, Mizuno K, Blaisonneau J, Martineau S, Chanet R, Freon K, Murray JM, Carr AM, Baldacci G (2010) Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol Cell* **39**: 346-359
- Lambert S, Watson A, Sheedy DM, Martin B, Carr AM (2005) Gross chromosomal rearrangements and elevated recombination at an inducible site-specific replication fork barrier. *Cell* **121**: 689-702
- Larsson P, Andersson E, Johansson U, Ollinger K, Rosdahl I (2005) Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. *Exp Dermatol* **14**: 117-123
- Lazzaro F, Novarina D, Amara F, Watt DL, Stone JE, Costanzo V, Burgers PM, Kunkel TA, Plevani P, Muzi-Falconi M (2012) RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol Cell* **45**: 99-110
- Lebofsky R, Bensimon A (2003) Single DNA molecule analysis: applications of molecular combing. *Brief Funct Genomic Proteomic* **1**: 385-396
- Lebofsky R, Heilig R, Sonnleitner M, Weissenbach J, Bensimon A (2006) DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells. *Mol Biol Cell* **17**: 5337-5345
- Leccia MT, Yaar M, Allen N, Gleason M, Gilchrest BA (2001) Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* **10**: 272-279
- Lee AY, Chiba T, Truong LN, Cheng AN, Do J, Cho MJ, Chen L, Wu X (2012) Dbf4 is direct downstream target of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) protein to regulate intra-S-phase checkpoint. *J Biol Chem* **287**: 2531-2543
- Lee EH, Kornberg A, Hidaka M, Kobayashi T, Horiuchi T (1989) Escherichia coli replication termination protein impedes the action of helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9104-9108
- Lengronne A, Pasero P, Bensimon A, Schwob E (2001) Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res* **29**: 1433-1442
- Levenson V, Hamlin JL (1993) A general protocol for evaluating the specific effects of DNA replication inhibitors. *Nucleic Acids Res* **21**: 3997-4004
- Ley RD (1997) Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in *Monodelphis domestica*. *Cancer Res* **57**: 3682-3684
- Ley RD, Fourtanier A (2000) UVAI-induced edema and pyrimidine dimers in murine skin. *Photochem Photobiol* **72**: 485-487

- Li CJ, DePamphilis ML (2002) Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol* **22**: 105-116
- Li F, Chen J, Solessio E, Gilbert DM (2003) Spatial distribution and specification of mammalian replication origins during G1 phase. *J Cell Biol* **161**: 257-266
- Li MY, Cline CS, Koker EB, Carmichael HH, Chignell CF, Bilski P (2001) Quenching of singlet molecular oxygen (1O_2) by azide anion in solvent mixtures. *Photochem Photobiol* **74**: 760-764
- Liang DT, Hodson JA, Forsburg SL (1999) Reduced dosage of a single fission yeast MCM protein causes genetic instability and S phase delay. *J Cell Sci* **112** (Pt 4): 559-567
- Liu X, Xue L, Yen Y (2008) Redox property of ribonucleotide reductase small subunit M2 and p53R2. *Methods Mol Biol* **477**: 195-206
- Locatelli GA, Pospiech H, Tanguy Le Gac N, van Loon B, Hubscher U, Parkkinen S, Syvaoja JE, Villani G (2010) Effect of 8-oxoguanine and abasic site DNA lesions on in vitro elongation by human DNA polymerase in the presence of replication protein A and proliferating-cell nuclear antigen. *Biochem J* **429**: 573-582
- Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P (2008) Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans* **36**: 1071-1076
- Lubelsky Y, Sasaki T, Kuipers MA, Lucas I, Le Beau MM, Carignon S, Debatisse M, Prinz JA, Dennis JH, Gilbert DM (2011) Pre-replication complex proteins assemble at regions of low nucleosome occupancy within the Chinese hamster dihydrofolate reductase initiation zone. *Nucleic Acids Res* **39**: 3141-3155
- Lutzmann M, Maiorano D, Mechali M (2006) A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus*. *EMBO J* **25**: 5764-5774
- Lutzmann M, Mechali M (2008) MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol Cell* **31**: 190-200
- MacAlpine HK, Gordan R, Powell SK, Hartemink AJ, MacAlpine DM (2010) *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res* **20**: 201-211
- MacNeill SA (2001) DNA replication: partners in the Okazaki two-step. *Curr Biol* **11**: R842-844
- Madronich S, McKenzie RL, Bjorn LO, Caldwell MM (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B* **46**: 5-19
- Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* **116**: 3051-3060
- Maga G, Stucki M, Spadari S, Hubscher U (2000) DNA polymerase switching: I. Replication factor C displaces DNA polymerase alpha prior to PCNA loading. *J Mol Biol* **295**: 791-801

- Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz LO (2003) Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res* **37**: 391-397
- Maiorano D, Cuvier O, Danis E, Mechali M (2005) MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* **120**: 315-328
- Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M (2006) MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 130-136
- Maresca V, Flori E, Briganti S, Camera E, Cario-Andre M, Taieb A, Picardo M (2006) UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. *J Invest Dermatol* **126**: 182-190
- Marheineke K, Hyrien O (2004) Control of replication origin density and firing time in *Xenopus* egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint. *J Biol Chem* **279**: 28071-28081
- Marheineke K, Hyrien O, Krude T (2005) Visualization of bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in a human cell free system. *Nucleic Acids Res* **33**: 6931-6941
- Marinsek N, Barry ER, Makarova KS, Dionne I, Koonin EV, Bell SD (2006) GINS, a central nexus in the archaeal DNA replication fork. *EMBO Rep* **7**: 539-545
- Masai H, You Z, Arai K (2005) Control of DNA replication: regulation and activation of eukaryotic replicative helicase, MCM. *IUBMB Life* **57**: 323-335
- Mathews CK (2006) DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J* **20**: 1300-1314
- McAmis WC, Schaeffer RC, Jr., Baynes JW, Wolf MB (2003) Menadione causes endothelial barrier failure by a direct effect on intracellular thiols, independent of reactive oxidant production. *Biochim Biophys Acta* **1641**: 43-53
- McCall MR, Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* **26**: 1034-1053
- Mechali M (2010) Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 728-738
- Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Alikoski J, Poswig A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (2001) Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med* **30**: 238-247
- Mendez J, Stillman B (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**: 8602-8612
- Mendez J, Stillman B (2003) Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays* **25**: 1158-1167

- Menon SG, Goswami PC (2007) A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* **26**: 1101-1109
- Merkel PB, Kearns DR (1972) Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J Am Chem Soc* **94**: 7244-7253
- Merwald H, Klosner G, Kokesch C, Der-Petrossian M, Honigsmann H, Trautinger F (2005) UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *J Photochem Photobiol B* **79**: 197-207
- Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP (2009) Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu Rev Genet* **43**: 335-367
- Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277**: 1518-1523
- Mimura S, Takisawa H (1998) Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *EMBO J* **17**: 5699-5707
- Miotto B, Struhl K (2008) HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev* **22**: 2633-2638
- Miotto B, Struhl K (2010) HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell* **37**: 57-66
- Miotto B, Struhl K (2011) JNK1 phosphorylation of Cdt1 inhibits recruitment of HBO1 histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress. *Mol Cell* **44**: 62-71
- Mitchell DL, Fernandez AA, Nairn RS, Garcia R, Paniker L, Trono D, Thames HD, Gimenez-Conti I (2010) Ultraviolet A does not induce melanomas in a Xiphophorus hybrid fish model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9329-9334
- Mizdrak J, Hains PG, Truscott RJ, Jamie JF, Davies MJ (2008) Tryptophan-derived ultraviolet filter compounds covalently bound to lens proteins are photosensitizers of oxidative damage. *Free Radic Biol Med* **44**: 1108-1119
- Monks TJ, Xie R, Tikoo K, Lau SS (2006) Ros-induced histone modifications and their role in cell survival and cell death. *Drug Metab Rev* **38**: 755-767
- Montanari M, Macaluso M, Cittadini A, Giordano A (2006) Role of geminin: from normal control of DNA replication to cancer formation and progression? *Cell Death Differ* **13**: 1052-1056
- Montaner B, O'Donovan P, Reelfs O, Perrett CM, Zhang X, Xu YZ, Ren X, Macpherson P, Frith D, Karran P (2007) Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *EMBO Rep* **8**: 1074-1079
- Mordes DA, Cortez D (2008) Activation of ATR and related PIKKs. *Cell Cycle* **7**: 2809-2812

- Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13765-13770
- Mouret S, Philippe C, Gracia-Chantegrel J, Banyasz A, Karpati S, Markovitsi D, Douki T (2010) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Org Biomol Chem* **8**: 1706-1711
- Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10236-10241
- Muzi-Falconi M, Giannattasio M, Foiani M, Plevani P (2003) The DNA polymerase alpha-primase complex: multiple functions and interactions. *ScientificWorldJournal* **3**: 21-33
- Nam EA, Cortez D (2011) ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* **436**: 527-536
- Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K (2002) Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 41-94
- Neeley WL, Essigmann JM (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* **19**: 491-505
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 220-228
- Nguyen VQ, Co C, Li JJ (2001) Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* **411**: 1068-1073
- Nicander B, Reichard P (1985) Relations between synthesis of deoxyribonucleotides and DNA replication in 3T6 fibroblasts. *J Biol Chem* **260**: 5376-5381
- Nichols JA, Katiyar SK (2010) Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* **302**: 71-83
- Nick McElhinny SA, Gordenin DA, Stith CM, Burgers PM, Kunkel TA (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell* **30**: 137-144
- Nick McElhinny SA, Kumar D, Clark AB, Watt DL, Watts BE, Lundstrom EB, Johansson E, Chabes A, Kunkel TA (2010) Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA. *Nat Chem Biol* **6**: 774-781
- Nieduszynski CA, Knox Y, Donaldson AD (2006) Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev* **20**: 1874-1879
- Niida H, Shimada M, Murakami H, Nakanishi M (2010) Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci* **101**: 2505-2509
- Nishitani H, Lygerou Z (2002) Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* **7**: 523-534

- Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T (2004) Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J Biol Chem* **279**: 30807-30816
- Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, Cadet J, Douki T, Mouret S, Tucker MA, Popratiloff A, Merlino G, De Fabo EC (2012) Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun* **3**: 884
- Nordlund P, Reichard P (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**: 681-706
- Norio P, Schildkraut CL (2001) Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes. *Science* **294**: 2361-2364
- North TW, Bestwick RK, Mathews CK (1980) Detection of activities that interfere with the enzymatic assay of deoxyribonucleoside 5'-triphosphates. *J Biol Chem* **255**: 6640-6645
- O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu YZ, Harwood CA, McGregor JM, Walker SL, Hanaoka F, Karran P (2005) Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* **309**: 1871-1874
- Odsbu I, Morigen, Skarstad K (2009) A reduction in ribonucleotide reductase activity slows down the chromosome replication fork but does not change its localization. *PLoS One* **4**: e7617
- Ohnaka T (1993) [Health effects of ultraviolet radiation]. *Ann Physiol Anthropol* **12**: 1-10
- Ohta S, Tatsumi Y, Fujita M, Tsurimoto T, Obuse C (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J Biol Chem* **278**: 41535-41540
- Ozeri-Galai E, Lebofsky R, Rahat A, Bester AC, Bensimon A, Kerem B (2011) Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. *Mol Cell* **43**: 122-131
- Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581-587
- Parplys AC, Petermann E, Petersen C, Dikomey E, Borgmann K (2012) DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. *Radiother Oncol* **102**: 466-471
- Pasero P, Bensimon A, Schwob E (2002) Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* **16**: 2479-2484
- Patel PK, Arcangioli B, Baker SP, Bensimon A, Rhind N (2006) DNA replication origins fire stochastically in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 308-316
- Pattison DI, Davies MJ (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*: 131-157
- Peak JG, Peak MJ (1990) Ultraviolet light induces double-strand breaks in DNA of cultured human P3 cells as measured by neutral filter elution. *Photochem Photobiol* **52**: 387-393

- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* **275**: 26732-26742
- Petermann E, Helleday T, Caldecott KW (2008) Claspin promotes normal replication fork rates in human cells. *Mol Biol Cell* **19**: 2373-2378
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010) Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16090-16095
- Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T, Wulf HC (2000) Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* **59**: 123-131
- Pfeifer GP, Besaratinia A (2012) UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* **11**: 90-97
- Phelps MA, Foraker AB, Gao W, Dalton JT, Swaan PW (2004) A novel rhodamine-riboflavin conjugate probe exhibits distinct fluorescence resonance energy transfer that enables riboflavin trafficking and subcellular localization studies. *Mol Pharm* **1**: 257-266
- Phillipson RP, Tobi SE, Morris JA, McMillan TJ (2002) UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. *Free Radic Biol Med* **32**: 474-480
- Picardo M, Grammatico P, Roccella F, Roccella M, Grandinetti M, Del Porto G, Passi S (1996) Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J Invest Dermatol* **107**: 322-326
- Placzek M, Przybilla B, Kerkmann U, Gaube S, Gilbertz KP (2007) Effect of ultraviolet (UV) A, UVB or ionizing radiation on the cell cycle of human melanoma cells. *Br J Dermatol* **156**: 843-847
- Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordonez GR, Bignell GR, Ye K, Alipaz J, Bauer MJ, Beare D, Butler A, Carter RJ, Chen L, Cox AJ, Edkins S, Kokko-Gonzales PI, Gormley NA, Grocock RJ, Haudenschild CD, Hims MM, James T, Jia M, Kingsbury Z, Leroy C, Marshall J, Menzies A, Mudie LJ, Ning Z, Royce T, Schulz-Trieglaff OB, Spiridou A, Stebbings LA, Szajkowski L, Teague J, Williamson D, Chin L, Ross MT, Campbell PJ, Bentley DR, Futreal PA, Stratton MR (2010) A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**: 191-196
- Poli J, Tsaponina O, Crabbe L, Keszthelyi A, Pantesco V, Chabes A, Lengronne A, Pasero P (2012) dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J* **31**: 883-894
- Pomerantz RT, O'Donnell M (2010) What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* **9**: 2537-2543

- Pontarin G, Fijolek A, Pizzo P, Ferraro P, Rampazzo C, Pozzan T, Thelander L, Reichard PA, Bianchi V (2008) Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17801-17806
- Poswig A, Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Hommel C, Quel G, Faisst K, Dissemond J, Briviba K, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (1999) Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J Invest Dermatol* **112**: 13-18
- Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM (1999) Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6751-6756
- Poveda AM, Le Clech M, Pasero P (2010) Transcription and replication: breaking the rules of the road causes genomic instability. *Transcription* **1**: 99-102
- Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM (2011) p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun* **2**: 473
- Punnonen K, Jansen CT, Puntala A, Ahotupa M (1991) Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidant enzymes in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **96**: 255-259
- Pursell ZF, Isoz I, Lundstrom EB, Johansson E, Kunkel TA (2007) Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* **317**: 127-130
- Pursell ZF, McDonald JT, Mathews CK, Kunkel TA (2008) Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. *Nucleic Acids Res* **36**: 2174-2181
- Pygmalion MJ, Ruiz L, Popovic E, Gizard J, Portes P, Marat X, Lucet-Levannier K, Muller B, Galey JB (2010) Skin cell protection against UVA by Sideroxyl, a new antioxidant complementary to sunscreens. *Free Radic Biol Med* **49**: 1629-1637
- Qin Y, Lu M, Gong X (2008) Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int* **32**: 224-228
- Radichev I, Kwon SW, Zhao Y, DePamphilis ML, Vassilev A (2006) Genetic analysis of human Orc2 reveals specific domains that are required in vivo for assembly and nuclear localization of the origin recognition complex. *J Biol Chem* **281**: 23264-23273
- Randell JC, Bowers JL, Rodriguez HK, Bell SP (2006) Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell* **21**: 29-39
- Rapp A, Greulich KO (2004) After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci* **117**: 4935-4945
- Reichard P (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**: 349-374

- Remus D, Diffley JF (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 771-777
- Rezvani HR, Cario-Andre M, Pain C, Ged C, deVerneuil H, Taieb A (2007) Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression. *Cancer Gene Ther* **14**: 174-186
- Rizzo JL, Dunn J, Rees A, Runger TM (2011) No formation of DNA double-strand breaks and no activation of recombination repair with UVA. *J Invest Dermatol* **131**: 1139-1148
- Rochette PJ, Therrien JP, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky EA, Sage E (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res* **31**: 2786-2794
- Rossi ML, Pike JE, Wang W, Burgers PM, Campbell JL, Bambara RA (2008) Pif1 helicase directs eukaryotic Okazaki fragments toward the two-nuclease cleavage pathway for primer removal. *J Biol Chem* **283**: 27483-27493
- Rowles A, Tada S, Blow JJ (1999) Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci* **112** (Pt 12): 2011-2018
- Sage E, Girard PM, Francesconi S (2012) Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem Photobiol Sci* **11**: 74-80
- Sakurada H, Koizumi H, Ohkawara A, Ueda T, Kamo N (1992) Use of dihydrorhodamine 123 for detecting intracellular generation of peroxides upon UV irradiation in epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **284**: 114-116
- Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsnér P, Thiele JJ (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* **43**: 326-335
- Santamaria D, Viguera E, Martinez-Robles ML, Hyrien O, Hernandez P, Krimer DB, Schvartzman JB (2000) Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acids Res* **28**: 2099-2107
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**: 173-186
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* **378**: 1247-1257
- Schurra C, Bensimon A (2009) Combing genomic DNA for structural and functional studies. *Methods Mol Biol* **464**: 71-90
- Schwab RA, Niedzwiedz W (2011) Visualization of DNA replication in the vertebrate model system DT40 using the DNA fiber technique. *J Vis Exp*: e3255
- Schwob E, de Renty C, Coulon V, Gostan T, Boyer C, Camet-Gabut L, Amato C (2009) Use of DNA combing for studying DNA replication in vivo in yeast and mammalian cells. *Methods Mol Biol* **521**: 673-687

- Sclafani RA, Tecklenburg M, Pierce A (2002) The mcm5-bob1 bypass of Cdc7p/Dbf4p in DNA replication depends on both Cdk1-independent and Cdk1-dependent steps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **161**: 47-57
- Scorah J, McGowan CH (2009) Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms. *Cell Cycle* **8**: 1036-1043
- Segurado M, Tercero JA (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* **101**: 617-627
- Seiler JA, Conti C, Syed A, Aladjem MI, Pommier Y (2007) The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol Cell Biol* **27**: 5806-5818
- Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6666-6670
- Shacter E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* **32**: 307-326
- Shao J, Zhou B, Chu B, Yen Y (2006) Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design. *Curr Cancer Drug Targets* **6**: 409-431
- Sharma A, Kaur M, Kar A, Ranade SM, Saxena S (2010) Ultraviolet radiation stress triggers the down-regulation of essential replication factor Mcm10. *J Biol Chem* **285**: 8352-8362
- Shechter D, Costanzo V, Gautier J (2004) ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* **6**: 648-655
- Sherman PA, Fyfe JA (1989) Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal Biochem* **180**: 222-226
- Shindo Y, Hashimoto T (1997) Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *J Dermatol Sci* **14**: 225-232
- Shorrocks J, Paul ND, McMillan TJ (2008) The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **128**: 685-693
- Shorrocks J, Tobi SE, Latham H, Peacock JH, Eeles R, Eccles D, McMillan TJ (2004) Primary fibroblasts from BRCA1 heterozygotes display an abnormal G1/S cell cycle checkpoint following UVA irradiation but show normal levels of micronuclei following oxidative stress or mitomycin C treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**: 470-478
- Sivakumar S, Porter-Goff M, Patel PK, Benoit K, Rhind N (2004) In vivo labeling of fission yeast DNA with thymidine and thymidine analogs. *Methods* **33**: 213-219
- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* **108**: 73-112
- Smits VA, Reaper PM, Jackson SP (2006) Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* **16**: 150-159

- Song S, Wheeler LJ, Mathews CK (2003) Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J Biol Chem* **278**: 43893-43896
- Stein VM, Bond JP, Capp MW, Anderson CF, Record MT, Jr. (1995) Importance of coulombic end effects on cation accumulation near oligoelectrolyte B-DNA: a demonstration using ²³Na NMR. *Biophys J* **68**: 1063-1072
- Steitz TA (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* **274**: 17395-17398
- Stowe DF, Camara AK (2009) Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal* **11**: 1373-1414
- Stubbe J, Nocera DG, Yee CS, Chang MC (2003) Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer? *Chem Rev* **103**: 2167-2201
- Sundar IK, Caito S, Yao H, Rahman I (2010) Oxidative stress, thiol redox signaling methods in epigenetics. *Methods Enzymol* **474**: 213-244
- Sutherland JC, Griffin KP (1981) Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm. *Radiat Res* **86**: 399-409
- Suzuki K, Miyaki M, Ono T, Mori H, Moriya H, Kato T (1983) UV-induced imbalance of the deoxyribonucleoside triphosphate pool in E. coli. *Mutat Res* **122**: 293-298
- Svobodova A, Walterova D, Vostalova J (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **150**: 25-38
- Svobodova AR, Galandakova A, Sianska J, Dolezal D, Lichnovska R, Ulrichova J, Vostalova J (2012) DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. *Arch Dermatol Res* **304**: 407-412
- Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**: 3553-3562
- Tabancay AP, Jr., Forsburg SL (2006) Eukaryotic DNA replication in a chromatin context. *Curr Top Dev Biol* **76**: 129-184
- Taddei A, Roche D, Sibarita JB, Huart S, Maison C, Bailly D, Almouzni G (2001) Localizing Replication Sites and Nuclear Proteins.
- Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, Korossy KS, Miller SA, Beer JZ, Hearing VJ (2003) UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J* **17**: 1177-1179
- Takebayashi SI, Manders EM, Kimura H, Taguchi H, Okumura K (2001) Mapping sites where replication initiates in mammalian cells using DNA fibers. *Exp Cell Res* **271**: 263-268

- Tanaka S, Tak YS, Araki H (2007) The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Div* **2**: 16
- Tang HM, Siu KL, Wong CM, Jin DY (2009) Loss of yeast peroxiredoxin Tsa1p induces genome instability through activation of the DNA damage checkpoint and elevation of dNTP levels. *PLoS Genet* **5**: e1000697
- Tatsumi Y, Ohta S, Kimura H, Tsurimoto T, Obuse C (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem* **278**: 41528-41534
- Tebbe B, Wu S, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE (1997) L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* **108**: 302-306
- Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L (2001) The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* **29**: 26-42
- Tobi SE, Paul N, McMillan TJ (2000) Glutathione modulates the level of free radicals produced in UVA-irradiated cells. *J Photochem Photobiol B* **57**: 102-112
- Tornøe CW, Christensen C, Meldal M (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **67**: 3057-3064
- Torrents E, Aloy P, Gibert I, Rodriguez-Trelles F (2002) Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. *J Mol Evol* **55**: 138-152
- Toueille M, Hubscher U (2004) Regulation of the DNA replication fork: a way to fight genomic instability. *Chromosoma* **113**: 113-125
- Tourriere H, Pasero P (2007) Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* **6**: 900-913
- Tsuji T, Ficarro SB, Jiang W (2006) Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **17**: 4459-4472
- Tsuji T, Lau E, Chiang GG, Jiang W (2008) The role of Dbf4/Drf1-dependent kinase Cdc7 in DNA-damage checkpoint control. *Mol Cell* **32**: 862-869
- Tuduri S, Crabbe L, Conti C, Tourriere H, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Pantesco V, De Vos J, Thomas A, Theillet C, Pommier Y, Tazi J, Coquelle A, Pasero P (2009) Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* **11**: 1315-1324
- Tuduri S, Tourriere H, Pasero P (2010) Defining replication origin efficiency using DNA fiber assays. *Chromosome Res* **18**: 91-102
- Tyrrell RM, Pidoux M (1988) Correlation between endogenous glutathione content and sensitivity of cultured human skin cells to radiation at defined wavelengths in the solar ultraviolet range. *Photochem Photobiol* **47**: 405-412

- Uchida K (2000) Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **28**: 1685-1696
- Uchiyama M, Griffiths D, Arai K, Masai H (2001) Essential role of Sna41/Cdc45 in loading of DNA polymerase alpha onto minichromosome maintenance proteins in fission yeast. *J Biol Chem* **276**: 26189-26196
- Uno S, Masai H (2011) Efficient expression and purification of human replication fork-stabilizing factor, Claspin, from mammalian cells: DNA-binding activity and novel protein interactions. *Genes Cells* **16**: 842-856
- Unsal-Kacmaz K, Chastain PD, Qu PP, Minoo P, Cordeiro-Stone M, Sancar A, Kaufmann WK (2007) The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol Cell Biol* **27**: 3131-3142
- Valencia A, Rajadurai A, Carle AB, Kochevar IE (2006) 7-Dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes: roles of NADPH oxidase, mitochondria, and lipid rafts. *Free Radic Biol Med* **41**: 1704-1718
- Valzeno DP (1987) Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem Photobiol* **46**: 147-160
- van Deursen F, Sengupta S, De Piccoli G, Sanchez-Diaz A, Labib K (2012) Mcm10 associates with the loaded DNA helicase at replication origins and defines a novel step in its activation. *EMBO J* **31**: 2195-2206
- van Mameren J, Peterman EJ, Wuite GJ (2008) See me, feel me: methods to concurrently visualize and manipulate single DNA molecules and associated proteins. *Nucleic Acids Res* **36**: 4381-4389
- Vashee S, Simancek P, Challberg MD, Kelly TJ (2001) Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* **276**: 26666-26673
- Vaziri C, Saxena S, Jeon Y, Lee C, Murata K, Machida Y, Wagle N, Hwang DS, Dutta A (2003) A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* **11**: 997-1008
- Viggiani CJ, Aparicio OM (2006) New vectors for simplified construction of BrdU-Incorporating strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 1045-1051
- Vile GF, Tyrrell RM (1995) UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic Biol Med* **18**: 721-730
- Villiotou V, Deliconstantinos G (1995) Nitric oxide, peroxy nitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res* **15**: 931-942
- Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E (2007) Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods Cell Biol* **80**: 379-393

- Walter J, Newport J (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* **5**: 617-627
- Wang TS (1991) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **60**: 513-552
- Watase G, Takisawa H, Kanemaki MT (2012) Mcm10 plays a role in functioning of the eukaryotic replicative DNA helicase, Cdc45-Mcm-GINS. *Curr Biol* **22**: 343-349
- Wenczl E, Van der Schans GP, Roza L, Kolb RM, Timmerman AJ, Smit NP, Pavel S, Schothorst AA (1998) (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* **111**: 678-682
- Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP (2001) Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine* **8**: 306-309
- Willis N, Rhind N (2009) Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div* **4**: 13
- Wischermann K, Popp S, Moshir S, Scharfetter-Kochanek K, Wlaschek M, de Gruijl F, Hartschuh W, Greinert R, Volkmer B, Faust A, Rapp A, Schmezer P, Boukamp P (2008) UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene* **27**: 4269-4280
- Wolf R, Wolf D, Morganti P, Ruocco V (2001) Sunscreens. *Clin Dermatol* **19**: 452-459
- Wood SR, Berwick M, Ley RD, Walter RB, Setlow RB, Timmins GS (2006) UV causation of melanoma in *Xiphophorus* is dominated by melanin photosensitized oxidant production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4111-4115
- Wu JR, Gilbert DM (1996) A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science* **271**: 1270-1272
- Xu J, Yanagisawa Y, Tsankov AM, Hart C, Aoki K, Kommajosyula N, Steinmann KE, Bochicchio J, Russ C, Regev A, Rando OJ, Nusbaum C, Niki H, Milos P, Weng Z, Rhind N (2012) Genome-wide identification and characterization of replication origins by deep sequencing. *Genome Biol* **13**: R27
- Zahedi Avval F, Holmgren A (2009) Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian s phase ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **284**: 8233-8240
- Zannis-Hadjopoulos M, Baumann EA, Hand R (1980) Effect of purine deprivation on DNA synthesis and deoxyribonucleoside triphosphate pools of a mammalian purine auxotrophic mutant cell line. *J Biol Chem* **255**: 3014-3019
- Zegerman P, Diffley JF (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**: 281-285
- Zegerman P, Diffley JF (2010) Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature* **467**: 474-478

- Zhao H, Piwnica-Worms H (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**: 4129-4139
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14795-14800
- Zheng L, Shen B (2011) Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage. *J Mol Cell Biol* **3**: 23-30
- Zhu W, Ukomadu C, Jha S, Senga T, Dhar SK, Wohlschlegel JA, Nutt LK, Kornbluth S, Dutta A (2007) Mcm10 and And-1/CTF4 recruit DNA polymerase alpha to chromatin for initiation of DNA replication. *Genes Dev* **21**: 2288-2299
- Zielke N, Querings S, Rottig C, Lehner C, Sprenger F (2008) The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev* **22**: 1690-1703
- Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, Nakajima S, Yasui A, Ishchenko AA, Kannouche PL (2011) The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol eta in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell* **43**: 649-662
- Zou L, Stillman B (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* **20**: 3086-3096

ANNEXES

UVA-induced damage to DNA and proteins: direct *versus* indirect photochemical processes

P M Girard^{1,2,3}, S Francesconi^{1,2,3}, M Pozzebon^{1,2,3}, D Graindorge^{1,2,3}, P Rochette⁴, R Drouin⁵ and E Sage^{1,2,3}

¹ Institut Curie, Bât. 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay cedex (France), ² CNRS UMR3348, Bât. 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay cedex (France), ³ University of Paris-sud XI, 91405 Orsay cedex (France), ⁴ Génie tissulaire et régénération:LOEX, Centre de recherche FRSQ du Centre hospitalier affilié universitaire de Québec, Laval University, Quebec City, Québec (Canada), ⁵ Division of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec (Canada)

E-mail: evelyne.sage@curie.fr

Abstract. UVA has long been known for generating an oxidative stress in cells. In this paper we review the different types of DNA damage induced by UVA, i.e. strand breaks, bipyrimidine photoproducts, and oxidatively damaged bases. Emphasis is given to the mechanism of formation that is further illustrated by the presentation of new *in vitro* data. Examples of oxidation of proteins involved in DNA metabolism are also given.

1. Introduction

Even though there is a continuum of energies in the electromagnetic spectrum of radiations, the UV portion of sunlight has been divided into UVC (below 280 nm), UVB (280-315 nm) and UVA (315-400 nm) for categorizing the effects of solar exposure to human skin. Wavelengths below 290 nm are blocked by the stratospheric ozone. These wavelengths are of the highest energies (> 4.4 eV), coincide with maximal absorption by DNA and other biomolecules, and would be extremely damaging to genetic material and biological tissues in general. Therefore the stratospheric ozone layer protects life from UVC radiation. Longer wavelength UVB ($\lambda >$ approximately 290 nm) penetrates the ozone layer and constitutes about 5-10% of the terrestrial solar UV radiation. It is absorbed by nucleic acids and has the ability to directly cause genotoxic damage to DNA and ultimately skin cancer.

In contrast, wavelengths in the UVA range received little attention up to the nineties, although they are by far the most abundant solar UV radiation (above 90%) that reaches the surface of earth. UVA radiation also penetrates human skin more effectively than UVB. Unlike UVB, the UVA component of solar radiation is weakly absorbed by DNA [1], but rather excites other endogenous chromophores, generating various reactive oxygen species (ROS) in cells. Moreover, most UVA-mediated biological events are oxygen-dependent. These observations provided the basis for considering UVA as a strong generator of oxidative stress. Singlet oxygen is the major ROS involved in UVA-mediated cell inactivation [2] and gene activation [3], it is also a primary source of UVA-mediated signalling [4]. Once thought to be relatively innocuous, UVA is now known as a damaging agent for DNA, proteins, lipids, with harmful consequences such as skin ageing and carcinogenesis. Due to the popularity of the UVA tanning saloons and to the widespread use of efficient UVB-absorbing sunscreens blocking

erythema, while accompanied by prolonged periods of sunbathing, exposure of the human population to UVA has increased significantly in the last decades. As a consequence, the deleterious effect of UVA has recently emerged as a source of concern for public health. As an example, sunbeds have been included into the list of carcinogens to humans by the International Agency of Research on Cancer [5]. The cellular and molecular responses to UVA in relation to skin carcinogenesis have been recently reviewed [6]. Here, we focus on damage induced to DNA and protein by UVA radiation and discuss the possible mechanisms of formation.

2. DNA damage induced by UVA

As stated in the introduction, UVC and UVB radiation are directly absorbed by DNA, causing the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs) and their Dewar valence isomers. These bipyrimidine photoproducts are not expected to be formed by UVA because of the inability of DNA to readily absorb in the UVA range. Meanwhile, a pioneer work of Tyrrell's group reported the induction of CPDs by very pure narrow-band 365-nm UVA in bacteria, with a higher relative frequency of TT CPDs and a reduced excision of these CPDs, comparatively to 254-nm UVC [7,8]. The same group also reported the induction of single strand breaks (alkali-labile bonds) by UVA in bacteria and phage DNA [9]. It is well established that UVA promotes photosensitization of DNA, triggered by singlet oxygen (type II photosensitization), electron abstraction (type I photosensitization) or hydroxyl radicals. Therefore, the formation of oxidative DNA damage is expected. The induction of single strand breaks (SSB) and DNA-protein crosslinks has indeed been observed in mammalian cells upon UVA irradiation [10]. In the nineties, the availability of new and sensitive methods allowed the efficient measurement of various types of DNA lesions. These methods are comet assays, commercially available specific antibodies and DNA repair enzymes, HPLC coupled with electrochemical detection (HPLC-ED) to reveal 8-oxoguanine, and more recently HPLC coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) to measure 8-oxoguanine and all the different bipyrimidine photoproducts. UVA-induced DNA damage has thus been timely revisited.

The *Escherichia coli* Fpg or Nth proteins have been used to reveal oxidation products of purine (mainly 8-oxoG) or pyrimidine, respectively, and Nfo protein to reveal abasic sites. The 8-oxoguanine (8-oxoG) has been more specifically measured by HPLC-ED. We and other have shown that UVA radiation induces single strand breaks (SSB), oxidized pyrimidines, oxidized purines in mammalian cells [11-14], and that the most abundant oxidative DNA damage produced is 8-oxoG [15-17].

By the use of sensitive methods, CPDs have been detected in mammalian cells, including in human skin upon UVA irradiation [11, 13, 15, 17, 18-22 and 23 for review]. It has been found that CPDs are produced about 10^5 fold less efficiently by UVA than by 254 nm UVC [7,19]. 6-4 photoproducts were barely detected using specific antibodies [19]. In agreement with the original studies in bacteria [7], the distribution of CPDs induced by UVA drastically differs from that produced by UVC, UVB or simulated sunlight (SSL). UVA-induced CPDs predominantly form at TT sites, while those produced at CC sites are poorly represented [20]. HPLC-MS/MS also revealed predominance for TT CPDs over CT and TC CPDs, whereas CC CPDs and 6-4PPs were not detected [17,22]. As shown in Fig. 1, CPDs, 8-oxoG, oxidatively damaged pyrimidines, and SSB are formed in the ratio 10:3:1:1. Interestingly, CPDs are the major lesions induced by UVA in mammalian cells and human skin [17,22].

Moreover, it has been shown that UVA is able to photoisomerize 6-4 photoproducts produced by the UVB photons of simulated sunlight into Dewar photoproducts [17,19]. This sustains the observation that Dewar photoproducts are more frequently produced by natural and simulated sunlight, than by UVB [19]. DNA double strand breaks, revealed by neutral comet assay or γ -H2AX foci (phosphorylated H2AX variant histone), are not readily produced in human transformed fibroblasts or keratinocytes by direct UVA irradiation, but occurs at low extent during the process of DNA lesions [24,25].

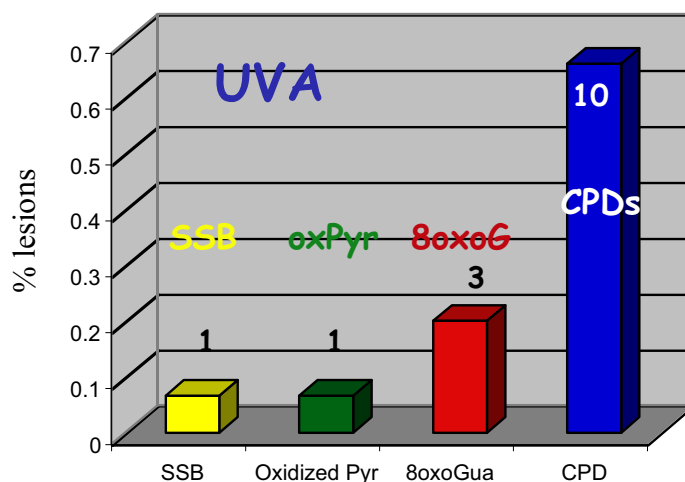


Figure 1. Distribution of CPDs, 8oxoguanine (8oxoG), oxidatively damaged pyrimidines (oxPy), single strand breaks (SSB), revealed respectively by T4 phage DenV protein, bacterial Nth and Fpg proteins in combination with alkaline agarose gel, in Chinese hamster ovary cells exposed to UVA. The yields of formation were obtained by linear regression of the amount of lesions with respect to the dose (from [17]).

3. Processes involved in the formation of UVA-induced DNA damage

The induction of single strand breaks in bacterial DNA by narrow-band 365-nm radiation is totally dependent on the presence of oxygen [9]. The low amounts of SSB and oxidized pyrimidines, likely produced by hydroxyl radicals originated from Fenton reaction, and the predominance for 8-oxoG likely sign a major contribution of singlet oxygen in the formation of oxidative DNA damage in cells by UVA [23]. A type I mechanism by hydrogen or electron abstraction mediated by a photosensitizer cannot be totally excluded.

The photochemical process underlying the formation of UVA-induced CPDs has been a matter of debate for many years. The quantum yields were 7×10^5 less at 365 nm than at 254 nm in bacteria [7] and 10^5 less for broad-band UVA than at 254 nm [19]. Such yield of CPDs formation by UVA is in perfect agreement with the DNA absorption spectrum [1]. This led us to conclude that CPDs formation by UVA could be compatible with direct absorption by DNA [19]. However, in bacteria, the longer wavelength radiation induced predominantly thymine dimers (TT:CT in the ratio 5:1), whereas at the shorter wavelength CPDs were induced in the ratio 5:4:1 (TT:CT:CC) [7]. In mammalian cells, CPDs also predominately formed at TT sites at a gene level [20] and at a higher extent in the bulk DNA [17,21,22]. The principal induction of CPDs at T-containing bipyrimidine sites, and mostly at TT sites, is a reminiscence of what was observed by photosensitization reaction of DNA by aromatic ketones [26, 27]. This could suggest that, in contrast to what was stated above, most of CPDs are formed through triplet energy transfer from photosensitizer to excited thymine. The identification of an hypothetical UVA-absorbing chromophore tightly bound to DNA that allows energy transfer remains elusive.

Evidence recently emerged in favour of a direct absorption of UVA by DNA that mediates CPD formation. Firstly, the distribution of the different types of DNA damage induced by UVA is similar in plasmid or isolated DNA and in cells [28-31]. In particular, upon UVA irradiation, CPDs are formed in plasmid DNA by a mechanism that should not involve photosensitization reactions, due to the absence of photosensitizer in the irradiation mixture. Therefore, CPDs in plasmid or isolated DNA should be formed by direct absorption. Moreover, it has clearly been demonstrated that UVA radiation

is able to induce 6-4PPs in plasmid DNA [30], while 6-4PPs are produced in tiny amount in cells [19]. Importantly, 6-4PPs cannot be formed by photosensitization and are only produced by direct absorption. To highlight our point of view, we provide new evidence in favour of a direct mechanism. Figures 2 and 3 show that CPD distributions along the adenylphosphoribosyl transferase (APRT) gene are superimposable whether isolated cellular DNA or cells were UVA-irradiated, as also observed for UVB or UVC-induced CPDs which are formed exclusively by direct absorption.

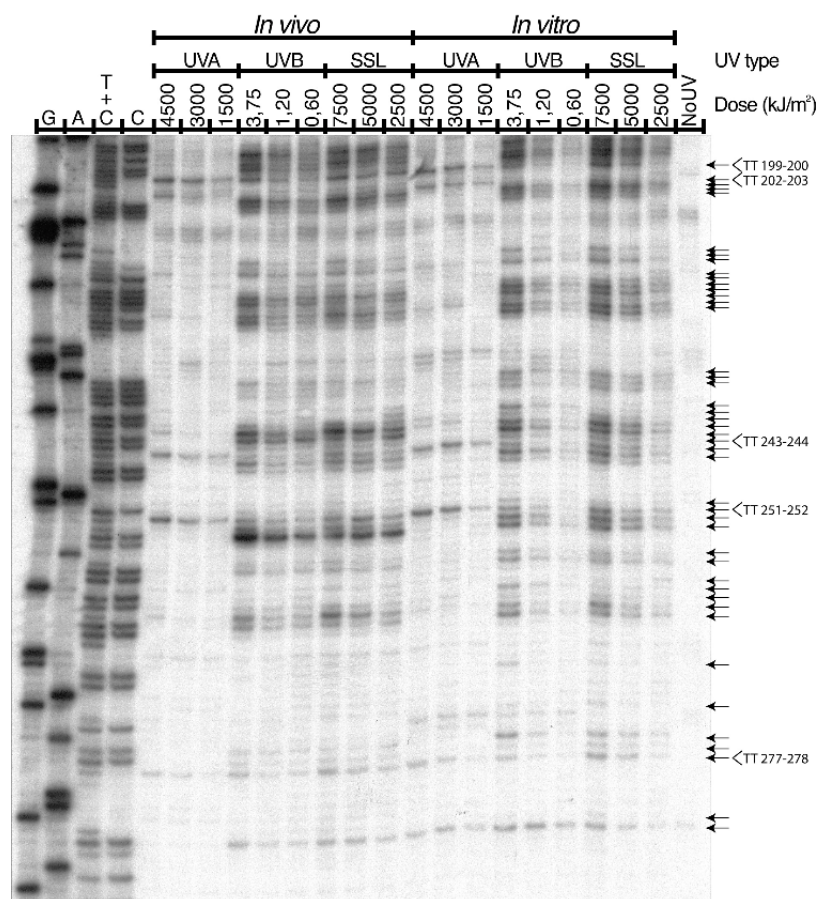


Figure 2. Induction of CPDs by UVA, UVB, and simulated sunlight (SSL), at nucleotide resolution, in the *aprt* exon 2 gene of Chinese hamster ovary cells. Cells were either unirradiated (No-UV) or irradiated as indicated and CPD formation was analyzed by LMPCR along the non-transcribed strand of exon 2 of *aprt* gene. The first four lanes from the left of the autoradiogram exhibit LMPCR of DNA treated in standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. For the next 18 lanes, each band in a lane corresponds to a site of CPD formation. Either cells (*in cellulo*) or DNA isolated from cells (*in vitro*) were irradiated with 4500, 3000, 1500 kJm⁻² of UVA, 3.75, 1.20, 0.60 kJm⁻² of UVB, or 7500, 5000, 2500 kJm⁻² of SSL, as indicated. The doses for UVB, SSL, and UVC induced approximately equal global CPD. The red dots indicate UVA-induced CPDs at TT sites. The figure reveals that the patterns of bands (sites of CPDs) produced by UVB, SSL and UVA are the same whether DNA isolated from cells or cells were exposed to radiation. Moreover, it shows that the pattern of band for UVA differs from that of UVB or SSL and reveals formation of CPDs at TT sites (compare with Maxam and Gilbert ladder). For further details in procedures see [20].

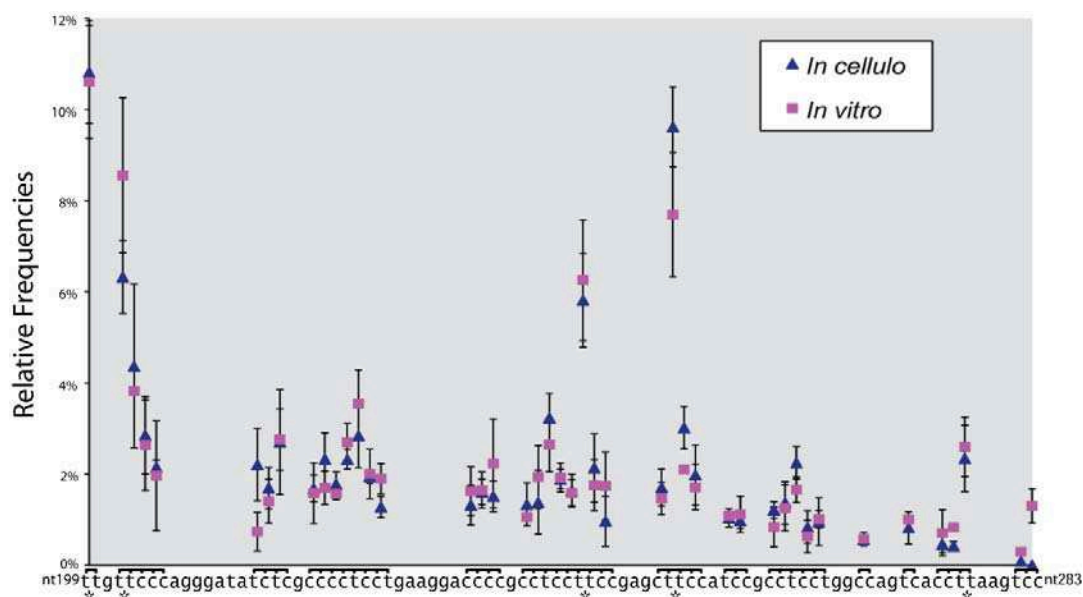


Figure 3. The sites and frequencies of CPDs formation *in vitro* and *in cellulo* by UVA are similar. This figure represents the mean of quantified LM-PCR experiments such as those described in figure 2. For further details in quantification see [20]. The highest frequencies for UVA-induced CPDs are at TT sites.

Moreover, the frequencies of CPD formation *in vitro* and *in cellulo* are the same in these experiments, as well as in data presented in Table 1. Finally, an other argument is provided by the similarities in the yields of CPD formation within calf thymus DNA and keratinocytes exposed to UVA through filters exhibiting increasing cut-off wavelength (322-390 nm) [31]. Collectively, these observations strongly suggest that the photochemical process underlying the formation of CPDs by UVA is direct absorption of UVA photons by DNA. The low energy of UVA photons is sufficient to directly excite DNA with subsequent formation of bipyrimidine photoproducts, both CPDs and 6-4PPs, yet at low level. The predominance for CPD formation at TT sites may be explained by the fact that thymine has, in fact, the lowest triplet state energy with regard to other bases. In contrast, 8-oxoG is essentially formed by photosensitization reaction mediated by singlet oxygen.

Table 1. Yields of CPDs formation (per kbp per Jm⁻²) by broad-band UVA, UVB and UVC in Chinese hamster cells (*cellulo*) [17] and in plasmid DNA (*vitro*) [28].

	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
UVC (254 nm)	2.2 (+/-0.2) x10 ⁻²	1.5 (+/-0.3) x10 ⁻²
UVB (λ>300 nm)	2.0 (+/-0.2) x10 ⁻⁴	1.5 (+/-0.4) x10 ⁻⁴
UVA	3.0 (+/-0.4) x10 ⁻⁷	1.4 (+/-0.2) x10 ⁻⁷

4. Protein oxidation induced by UVA

Proteins are major cellular targets for photooxidation. This is due to their abundance in cells and also to the fact that they carry chromophores, *i.e.* primarily side chains or bound photosensitizers. Proteins absorb in the 250-320 nm region due to the aromatic amino acids. Some proteins bind prosthetic groups which absorb in the UVA and visible range, such as flavins, hemes. As a result, direct

photooxidation may occur and arises from absorption of radiation by the protein or by the bound chromophores, therefore generating excited states or radicals through type I processes. Indirect photooxidation of proteins *via* type II mechanism may also occur and involves singlet oxygen generated by energy transfer from either protein-bound or other endogenous chromophores to oxygen. All these processes have been detailed in [32–34]. All amino acid residues are susceptible to oxidation [35]. Anyhow, the thiol function in cysteine residues is among the most susceptible oxidant-sensitive targets within proteins and can undergo various reversible and irreversible redox alterations in response to ROS.

UVA, as an oxidative agent, has been shown to produce various protein damage [36]. In fact, the observation that near UV wavelength is able to inactivate photoreactivating enzyme was made more than 30 years ago [37]. More recently, in human skin cells, UVA irradiation was shown to induce sulphhydryl oxidation in proteins that depends on iron, singlet oxygen and hydrogen peroxide [38]. UVA also caused changes in catalase charge in epidermis reconstituted with low phototype melanocytes, possibly due to oxidative modification of Trp and Met residues [39]. Photoageing has also been associated with protein oxidation in human skin, with accumulation of protein carbonyls, especially in the upper dermis. It was recently shown that the repair enzyme methionine-*S*-sulfoxide reductase (MSRA) was expressed in human epidermis and specifically upregulated by low doses of UVA radiation [40]. MSRA, by reducing the methionine sulfoxide (MetO) to methionine, thus reverses the inactivation of proteins caused by oxidation of critical methionine residues. Another example is given with the base excision repair protein, DNA *N*-glycosylase hOGG1 which removes 8-oxoguanine and has been shown to be sensitive to oxidation, e.g. cysteine oxidation [41]. Interestingly, glutathione depletion of skin fibroblasts and melanoma cells, which increases oxidative stress, causes a strong repair retardation of 8-oxoguanine after exposure to non-toxic doses of visible light or UVA radiation [42]. Moreover, the cleavage activity at 8-oxoguanine residues measured in protein extracts from irradiated cells drops transiently after irradiation. A modification of hOGG1 is suspected, but is not caused by critical oxidation of Cys.

We have recently shown that exposure of eucaryotic cells (*i.e.* fission yeast *S. pombe* and mammalian cells) to oxidative stress induced by UVA radiation led to inhibition of DNA replication by a yet unknown process, which does not require a functional DNA damage checkpoint response, despite ATM^(spMec1)-, ATR^(spRad3)-, p38^(spSty1)-dependent pathways activation [24,43]. Data led us to propose that inhibition of DNA replication is due to impaired replication fork progression, rather as a consequence of UVA-induced oxidative damage to protein than to DNA. To highlight this point, we carried investigations on two proteins involved in DNA metabolism, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), a cofactor of DNA polymerases, and XRCC3 protein involved in repair of double strand breaks by homologous recombination.

PCNA is a homotrimeric protein which acts as sliding clamp on DNA, conferring high processivity to replicative DNA polymerases. It also plays a pivotal role in translesion synthesis. PCNA undergoes posttranslational modification such as mono- or poly- ubiquitylation upon cells treatment with UVC or hydroxyurea which block DNA replication forks. In the left part of figure 4, the bands migrating slower than monomeric PCNA likely reflect ubiquitylated PCNA. Such PCNA modification occurs in active PCNA, bound to chromatin. It is not induced by UVA. In contrast, right part of figure 4 shows that a small fraction of PCNA present in the soluble protein fraction migrates as a trimer (90 kDa protein) and is specifically induced by UVA. This UVA-induced PCNA modification increases in a dose-dependent manner, it occurs very rapidly and it is stable for more than 6 hours after irradiation (not shown). It is largely reduced when UVA irradiation is performed in the presence of the antioxidant N-acetylcysteine or NaN₃, a quencher of singlet oxygen. Altogether, it appears that UVA-induced ROS lead to irreversible, oxidative, covalent cross-linking between the three subunits of PCNA. Such an irreversible PCNA crosslinking has been previously reported [44] upon treatment of human cells with azathioprine plus low doses UVA. Singlet oxygen thus produced by photosensitization was also responsible for this PCNA modification. The authors suspect an interstrand crosslink involving His153 and Lys77, since no covalent trimeric PCNA is observed in

cells carrying an amino acid change in PCNA at His153. The chemical process underlying this covalent reaction is still unknown.

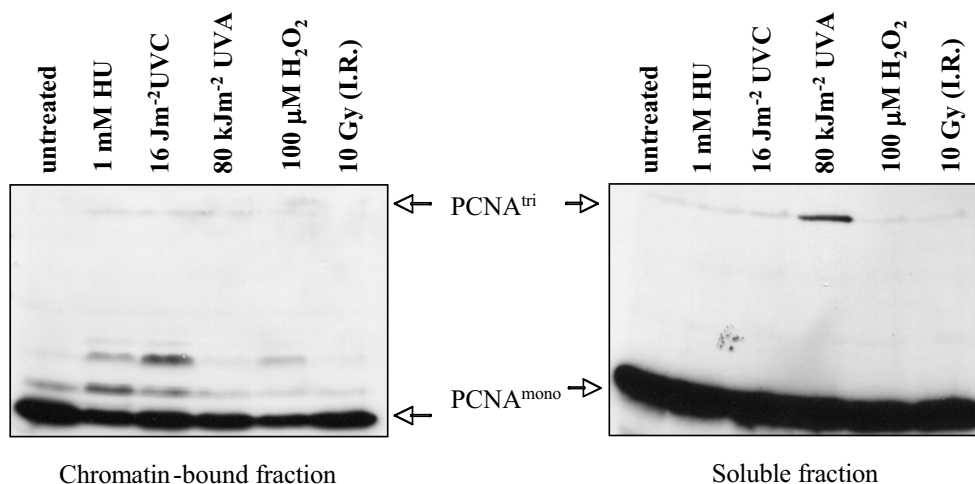


Figure 4. MRC5Vi cells were either untreated or exposed to 1mM hydroxyurea (HU) for 16h, 16 J/m² UVC, 80 kJ/m² UVA, 100 mM H₂O₂ for 30 min or 10 Gy γ -rays. Immediately post treatment, cells were lysed on ice in lysis buffer and total soluble and insoluble protein were loaded on reducing 9 % SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membrane and PCNA protein detected using mouse monoclonal anti-PCNA antibody (PC10, Santa Cruz Biotechnology). PCNA^{mono} = PCNA monomeric. PCNA^{tri} = PCNA trimeric.

In vertebrates, XRCC3 is one of the five RAD51 paralogs which play non-redundant essential functions in the repair of DNA double strand breaks by homologous recombination. XRCC3 deficiency results in impaired DNA damage-induced RAD51 foci formation, impaired homologous recombination and elevated chromosome aberrations. XRCC3 contains 8 cystein residues, and in normal growing conditions, XRCC3 is mainly reduced (thiol groups). Protein extracts from human cells HCT116 deficient (XRCC3^{-/-}) or not in XRCC3 were prepared and migrated on SDS-PAGE. The comparison of the bands (see non-reducing conditions in figure 5) allowed to allocate the fast migrating band to XRCC3 protein (absent in XRCC3 deficient cells). When cells were UVA-irradiated and protein extracts migrated under non-reducing conditions, XRCC3 protein band decreases, to almost disappear at 160 kJm⁻², while the protein is still present in the extract as revealed when extract migrated under reducing conditions. (figure 5, compare the two left western blots). This demonstrates that XRCC3 underwent modification upon UVA irradiation, which prevents antibodies to recognize the protein when migrating in non-reducing conditions. Since modified XRCC3 is detected by the antibodies when migrating under reducing conditions, it means that two or more cysteines were oxidized upon UVA irradiation and that it is reversible by the reducing agent β -mercaptoethanol. We also found that singlet oxygen produced by UVA radiation causes this reversible disulfide bound in XRCC3. Furthermore, we observed that this phenomenon is quickly reversed in cells.

While the consequences of irreversible (PCNA) or reversible (XRCC3) oxidation on the functionality of these proteins has not yet been fully investigated, our data emphasize that protein oxidation may play a role in the deleterious effect of UVA radiation.

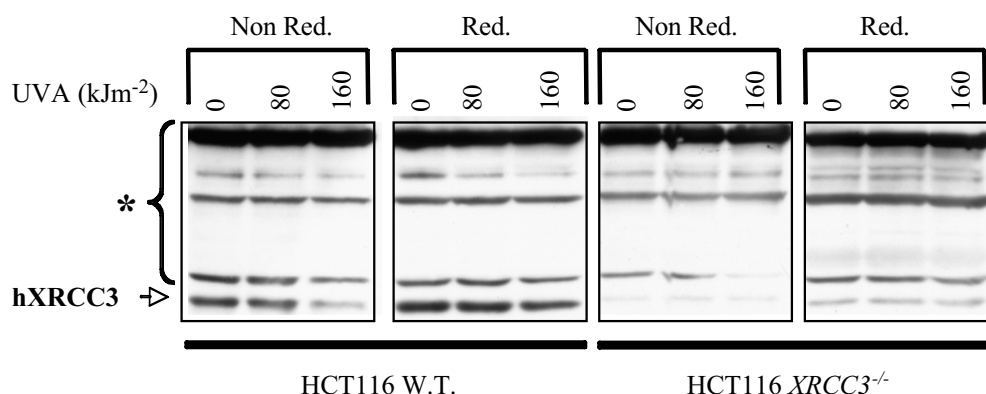


Figure 5. XRCC3-proficient and deficient human HCT116 cells were exposed to increasing doses of UVA radiation. Immediately post radiation, cells were lysed on ice in lysis buffer containing 4 mM N-ethylmaleimide (NEM) an irreversible thiol alkylating agent that protects cysteine residues from oxidation during lysis. Equal amounts (30 mg) of soluble protein extracts in non reductive (without β -mercaptoethanol) and reductive (150 mM β -mercaptoethanol) conditions were loaded on 9 % SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. Human Xrcc3 protein was detected using rabbit polyclonal anti-Xrcc3 antibody (Novus Biological, clone 100-165). The star indicates non specific cross-reactivity of the antibody.

5. Conclusion

Excessive exposure to sunlight is a major cause of skin cancer but also contributes to premature skin aging. The two main components of sunlight that contribute to photocarcinogenesis and photoaging are UVB and UVA radiation, respectively. While it is known for long time that UVB is a major source of DNA damage, more recent data highlight also a key role of UVA radiation in the formation of CPDs, 8-oxoguanine and strand breaks. Efficient repair of such DNA damage is crucial for the maintenance of genomic stability. In other words, inability of cells to efficiently carry out repair could lead to mutations and consequently to genomic instability, a marker of cancer cells. Interestingly, UVA-induced ROS can also oxidize DNA repair proteins (i.e. PCNA, XRCC3, Ogg1) raising the possibility that during sunlight exposure, there is a narrow window during which DNA repair proteins could be oxidatively modified, and possibly inactivated, and DNA damages are produced. For a better understanding of the deleterious effects of UVA, it seems therefore essential, not only to measure the various type of DNA lesions induced by UVA (or simulated sunlight) but also to measure the extent of protein oxidation with particular emphasis on DNA repair enzymes.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Aziz Sancar for photolyase and Dr. R Stephen Lloyd for T4 endonuclease V. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Curie, a grant from the French "Agence Nationale pour la Recherche" (ANR-07-PCVI-0004-01) to E S. and by a grant from the National Cancer Institute of Canada (NCIC) (with funds from the Canadian Cancer Society and the Terry Fox Run) to R D. D G. is the recipient of a doctoral fellowship from "La région Ile de France" on DIM SenT program. R D. holds the Canada Research Chair in "Genetics, Mutagenesis and Cancer".

References

- [1] Sutherland J C and K P Griffin 1981 *Rad. Res.* **86** 399.
- [2] Tyrrell R M and Pidoux M 1989 *Photochem. Photobiol.* **49** 407.
- [3] Basu-Modak S and Tyrrell R M 1993 *Cancer Res.* **53** 4505.
- [4] Ryter S and Tyrrell R M 1998 *Free Radical Biol. Med* **24** 1520.
- [5] El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L and Coglianò V 2009 *Lancet Oncol.* **10** 751.
- [6] Ridley A J, Whiteside J R, McMillan T J and Allison S L 2009 *Int. J. Rad. Biol.* **85** 177.
- [7] Tyrrell R M 1973 *Photochem. Photobiol.* **17** 69.
- [8] Tyrrell R M, Webb R B 1973 *Mutat Research* **19** 361.
- [9] Tyrrell R M, Ley R D and Webb R B 1974 *Photochem. Photobiol.* **20** 395.
- [10] Peak M J and Peak J G 1990 *Photochem. Photobiol.* **51** 649.
- [11] Zhang X S, Rosenstein B S, Wang Y, Lebwohl M, Mitchell D M and Wei H C 1997 *Photochem. Photobiol.* **65** 119.
- [12] Kvam E and Tyrrell R M 1997 *Carcinogenesis* **18** 2379.
- [13] Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J and Sage E 1999 *Photochem. Photobiol.* **70** 184.
- [14] Besaratinia A, Kim S and Pfeifer G P 2008 *FASEB J.* **22** 2379.
- [15] Kielbassa C, Roza L and Epe B 1997 *Carcinogenesis* **18** 811.
- [16] Pouget J P, Douki T, Richard M J and Cadet J 2000 *Chem. Res. Toxic.* **13** 541.
- [17] Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J and Sage E 2003 *Biochem.* **42** 9221.
- [18] Young A R, Potten C S, Nikaido O, Parsons P G, Boenders J, Ramsden J M and Chadwick C A 1998 *J. Invest. Derm.* **111** 936.
- [19] Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E and Sage E 2000 *J. Biol. Chem.* **275** 26732.
- [20] Rochette P J, Therrien J P, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky E A and Sage E 2003 *Nucl. Acids Res.* **31** 2786.
- [21] Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J and Douki T 2004 *Mutation Res.* **556** 135.
- [22] Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J and Douki T 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **103** 13765.
- [23] Cadet J, Sage E and Douki T 2005 *Mutation Res.* **571** 3.
- [24] Girard P M, Pozzebon M, Delacôte F, Douki T, Smirnova V and Sage E 2008 *DNA Repair* **7** 1500.
- [25] Wischermann K, Popp S, Moshir S, Scharfetter-Kochanek K, Wlaschek M, de Gruijl F, Hartschuh W, Greinert R, Volkmer B, Faust A, Rapp A, Schmezer P and Boukamp P 2008 *Oncogene* **27** 4269.
- [26] Lamola A A 1968 *Photochem. Photobiol.* **7** 619.
- [27] Charlier M and Helene C 1972 *Photochem. Photobiol.* **15** 527.
- [28] Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B and Sage E 1999 *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **49** 71.
- [29] Jiang Y, Rabbi M, Kim M, Ke C, Lee W, Clark R L, Mieczkowski P A and Marszalek P E 2009 *Biophys. J.* **96** 1151.
- [30] Schuch A P, da Silva Galhardo R, de Lima-Bessa K M, Schuch N J and Menck C F 2009 *Photochem. Photobiol. Sci.* **8** 111.
- [31] Mouret S, Philippe C, Gracia-Chantegrel J, Banyasz A, Karpati S, Markovitsi D and Douki T 2010 *Org. Biomol. Chem.* **8** 1706.
- [32] Bensasson R V, Land E J and Truscott T G 1993 Oxford University Press, Oxford (UK)
- [33] Davies M J 2003 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **305** 761.
- [34] Pattison D I and Davies M J 2006 L.P. Bignold editor Birkhäuser verlag (Switzerland) 131-157
- [35] Shacter E 2000 *Methods Enzymol.* **319** 428.

- [36] Tyrrell R M and Sage E 2011 *Handbook of Photochemistry and Photobiology* 3rd edition CRC Press in the press
- [37] Tyrrell R M, Webb R B and Brown M S 1973 *Photochem. Photobiol.* **18** 249.
- [38] Vile G F and Tyrrell R M 1995 *Free Rad. Biol. Med.* **18** 721.
- [39] Maresca V, Flori E, Briganti S, Camera E, Cario-André M, Taïeb A, and Picardo M *J. Invest. Dermat* **126** 182.
- [40] Ogawa F, Sander C S, Hansel A, Oehrl W, Kasperczyk H, Elsner P, Shimizu K, Heinemann S H and Thiele J J 2006 *J. Invest. Dermat.* **126** 1128.
- [41] Bravard A, Vacher M, Gouget B, Coutant A, de Boisferon F H, Marsin S, Chevillard S and Radicella J P 2006 *Mol. Cell. Biol.* **26** 7430.
- [42] Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R, Dhérin C, Radicella J P and Epe B 2008 *DNA Repair* **7** 912.
- [43] Dardalhon D, Angelin A R, Baldacci G, Sage E and Francesconi S 2008 *Cell Cycle* **7** 611.
- [44] Montaner B, O'Donovan P, Reelfs O, Perrett C M, Zhang X, Xu Y Z, Ren X, Macpherson P, Frith D and Karran P 2007 *EMBO Rep.* **8** 1074.

Manuscrit en préparation

The formation of intramolecular disulfide in the human recombination protein XRCC3 during oxidative stress depends on the intracellular environment

Pierre-Marie Girard^{1,2,*}, Dany Graindorge^{1,2}, Pascal rigolet^{1,2,3}, Stefania Francesconi^{1,2}, Susan Scanlon^{1,2,†}, and Evelyne Sage^{1,2}

¹Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, F-91405 France; ²CNRS, UMR3348, Orsay, F-91405 France; ³Université Paris-Sud 11, Orsay, F-91400, France.

Running head: human XRCC3 oxidation in mammalian cells

*Correspondence to Pierre-Marie Girard: Institut Curie, CNRS UMR3348, Bat 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France. Phone: 33 (0) 1 69 86 31 31. Fax: 33 (0) 1 69 86 94 29.

Email: pierre-marie.girard@curie.fr.

†Present address: Yale University, New Haven, Connecticut 06520, USA

ABSTRACT

The cysteine thiol groups in proteins are particularly sensitive to the redox state of the cells, and cysteine oxidation can regulate positively or negatively protein activity. In vertebrates, XRCC3 is one of the five Rad51 paralogs that plays a central role in homologous recombination (HR), a key pathway for maintaining genomic stability. Here, we assessed the effects of reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals, on cysteine oxidation of XRCC3 by nonreducing/reducing SDS-PAGE. Using Chinese hamster ovarian (CHO) cells expressing human XRCC3 (hXRCC3) as model, we report an increase in the electrophoretic mobility of hXRCC3 in response to various oxidizing agents [*e.g.* menadione (MN) and ultraviolet A (UVA) radiation] suggesting the formation of intramolecular disulfide bridges. Incubation of cells with quenchers of $^1\text{O}_2$ production or with a free radical scavenger prevents hXRCC3 oxidation in response to UVA or MN, respectively. Furthermore, we show that UVA radiation and MN induces protein S-glutathionylation in cells, and that glutathione (GSH) protects cells from the cytotoxic effects of UVA and MN. Unexpectedly, intracellular GSH is required for hXRCC3 oxidation in response to UVA but not in response to the other oxidizing agents tested. Finally, oxidation of hXRCC3 is barely or not detected in human cells exposed to these oxidative stresses. Collectively, this study reveals that the sensitivity of a human protein to oxidation may differ whether it is expressed in CHO or in human cells. This result may have some implications for the production of recombinant human therapeutic proteins that are widely produced in CHO.

The solar UV radiation that reaches the earth's surface is composed of 10 % UVB (280–320 nm) and 90 % UVA (320–400 nm) the main toxic radiations (wavelengths below 300 nm) being blocked by the stratospheric ozone. Unlike UVB, the UVA component of solar radiation is weakly absorbed by DNA. Nevertheless, one of major problems due to UVA exposure is the production of reactive oxygen species (ROS) through the interaction with endogenous and exogenous chromophores. These ROS cause damage to DNA, lipids and proteins. Even if UVB remains the major etiological factor known to be implicated in photoinduced cutaneous carcinogenesis, a novel role for UVA *via* the production of ROS seems to emerge. In our lab, previous works have provided evidence that exposure of mammalian cells to UVA-induced ROS led to delayed S-phase and reduced DNA synthesis, by a yet unknown process, which does not require a functional DNA damage checkpoint response, despite ATM-, ATR-, p38-dependent pathways activation. The authors proposed that inhibition of DNA replication is due to impaired replication fork progression and/or origins activation, as a consequence of UVA-induced oxidative damage to proteins rather than to DNA. The project for my PhD thesis is to better understand the mechanism underlying this UVA-induced slowdown of DNA replication in human cells.

To study at the molecular level the effects of UVA on DNA replication, we used the DNA combing methodology. This technique allows measurement of the fork velocity and of the origins density. We show that UVA-induced ROS inhibit immediately after irradiation, but transiently, the progression of replication forks, while the inhibition on the initiation of origins lasts longer. By HPLC-MS, we show that UVA radiation induces a moderate and transient decrease of the level of each intracellular dNTP. The supply of ribonucleosides doesn't seem to be sufficient to restore neither a normal forks velocity immediately post-UVA nor the overall slowdown of DNA replication. In addition, we observe a reversible oxidation of the subunit R1 of ribonucleotide reductase, an enzyme which is involved in dNTPs biosynthesis. This oxidation cannot explain the transient reduction of dNTPs pool after UVA exposure, but other types of RNR oxidative modification could affect its activity. During UVA irradiation, the presence of the antioxidant sodium azide (NaN_3) prevents the delay of DNA replication, limits the oxidation of the subunit R1 and the decrease of dNTPs pool. These results strongly suggest that the slowdown of DNA replication totally depends on ROS, in particular on singlet oxygen production induced by UVA.

Altogether, our data indicate that UVA irradiation affects the process of DNA replication by modifying the forks velocity and the activation of origins. As DNA replication impairment is a major cause of genetic instability, it is of importance to determine if UVA irradiation leads to this instability in our experimental conditions. Finally, we suspect that the target of UVA-induced ROS is essentially cytosolic and that the mechanism driving the inhibition of replication is not specific of UVA-induced ROS, but could be also observed with other types of oxidative stress.

Keywords : UVA, oxidative stress, DNA replication, elongation, initiation, dNTPs, ribonucleotide reductase.