



**HAL**  
open science

# Maintenance de la stabilité chromosomique des cellules souches neurales murines au cours du développement et après un stress génotoxique aiguë ou chronique

Sofiane Mokrani

► **To cite this version:**

Sofiane Mokrani. Maintenance de la stabilité chromosomique des cellules souches neurales murines au cours du développement et après un stress génotoxique aiguë ou chronique. Neurosciences. Institut Polytechnique de Paris, 2019. Français. NNT : 2019IPPAX010 . tel-02918458

**HAL Id: tel-02918458**

**<https://theses.hal.science/tel-02918458v1>**

Submitted on 20 Aug 2020

**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.

# Maintenance de la stabilité chromosomique des cellules souches neurales murines au cours du développement et après un stress génomique aigu ou chronique

Thèse de doctorat de l'Institut Polytechnique de Paris  
Préparée à l'école Polytechnique

École doctorale n°626 de l'Institut Polytechnique de Paris (ED IP Paris)  
Spécialité de doctorat : Neurosciences

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 04 Décembre 2019, par

**Sofiane MOKRANI**

## Composition du Jury :

Valérie CORONAS <i>Professeur des universités, Université de Poitiers</i>	Présidente du jury
Marc BENDERITTER <i>Directeur de recherche, IRSN</i>	Rapporteur
François PARIS <i>Directeur de recherche, INSERM</i>	Rapporteur
Marie-Pierre JUNIER <i>Directeur de recherche, INSERM</i>	Examinatrice
Christian GRISOLIA <i>Directeur de recherche, CEA</i>	Directeur de thèse
Christine GRANOTIER-BECKERS <i>Chercheur, CEA</i>	Invitée
François BOUSSIN <i>Directeur de recherche, CEA</i>	Invité



## **Remerciements**

*Mes remerciements vont, en premier lieu, aux deux rapporteurs, Dr. Marc BENDERITTER et Dr. François PARIS pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et l'évaluation de mon manuscrit de thèse. Je remercie également les Pr. Valérie CORONAS et Dr. Marie-Pierre JUNIER d'avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.*

*Je remercie François BOUSSIN, responsable du laboratoire de radiopathologie et directeur de l'unité mixte UMR E008, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Au-delà de nos discussions scientifiques très intéressantes et très dynamiques, j'ai eu avec toi des heures de discussion en politique, en sport et en philosophie. Nous avons refait le monde plusieurs fois et j'avoue que j'ai appris beaucoup de choses et surtout ça m'a permis de développer un sens critique et une ouverture d'esprit. Merci Chef.*

*Je remercie Christian GRISOLIA, mon directeur de thèse, qui malgré la distance géographique entre Cadarache et Fontenay-aux-Roses et surtout thématique entre la physique et la biologie a su faciliter nos échanges et instaurer un terrain d'entente. Christian, tu m'as toujours fait confiance et cela depuis le premier jour et ce n'était pas évident ! j'ai beaucoup apprécié ta présence et ton soutien lors du congrès Tritium en Corée du sud. Le mail que t'as envoyé à François et à Christine après ma présentation pour me féliciter restera dans ma mémoire, merci.*

*Et voilà j'arrive à Christine GRANOTIER-BECKERS, à qui je réserve ma plus grande gratitude. Quoi que je dise, mes mots ne valent pas toute la bienveillance, la compréhension et le soutien que j'ai reçu de toi. Tu m'as appris à faire de la science. Tu m'as accompagné dans mes expériences, dans la préparation de mes présentations et plus important encore, tu m'as écouté longtemps ! j'espère que la fin de cette thèse soit le début d'une véritable amitié. Merci Christine.*

*Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire, avec qui j'avais une entente parfaite. Merci Marc-André d'avoir partagé ton bureau avec moi. Merci à Lisa de m'avoir supporté dans le bureau, surtout quand je parle tout seul. Merci à Olivier et Thierry, mes grands frères, avec qui j'ai fait un peu de science et beaucoup de Basket ! Thierry, qui a toujours su profiter de mes moments difficiles pour me battre et Olivier, qui malgré mes moments difficiles n'a jamais su me battre 😂. Merci à Alexandra, chiche, la star du labo avec qui j'ai*

*tant rigolé, tes blagues un peu... vont me manquer énormément. Merci à Laurent pour ta patience, toi qui as subi mes longues discussions avec Christine.*

*Merci à tous les étudiants du laboratoire, Lise, Dalal, Mahassen et Aurélien qui sont déjà partis et à qui je souhaite plein de succès. Je souhaite une bonne continuation à Corentin et Justine pour le reste de leurs parcours au LRP !*

*Je remercie Aurélie et Arielle, qui m'ont toujours accompagné dans mes démarches administratives et qui étaient toujours disponibles pour répondre à mes questions. Merci à tous les autres membres de l'institut avec qui j'avais des échanges amicaux ; Luis, Chantal, Pierre, Jérôme, Sébastien et j'en passe !*

*Merci à Bernard ROUSSEAU, de m'avoir reçu à Saclay toujours avec la bonne humeur. Merci à Mickael PAYET pour toutes les manip d'autoradiographie et ton accompagnement pendant le congrès Tritium en Corée du Sud.*

*Je tien également à remercier le CEA d'avoir financé mes trois années de thèse.*

*Merci à mes parent Si Lounas et Ourida, qui malgré qu'ils ne comprennent pas tout ce que je raconte dans cette thèse, ils me disent que c'est bien. Merci à mes deux sœurs, Zohra et Nawal et à mes deux frères Lyes et Redwan.*

*Enfin, Merci à toi mon dieu de m'avoir accordé la chance d'arriver là et de connaître tous ces gens. L'histoire j'espère ne s'arrêtera pas là et j'irai grâce à ton aide encore plus loin.*

**Merci,**

## LISTE DE PUBLICATIONS ET DE COMMUNICATIONS

### PUBLICATIONS

---

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin.

Higher chromosome stability in mouse embryonic neural stem and progenitor cells than in fibroblasts in response to acute or chronic genotoxic stress. En cours de soumission.

Amandine Bery, Olivier Etienne, Elodie A. Pérès, **Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Antony Laugeray, Chantal Desmaze, Laurent R Gauthier, Marion Martin, Fawzi Boumezbeur, Vincent Abramovski, Stéphane Mortaud, Jean-Pierre de Villartay, Denis Le Bihan, Arnaud Menuet, François D. Boussin.

Impaired brain development and behavior of Xlf null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis. En cours de re-soumission.

### COMMUNICATIONS ORALES

---

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin.

Strong differences between DNA damage responses of embryonic neural stem cells and fibroblasts.

16<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research (ICRR), 25-29 Août 2019, Manchester, Angleterre.

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin.

Differential DNA Damage Responses of Embryonic Neural Stem Cells and Fibroblasts after Tritiated Thymidine Contamination.

International conference « Tritium 2019 », 22-26 Avril 2019, Busan, Corée du Sud.

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin.

Differential responses to tritiated thymidine incorporation between mouse embryonic neural stem cells and fibroblasts.

12<sup>th</sup> International Conference on the Health Effects of Incorporated Radionuclides (HEIR), 8-11 Octobre 2018, IRSN Fontenay-aux-Roses, France (**Young Investigator ward**).

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin.

Chromosome instability in neural stem cells following ionizing radiation exposure. Journée de l'institut IRCM, 7 Juin 2018, CEA Fontenay-aux-Roses, France.

## COMMUNICATIONS ECRITES

---

Christine Granotier-Beckers, **Sofiane Mokrani** and François D. Boussin.

Effects of tritiated thymidine on human neural stem and progenitor cells.

12<sup>th</sup> International Conference on the Health Effects of Incorporated Radionuclides (HEIR), 8-11 Octobre 2018, IRSN Fontenay-aux-Roses, France (**Best Poster Award**).

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Aurélien Richard, Olivier Etienne, Bernard Rousseau, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin, Christian Grisolia.

Tritiated thymidine impairs genetic stability of neural stem and progenitor cells: importance of NHEJ DNA repair pathway. Journée de l'école doctorale Interfaces (ED 573), 19 Décembre 2017, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines: UVSQ, France.

## SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 Avant-propos : importance de la stabilité génétique des cellules souches</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN radio-induites</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Cassures double brin (CDB).....	18
1.2.2 Signalisation des CDB.....	18
1.2.3 Activation des points de contrôle du cycle cellulaire .....	20
1.2.4 Réparation des cassures double brin.....	22
1.2.4.1 Recombinaison homologue (HR, Homologous Recombination).....	22
1.2.4.2 La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, Non-Homologous End-Joining).....	24
1.2.4.2.1 NHEJ classique ou canonique (C-NHEJ) .....	24
1.2.4.2.2 La protéine XLF (XRCC4 Like Factor, ou Cernunnos).....	27
1.2.4.2.3 NHEJ alternatif .....	29
1.2.5 Choix du mécanisme de réparation des CDB .....	30
1.2.6 Conséquences des CDB mal réparées ou non réparées .....	32
1.2.6.1 Instabilité chromosomique.....	32
1.2.6.2 Apoptose (Mort cellulaire programmée) .....	34
1.2.6.3 Sénescence.....	35
1.2.6.4 Catastrophe mitotique.....	37
<b>1.3 Neurogenèse</b> .....	<b>38</b>
1.3.1 Neurogenèse embryonnaire : développement du cortex cérébral.....	38
1.3.1.1 Structure du cortex cérébral.....	38
1.3.1.2 Les cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN).....	39
1.3.1.3 Migration neuronale.....	44
1.3.1.4 Apoptose neuronale .....	45
1.3.2 Neurogenèse adulte.....	46
<b>1.4 Réponse cellulaire aux CDB pendant le développement du cerveau</b> .....	<b>47</b>
1.4.1 Conséquences neurologiques d'un défaut de réponse aux CDB .....	47
1.4.1.1 Conséquences neurologiques d'un défaut de signalisation des CDB .....	48
1.4.1.2 Conséquences neurologiques d'un défaut de réparation des CDB .....	49
1.4.2 Conséquences neurologiques d'une irradiation du cerveau en développement.....	49
1.4.2.1 Effets cellulaires immédiats d'une irradiation prénatale .....	50
1.4.2.1.1 Les CDB radio-induites et arrêts du cycle cellulaire.....	50
1.4.2.1.2 Apoptose radio-induite.....	52
1.4.2.2 Effets à long terme d'une irradiation prénatale .....	54



1.4.2.2.1	Conséquences sur la structure du cerveau .....	54
1.4.2.2.2	Conséquences sur les fonctions cognitives .....	54
1.4.3	Les CDB : vecteur de diversité neuronale .....	55
<b>2.</b>	<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF.....</b>	<b>63</b>
3.1.1	Mise au point d'un protocole d'obtention de métaphase de CSPN <i>ex vivo</i> .....	64
3.1.2	Résultats : Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF .....	68
3.1.3	Impaired brain development and behavior of <i>Xlf</i> null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis (ARTICLE 1).....	72
3.1.4	Discussion article 1 : Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF.....	110
<b>3.2</b>	<b>Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF <i>in vitro</i>, en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique.....</b>	<b>115</b>
3.2.1	Résultats : Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF <i>in vitro</i> , en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique.....	116
3.2.2	Higher Chromosome Stability in Mouse Embryonic Neural Stem and Progenitor Cells than in Fibroblasts in Response to Acute or Chronic Genotoxic Stress (ARTICLE 2).....	120
3.2.3	Discussion article 2 : Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF <i>in vitro</i> , en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique .....	157
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>162</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>168</b>
<b>6.</b>	<b>ANNEXE.....</b>	<b>172</b>
	<b>Optimisation de la méthode d'autoradiographie et mise au point d'un protocole pour la caractérisation des plaques de tungstène tritiés .....</b>	<b>172</b>
<b>6.1</b>	<b>Résultats et progression des travaux.....</b>	<b>174</b>
<b>6.2</b>	<b>Développement d'un protocole d'autoradiographie pour la caractérisation des plaques de tungstène tritié.....</b>	<b>176</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>180</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Impact des dommages à l'ADN sur les cellules souches (adapté de Mandal et coll., 2011).....	14
Figure 2 : Vue d'ensemble des dommages radio-induits de l'ADN (adapté de Kavanagh et coll., 2013).....	17
Figure 3 : Représentation schématique des voies de signalisation des CDB (adapté de Turnel et coll., 2012).....	19
Figure 4 : Progression du cycle cellulaire et activation des points de contrôle. ....	21
Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme de la recombinaison homologe, HR (adapté de Dueva et Iliakis, 2013).....	24
Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme de jonction d'extrémités non homologues, NHEJ (adapté de Dueva et Iliakis, 2013). ....	25
Figure 7 : Structure de la protéine XLF et comparaison avec XRCC4.....	28
Figure 8 : Représentation schématique des protéines participant à la voie Alt-NHEJ (adapté de Dueva et Iliakis, 2013). ....	30
Figure 9: Choix de la voie de réparation des cassures double brin (CDB) (adapté de Kakarougkas et coll., 2013).....	31
Figure 10 : Illustration schématique de la formation des aberrations chromosomiques.....	33
Figure 11: Voie de signalisation de l'apoptose induite par les cassures double brin (CDB) (adapté de Ashkenazi et coll., 2002). ....	35
Figure 12 : Voie de signalisation de la sénescence induite par les cassures double brin (CDB) (adapté de Gewirtz et coll., 2008). ....	36
Figure 13 : Caractéristiques morphologiques de la catastrophe mitotique (adapté MC Gee, 2015).....	37
Figure 14: Représentation du cortex cérébral murin pendant le développement embryonnaire et postnatale (adapté de Marcom et coll., 2016). ....	39
Figure 15 : Migration Nucléaire Intercinétique (MNI) et polarité apico-basale des cellules neuroépithéliales (adapté de Taverna et Huttner, 2010).....	40
Figure 16 : Divisions symétriques et asymétriques des CSPN (adapté de Sun et Hevner, 2014). ....	41
Figure 17 : Représentation schématique de la neurogenèse embryonnaire du cortex cérébral (adapté de Paridaen et Huttner, 2014).....	42
Figure 18 : Origine et voies de migration des neurones glutamatergiques et GABAergiques (adapté de Luhmann et coll., 2015).....	45
Figure 19 : Principales zones de neurogenèse dans le cerveau adulte murin (A) et humain (B) (adapté de Ernst et Frisé, 2015).....	46
Figure 20 : Identification de longs gènes abritant des clusters récurrents de CDB dans les CSPN (adapté de Wei et coll., 2016).....	56
Figure 21 : Identification des clusters de CDB après introduction d'amorces de CDB par la technique CRISPR/Cas9 (Wei et coll., 2018). ....	57
Figure 22 : Comparaison des étalements de chromosome métaphasiques <i>ex-vivo</i> , avec ou sans utilisation de colchicine.....	67
Figure 23.: Schématisation des étapes clés du protocole d'autoradiographie cellulaire. ....	173
Figure 24 .: Détection spécifique de grains d'argent avec l'émulsion UL 2 (100 nm) qui reste nettement moins sensible que l'émulsion commerciale NTB (400 nm). ....	175
Figure 25 : Absence de détection spécifique de grains d'argent avec l'émulsion UL 3 (100 nm) dopée au formiate, qui montre un fort bruit de fond. ....	176

Figure 26 : Comparaison des deux méthodes d'autoradiographie cellulaire, par contact et standard. ....	178
Figure 27 : Résultats préliminaires d'autoradiographie par contact entre une lame recouverte d'émulsion NTB (400 nm) et une plaque de tungstène tritiée. ....	179

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Fréquence des dommages à l'ADN par cellule induits de façon endogène ou par 1 Gy d'irradiation (adapté de Sage et coll., 2017).....	17
Tableau 2 : Résumé des propriétés cellulaires des différents types de CSPN dans le cortex en développement (adapté de Florio et Huttner, 2014).....	43
Tableau 3 : Les principaux troubles neurologiques humains associés à des défauts de réponse aux dommages de l'ADN (adapté de Barzilai et coll., 2008).....	47
Tableau 4 : Dommages à l'ADN radio-induits et cinétique de réparation dans le cortex murin en développement (adapté de Verreet et coll., 2016).....	51
Tableau 5 : Apoptose radio-induite dans le cortex murin en développement (adapté de Verreet et coll., 2016).....	53
Tableau 6 : Récapitulatif des tests réalisés et des résultats de l'optimisation du protocole d'obtention des chromosomes métaphasiques <i>ex-vivo</i> des CSPN isolés à partir du cortex cérébral d'embryons de souris à E14,5. ....	66
Tableau 7 : Récapitulatif des résultats d'autoradiographie cellulaire réalisée avec les émulsions argentiques produites par la société Ultimate Holography. ....	175

## ABREVIATIONS

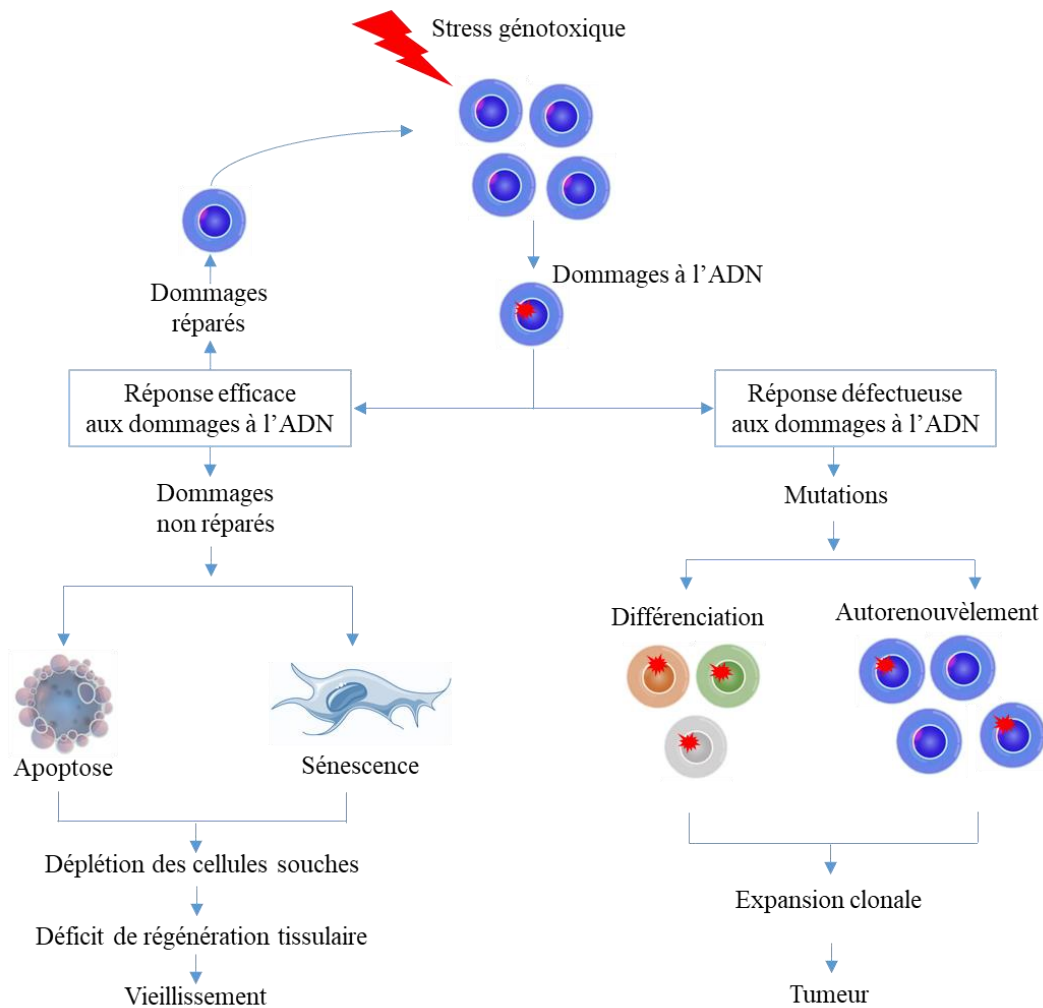
53BP1 : p53-binding protein 1	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	ITER : International Thermonuclear Experimental Reactor
APAF 1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	LGE : Eminences Ganglionnaires Latérales
A-T : Ataxie Téléangiectasie	MDC1 : Mediator of DNA-damage checkpoint 1
ATLD : A-T Like Disease	MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	MGE : Eminences Ganglionnaires Médianes
ATR : Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein	MNI : Migration Nucléaire Intercinétique
ATRIP : ATR-interacting protein	MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
BLBP : brain lipid-binding protein	MST : Mitotic Somal Translocation
BO : Bulbe Olfactif	Nestin : NeuroEctodermal Stem cell marker
Bq : Becquerels	NHEJ : Non-Homologous End-Joining
CCS : Cassures chromosomiques	PARP : Poly(ADP-ribose) Polymérase
CCT : Cassures chromatidiennes	PC : Plaque Corticale
CDB : Cassures double-brin	Pib : Progéniteurs Intermédiaires basaux
CDK Cyclin-Dépendent Kinases	PNK : PolyNucleotide Kinase
CGR : Cellules de la glie radiaire	PUMA : P53 upregulated modulator of apoptosis
CHK : Checkpoint kinase	QI : Quotient Intellectuel
CNE : Cellules neuroépithéliales	RI : Radiation ionisantes
CSB : Cassures simple-brin	ROS : Reactive Oxygen Species
CSE : Cellules Souches Embryonnaires	RPA : Protéine de réplication A
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques	SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
CSPN : Cellules souches et progéniteurs neuraux	SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing
DSBR : Double-Strand Break Repair	SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
GD : Gyrus Denté	Sox2 : SRY (sex determining region Y) box 2
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	TNF : Tumor Necrosis Factor
GLAST : Glutamate-aspartate transporter),	VL : Ventricules Latéraux
Gy : Gray	XLF : XRCC4-like factor
HR : Homologous recombination	ZI : Zone Intermédiaire
HTGTS : High Throughput, Genome-wide, Translocation Sequencing	ZSG : Zone Sous-Granulaire
IAP : Inhibitors of Apoptosis Proteins	ZSV : Zone sous-ventriculaire
	ZV : Zone ventriculaire

# **1. INTRODUCTION**

## **1.1 Avant-propos : importance de la stabilité génétique des cellules souches**

Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches permettent la génération des différents tissus de l'organisme grâce à leurs capacités illimitées ou prolongées d'autorenouveau et de différenciation en cellules dotées de morphologies et de fonctions spécialisées. À l'âge adulte, elles permettent également le maintien de l'homéostasie tissulaire, par le contrôle de la balance entre le renouvellement et la mort cellulaire (Blanpain et coll., 2013 ; Weissman et coll., 2000 ; Chagastelles et coll., 2011).

La stabilité du génome des cellules souches est donc cruciale pour le bon fonctionnement cellulaire et la prévention de pathologies. Néanmoins, ces cellules souches sont particulièrement vulnérables aux altérations génétiques, étant donné leur potentiel de régénération très élevé (Behrens et coll., 2014). Ainsi, tout défaut de réponse aux dommages de l'ADN peut conduire à la transmission de dommages au niveau de leurs cellules filles, compromettant l'intégrité et la fonction des tissus (Vitale et coll., 2017). Une instabilité génétique au niveau des cellules souches peut aussi conduire à la diminution de leurs potentiels de renouvellement et/ou de différenciation, entraînant une atrophie tissulaire et/ou un vieillissement accéléré. D'autre part, des mutations qui offrent un avantage sélectif aux cellules souches peuvent être associées au développement de plusieurs cancers (Behrens et coll., 2014) (Figure 1).



**Figure 1 : Impact des dommages à l'ADN sur les cellules souches (adapté de Mandal et coll., 2011).**

Les dommages à l'ADN dans le compartiment des cellules souches sont suivis par l'induction d'une réponse robuste aux dommages à l'ADN. Lorsque la réponse est correctement exécutée, elle conduit à la réparation de l'ADN ou à l'apoptose ou une sénescence. Si l'élimination et la sénescence prévalent dans le temps, cela peut conduire à l'épuisement et au vieillissement du tissu. Lorsque les dommages à l'ADN échappent à la réponse cellulaire ou sont mal réparés, le pool de cellules souches peut accumuler des mutations. Celles-ci peuvent être propagées et amplifiées dans le compartiment de cellules souches par auto-renouvellement ou bien transmises aux cellules spécialisées par différenciation. Les mutations qui offrent un avantage sélectif aux cellules souches peuvent s'amplifier par le processus d'expansion clonale, pouvant conduire finalement à la tumorigenèse. L'ADN endommagé est représenté par une étoile rouge dans le noyau.

Afin de préserver leur stabilité génétique, les cellules de manière générale disposent d'un arsenal de protéines constituant des systèmes de réparation qui détectent les dommages au niveau de l'ADN et initient la voie de réparation appropriée en fonction des dommages détectés. La

longévité des cellules souches et leurs rôles essentiels dans le développement soulèvent la possibilité qu'elles soient dotées de mécanismes spécifiques et très robustes pour maintenir leur intégrité génétique. Ainsi, plusieurs études suggèrent que les cellules souches sont capables d'empêcher l'accumulation de lésions génétiques, de les réparer et d'éviter leur propagation aux cellules filles plus efficacement que dans les autres cellules somatiques (Maynard et coll., 2008 ; Mandal et coll., 2011 ; Insinga et coll., 2014).

Les données actuelles proviennent essentiellement de l'étude des cellules souches embryonnaires et des cellules souches hématopoïétiques. Cependant, peu d'études ont caractérisé la spécificité de réponse aux dommages à l'ADN des cellules souches neurales. Dans ce projet, nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la réponse aux dommages radio-induits de l'ADN des cellules souches neurales embryonnaires.



## **1.2 Réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN radio-induites**

Nous sommes exposés en permanence à différents types de radiations ionisantes (RI), qui peuvent provenir de sources naturelles (Soleil, radioéléments naturels) ou artificielles (radiothérapie, diagnostic médical, rejets des installations nucléaires, accident nucléaire). Les RI représentent une émission d'énergie qui se propage sous forme d'ondes électromagnétiques (rayons  $\gamma$  ou X) ou de particules (particules  $\beta$  ou  $\alpha$ ). Les rayonnements sont dits ionisants quand ils émettent suffisamment d'énergie pour transformer les atomes qu'ils traversent en ions. Ces radiations diffèrent de par leur nature et leur pouvoir de pénétration dans l'air et dans la matière. Il existe deux modes d'exposition au RI, on parle d'irradiation quand une personne reçoit un rayonnement émis par une source située à l'extérieur de son organisme et de contamination quand les éléments radioactifs ont pénétré à l'intérieur de l'organisme.

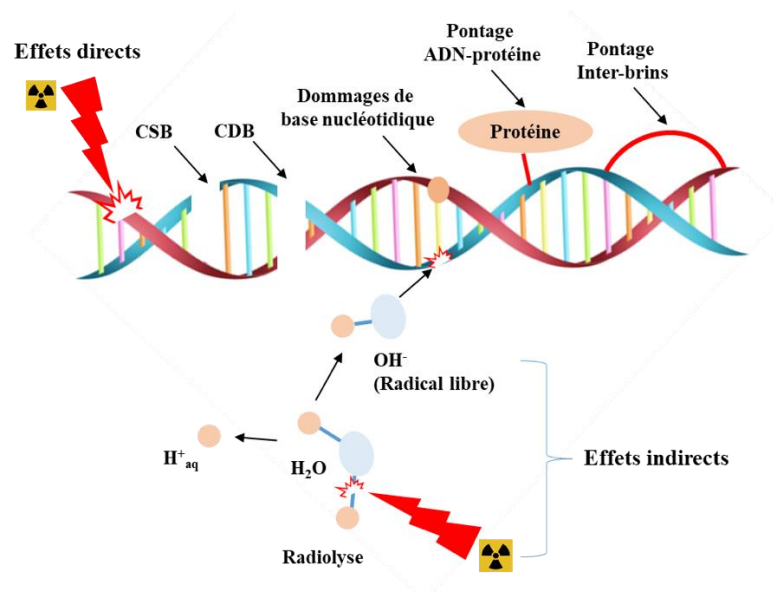
L'activité radioactive est mesurée en Becquerels (Bq), correspondant à une désintégration d'un atome radioactif par seconde. Une autre unité fréquemment utilisée est le Gray (Gy), qui correspond à l'énergie absorbée par un kilogramme de matière exposé à un rayonnement ionisant (1 Gy = 1 Joule/kg).

Qu'elles soient électromagnétiques ou particulaires, les radiations ionisantes sont capables d'interagir avec tous les composants cellulaires. Néanmoins, l'ADN est la cible moléculaire la plus susceptible de compromettre durablement l'intégrité cellulaire. Il est désormais établi que les radiations génèrent un large spectre de lésions d'ADN, notamment des dommages au niveau des bases nucléotidiques, la formation de pontages covalents intra- ou inter-brins, des pontages entre l'ADN et des protéines adjacentes, ainsi que des cassures simple-brin (CSB) ou double-brin (CDB) (Jeggo et coll., 2007) (Tableau 1).

Type de dommage	Dommages radio-induits (1Gy) par cellule	Dommages endogènes par cellule et par jour
Cassures simple-brin	1000	> 10 000
Dommages de base nucléotidique	2000	3200
Sites abasiques	250	12 600
Pontages ADN-protéine	150	?
Cassures double-brin	40	40-50

**Tableau 1 : Fréquence des dommages à l'ADN par cellule induits de façon endogène ou par 1 Gy d'irradiation (adapté de Sage et coll., 2017).**

Les radiations ionisantes induisent des dommages de l'ADN par interaction directe avec les liaisons covalentes de l'ADN, ou bien de façon indirecte *via* la radiolyse de l'eau à proximité de l'ADN et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS Reactive Oxygen Species) qui sont à l'origine du stress oxydant (Kavanagh et coll., 2013) (Figure 2).



**Figure 2 : Vue d'ensemble des dommages radio-induits de l'ADN (adapté de Kavanagh et coll., 2013).**

Les radiations ionisantes induisent de nombreux types de dommages à l'ADN, par voies directes et indirectes. Ces dommages incluent des lésions simples, telles que des modifications de bases ou de sucres, des pontages ADN-protéines, des pontages inter-brins, des cassures simple-brin (CSB) et des lésions plus complexes, comme les cassures double-brin (CDB).

### **1.2.1 Cassures double-brin (CDB)**

Parmi les dommages d'ADN radio-induits, les cassures double-brin, qui surviennent lorsque les deux brins d'ADN sont rompus sur la même position génomique, sont les plus délétères. Leur persistance peut conduire à une perte de matériel génétique lors de la division cellulaire, et en conséquence, à la mort cellulaire (Roos et coll., 2006). D'autre part, leur mauvaise réparation peut générer des fusions entre CDB, conduisant à des mutations et/ou des réarrangements d'ADN qui peuvent impliquer un ou plusieurs chromosomes, donnant lieu par exemple à des translocations. L'instabilité génétique ainsi produite est à l'origine des cancers (Lieber et coll., 2010).

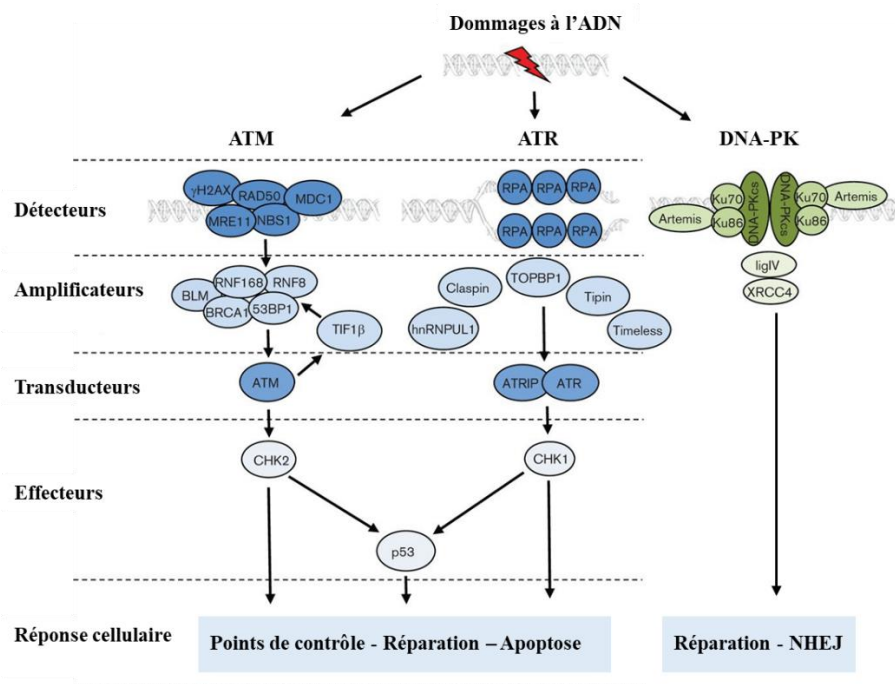
Mais, les CDB peuvent également être induites spontanément, par le métabolisme cellulaire, pendant les différentes phases du cycle cellulaire, notamment lors de la réplication, suite au blocage de la fourche de réplication, ainsi que pendant la transcription par la formation de structures trimériques ADN-ARN (R loops) (Mehta et coll., 2014).

Au-delà des conséquences potentiellement négatives, l'induction de CDB offre la possibilité de modifier fonctionnellement l'information génétique lors de plusieurs processus physiologiques. Par exemple, les altérations génomiques médiées par les CDB sont essentielles pour le développement et le fonctionnement du système immunitaire adaptatif. Ainsi, lors de la recombinaison V(D)J, les cellules progénitrices des lymphocytes utilisent les CDB pour générer un répertoire varié de récepteurs d'antigènes à la surface des lymphocytes T et d'anticorps synthétisés par les lymphocytes B. De plus, des études récentes sur les cellules souches neurales suggèrent la survenue d'un mécanisme similaire dans les progéniteurs neuraux, contribuant au développement de la diversité neuronale dans le cerveau (Wei et coll., 2016 et 2018, Alt et coll., 2018), (voir Paragraphe 1.4.3).

### **1.2.2 Signalisation des CDB**

La reconnaissance des CDB permet le ralentissement de la progression du cycle cellulaire afin de mettre en œuvre des processus de réparation et/ou l'élimination des cellules endommagées par le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) ou par sénescence (Cimprich et coll., 2008 ; Harper et coll., 2007).

La reconnaissance des CDB fait intervenir le complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, ou l'hétérodimère Ku70/Ku80 (Mirzoeva et coll., 2001, Rupnik et coll., 2009). Le premier mécanisme est initié par le complexe MRN, par l'intermédiaire de la protéine NBS1 qui active la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) par son extrémité C-terminale (Stracker et coll., 2007). Une fois activée, ATM s'auto-phosphoryle et phosphoryle plusieurs cibles, impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'initiation de la réparation des CDB (Lavin et coll., 2007) (Figure 3). Le deuxième mécanisme de détection fait intervenir l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui vient se fixer de chaque côté de la CDB, quelques secondes après son induction (Mari et coll., 2006). La première protéine ensuite recrutée et activée est DNA-PKcs (Yaneva et coll., 1997, Uematsu et coll., 2007). Les protéines DNA-PKcs recrutées de chaque côté de la CDB, forment un lien (synapse) entre les deux extrémités de la CDB, ce qui permet de protéger les extrémités d'ADN des nucléases et de faciliter la réparation (DeFazio et coll., 2002) (Figure 3).



**Figure 3 : Représentation schématique des voies de signalisation des CDB (adaptée de Turnel et coll., 2012).**

Dans la voie ATM, H2AX et MDC1 phosphorylées localisent le site de l'ADN endommagé et permettent le recrutement de la protéine ATM. L'activation d'ATM favorise le recrutement des protéines de réparation et régule les points de contrôles du cycle cellulaire à travers l'activation de CHK2 et P53. La voie ATR est activée par les dommages générés suite au blocage de la fourche de réplication. ATR est recrutée par ATRIP sur le site du dommage déjà enrobé par la protéine RPA. ATR permet une régulation du cycle cellulaire par l'activation de CHK1. La voie DNA-PK régule essentiellement la voie de réparation NHEJ. L'hétérodimère Ku70/Ku80 recrute deux molécules DNA-PKcs sur la CDB en formant un complexe synaptique, qui permet le recrutement des protéines de la voie NHEJ.

Les dommages générés suite au blocage de la fourche de réplication sont signalés principalement par la protéine ATR (Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3-related protein). La protéine de réplication A (RPA) se lie à l'ADN simple brin généré au niveau des fourches de réplication bloquées, ce qui permet ensuite le recrutement d'ATR par l'intermédiaire de la protéine ATRIP (ATR-interacting protein) (Cimprich et coll., 2008).

ATM et ATR, une fois activées, phosphorylent plusieurs cibles dont la sérine 139 des histones 2A.X (H2AX). Cette phosphorylation est détectable 1 min après irradiation et atteint son maximum en quinze à trente minutes. Cela permet la formation rapide de foyers détectables par immunofluorescence, qui sont souvent utilisés comme marqueurs des CDB (Rogakou et coll., 1998). H2AX phosphorylée ( $\gamma$ -H2AX) permet un remodelage de la chromatine, qui facilite l'accès des protéines de réparation au niveau de la CDB.  $\gamma$ -H2AX permet également le recrutement de la protéine MDC1 (mediator of DNA-damage checkpoint 1). A son tour, MDC1 propage et amplifie la phosphorylation de H2AX en recrutant plus de protéines MRN et ATM (Dickey et coll., 2009).

La relaxation de la chromatine au niveau de la CDB favorise également la liaison de la protéine 53BP1. Cette dernière est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et le choix de la voie de réparation des CDB (Panier et coll., 2014).

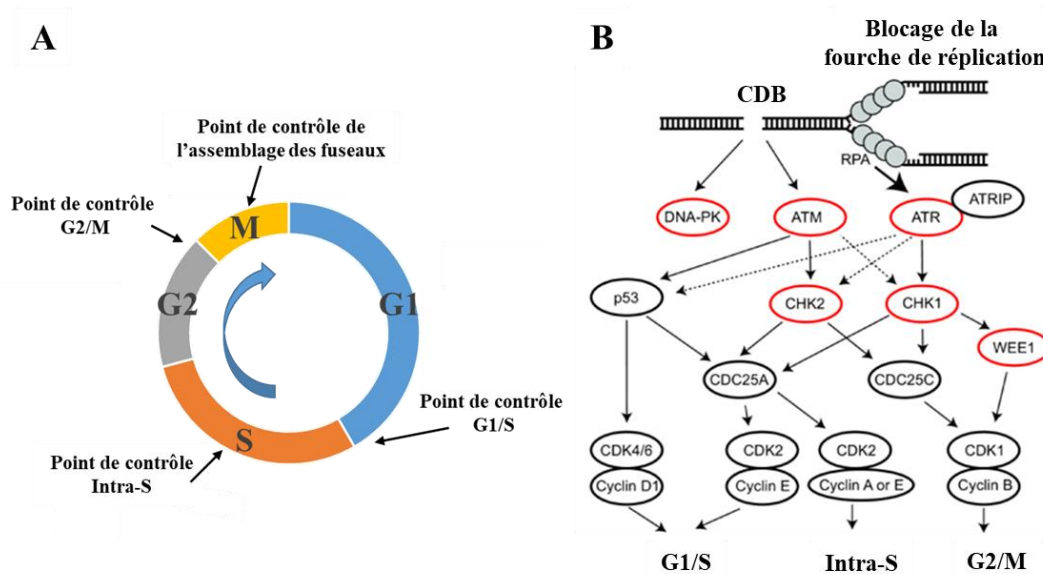
L'importance d'une détection efficace des dommages de l'ADN est clairement illustrée chez les individus présentant des défauts héréditaires des facteurs de la signalisation des CDB, donnant lieu à des pathologies graves, notamment des déficits immunitaires, des dégénérescences neurologiques et une susceptibilité élevée au cancer (Giglia-Mari et coll., 2011).

### **1.2.3 Activation des points de contrôle du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire comporte quatre phases successives : G1, S, G2 et M (mitose). La progression du cycle entre ces différentes phases est assurée essentiellement par les complexes protéiques formés par les cyclines et les CDK (Cyclin-Dependent Kinases). On distingue essentiellement trois points de contrôle au cours du cycle cellulaire : (i) lors de la transition G1/S, (ii) intra S et (iii) lors de la transition G2/M (Figure 4A). Le passage de la phase G1 en S est assuré par le complexe cycline D-CDK4/6, puis le complexe cycline A/E-CDK2 assure la

progression lors de la phase S, tandis que le complexe cycline B-CDK1 assure le passage G2/M. Les phosphatases Cdc25 (Cdc25 ; Cdc25A et Cdc25C) interagissent également avec les CDK afin de réguler la progression du cycle cellulaire. Alors que Cdc25A joue un rôle majeur dans la transition G1/S, Cdc25 B et C sont nécessaires pour l'entrée en mitose (Hofmann et coll., 2000 ; Karlsson-Rosenthal et coll., 2006).

Au cours de la réponse aux dommages de l'ADN, les voies de réparation sont étroitement coordonnées avec la progression du cycle cellulaire. Cette coordination passe par l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire « Checkpoints », permettant de retarder voire arrêter le cycle cellulaire au niveau des stades critiques, notamment avant et après réplication (Patil et coll., 2013 ; Lazzaro et coll., 2009).



**Figure 4 : Progression du cycle cellulaire et activation des points de contrôle.**  
**A)** Représentation des phases du cycle cellulaire et des points de contrôle (adaptée de Schnerch et coll., 2012). **B)** Voies de signalisation conduisant à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (adaptées de Brandsma et coll., 2017).

Le blocage de la transition G1/S permet d'empêcher la cellule de répliquer de l'ADN endommagé, ce qui aurait pour effet d'amplifier et d'aggraver les dommages. L'induction de cet arrêt nécessite l'activation de la protéine CHK2 par phosphorylation *via* ATM (Figure 4B). CHK2 phosphoryle ensuite la protéine Cdc25A (Falck et coll., 2001), ce qui entraîne sa dégradation et inhibe l'activation du complexe cycline E-CDK2 entraînant le blocage de la transition G1/S (Mailand et coll., 2000). D'autre part, la phosphorylation de P53 par ATM induit

l'expression de P21, responsable de l'inhibition du complexe cycline D-CDK4/6, bloquant ainsi l'entrée en phase S de la cellule.

L'arrêt intra-S entraîne un ralentissement de la phase S et empêche la progression de la fourche de réplication. L'arrêt intra-S est médié par ATM et ATR, qui phosphorylent les kinases CHK2 et CHK1 respectivement, ce qui entraîne la dégradation de Cdc25A et l'inhibition du complexe cycline A ou E-CDK2, empêchant ainsi l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la fourche de réplication (Iyer et coll., 2017).

L'arrêt en G2/M permet de prévenir l'entrée en mitose des cellules trop endommagées. La phosphorylation de Cdc25C empêche l'activation du complexe cycline B-CDK1 et entraîne l'arrêt du cycle en G2. De plus, ATM et ATR activent également une signalisation dépendante de P53, conduisant à l'activation de P21, qui se lie et inhibe les complexes cycline B-CDK1 et induit le blocage en G2/M (Wang et coll., 2009).

#### **1.2.4 Réparation des cassures double-brin**

La réparation des CDB, qui sont considérées comme les lésions les plus délétères, est critique pour la survie cellulaire et la maintenance de l'intégrité du génome. L'absence ou l'altération de la réparation des CDB conduit à une forte instabilité chromosomique associée à de nombreux désordres développementaux, immunologiques, neurologiques et tumoraux (McKinnon et coll., 2009). La réparation des CDB implique différents mécanismes dont les plus importants sont le mécanisme de recombinaison homologue, HR (Homologous Recombination) et le mécanisme de la jonction d'extrémités non homologues, NHEJ (Non-Homologous End-Joining) (Ciccia et coll., 2010).

##### **1.2.4.1 Recombinaison homologue (HR, Homologous Recombination)**

La recombinaison homologue est une voie majeure de réparation des CDB, qui fonctionne uniquement durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, quand une chromatide sœur est disponible pour être utilisée comme une copie originale (Goodarzi et Jeggo, 2013 ; Johnson et

Jasin 2000). Elle intervient également pendant la réplication afin de restaurer une fourche de réplication bloquée (Costes et Lambert, 2012).

La voie HR se déroule en trois phases : pré-synaptique, synaptique et post-synaptique.

#### La phase pré-synaptique :

Le mécanisme HR est initié par une étape de résection à l'aide du complexe MRN et d'autres protéines accessoires comprenant CtIP, BRCA1, BLM et Exo1. Cela permet de dégrader les deux extrémités de la CDB afin de produire un ADN simple brin avec une extrémité 3', qui est ensuite reconnu par la protéine RPA, permettant de signaler la CDB *via* la voie ATR. La protéine RPA est ensuite déplacée par les protéines RAD52 et BRCA2 pour permettre le recrutement de RAD51 et la formation du nucléo-filament RAD51 (Egglér et coll., 2002) (Figure 5).

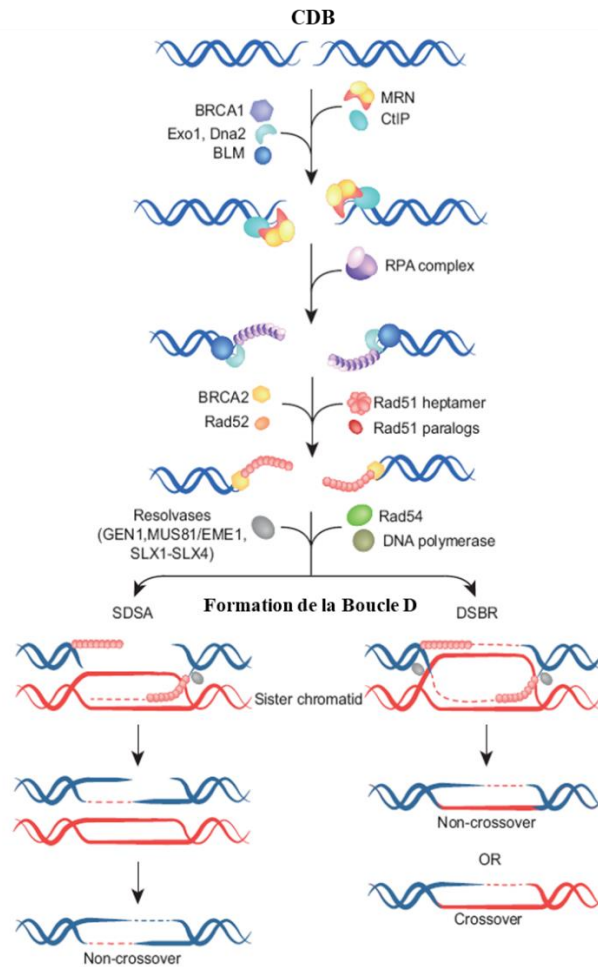
#### La phase synaptique :

Le nucléo-filament RAD51 recherche une séquence homologue. La protéine RAD54 intervient ensuite pour former un ADN hétéroduplex dû à l'appariement de l'extrémité 3' simple brin liée à Rad51 avec le brin de polarité opposée comprenant la séquence homologue. La structure résultante est connue sous le nom de boucle D (Heyer et coll., 2006 ; Wright et Heyer, 2014).

#### La phase post-synaptique :

Après formation de la boucle D, les ADN polymérasés  $\delta$  et  $\eta$  synthétisent l'ADN en utilisant le brin complémentaire comme substrat et le brin envahissant comme amorce, conduisant à la formation de la jonction de Holliday. Cette dernière désigne la structure dans laquelle les deux brins des deux molécules d'ADN impliquées dans la recombinaison se croisent. Deux modèles ont été décrits dans la formation des jonctions de Holliday : le modèle SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) qui intervient quand une seule extrémité 3' simple brin contribue à la formation d'une jonction de Holliday et le modèle DSBR (Double-Strand Break Repair) qui est impliqué lorsque deux extrémités 3' simple brin contribuent à la formation de deux jonctions de Holliday. Enfin, la résolution des jonctions de Holliday fait intervenir des résolvasés, comme GEN1, MUS81/EME1, SLX1-SLX4 permettant de rétablir la séquence d'ADN autour de la CDB avec ou sans cross-over (West, 2003).





**Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme de la recombinaison homologue, HR (adaptée de Dueva et Iliakis, 2013).**

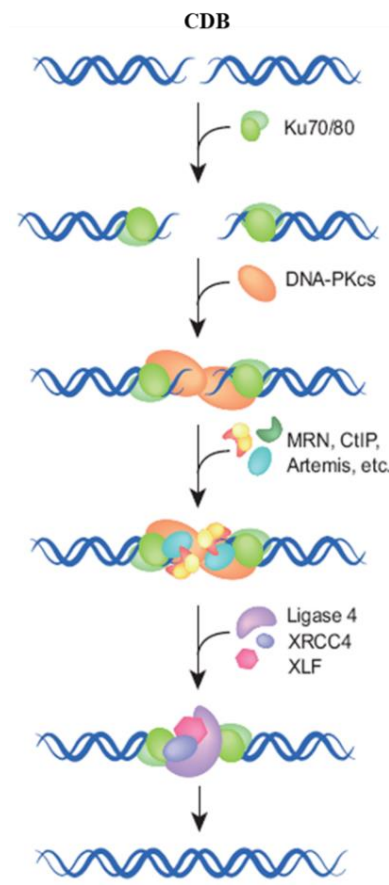
## 1.2.4.2 La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, Non-Homologous End-Joining)

### 1.2.4.2.1 NHEJ classique ou canonique (C-NHEJ)

Chez les mammifères, NHEJ est le mécanisme principal de réparation des CDB (Burma et coll., 2006) qui permet la ligature directe de ses deux extrémités sans nécessiter une homologie de séquence. Ainsi, NHEJ peut intervenir tout au long du cycle cellulaire (Karanam et coll., 2012). Le mécanisme NHEJ peut être divisé en trois phases principales : (i) la détection des cassures, (ii) la maturation des extrémités de l'ADN afin de les rendre compatibles pour une ligature et enfin (iii) la ligature de l'ADN (Davis et Chen, 2013) (Figure 6).

## Détection des cassures par le complexe DNA-PK

Dans les cellules eucaryotes, les CDB sont rapidement reconnues par l'hétérodimère Ku, composé de deux sous-unités Ku70 (70 kDa) et Ku80 (80 kDa) (Koike et coll., 2001), qui sont très abondantes (environ 300 000 molécules par cellules chez l'homme), et présentent une grande affinité pour les extrémités d'ADN issues de CDB (Lieber et coll., 1997). L'hétérodimérisation des deux sous-unités autour de l'ADN permet le recrutement de DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK (Singleton et coll., 1999). Deux DNA-PK fixées de part et d'autre stabilisent les deux extrémités de la CDB côte à côte, en formant une structure dénommée synapse du NHEJ (Spagnolo et coll., 2006). Cette dernière permet le rapprochement des deux extrémités de l'ADN et empêche la dégradation des extrémités par des nucléases (Mahaney et coll., 2009 ; Meek et coll., 2008). La formation du complexe DNA-PK provoque la phosphorylation d'autres protéines impliquées dans la voie NHEJ, notamment Ligase IV, XRCC4 (Hsu et coll., 2002 ; Mari et coll., 2006, Wang et coll., 2004), Artémis (Drouet et coll., 2006 ; Goodarzi et coll., 2006) et XLF (aussi appelé Cernunnos) (Yano et coll., 2007 et 2011).



**Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme de jonction d'extrémités non homologues, NHEJ (adaptée de Dueva et Iliakis, 2013).**

### Maturation des extrémités de la CDB

Selon la nature de la CDB, une étape de maturation des extrémités pourrait avoir lieu afin de faciliter la ligature. Si la CDB présente des extrémités 3'-OH et 5'-P intactes, l'étape de ligature peut avoir lieu directement après la détection. Si ce n'est pas le cas, des enzymes de maturation sont recrutées afin de reconstituer des extrémités 3'OH et 5'P adaptées.

Les protéines impliquées dans la résection des extrémités d'ADN lors du NHEJ sont Artémis, WRN et APLF (Aprataxin and PNK-like factor) (Davis et coll., 2013). Artémis possède plusieurs activités nucléasiques activées suite à son interaction avec DNA-PKcs (Kurosawa et Adachi, 2010) : une activité endonucléase 5', une activité exonucléase 5'-3' orientée sur l'ADN simple brin et une capacité à supprimer les groupements 3' phosphoglycolates des extrémités de l'ADN (Povirk et coll., 2007). L'implication de la protéine WRN lors du NHEJ a été démontrée suite à ses interactions avec Ku70/80 et le complexe XRCC4/Ligase IV (Kusumoto et coll., 2008), lui conférant une activité hélicase 3'-5' et une activité exonucléase 3'-5'. La protéine APLF possède des activités, endonucléase et exonucléase, compatibles avec un rôle dans la maturation des extrémités de l'ADN. APLF interagit avec PARP 1 et d'autres protéines de la voie NHEJ, dont Ku80, XRCC4 et Ligase IV (Kanno et coll., 2007). Lorsque la complexité des CDB le nécessite, les lacunes (gaps) au niveau de l'ADN peuvent être comblées par les polymérases de la famille X, notamment les polymérases  $\mu$  and  $\lambda$  (Nick McElhinny et coll., 2004 ; Moon et coll., 2007). Ces polymérases contiennent un domaine BRCT C-terminal nécessaire à leurs fonctions et leurs interactions avec les facteurs Ku, XRCC4 et Ligase IV (Mueller et coll., 2008). De plus, la protéine PNK (PolyNucleotide Kinase) possède des activités ADN 3'-phosphatase et ADN 5'-kinase, activées suite à son interaction avec le facteur XRCC4 permettant d'enlever les groupes 3'P et 5'OH non ligaturables au niveau des extrémités de CDB (Koch et coll., 2004).

### Ligature des deux extrémités de la CDB

L'étape finale de la réparation des CDB par NHEJ consiste à relier les deux extrémités de la CDB par un complexe de ligature, composé des trois protéines : ligase IV, XRCC4 et XLF (aussi appelée Cernunnos). La Ligase IV joue un rôle clé dans l'étape finale de la NHEJ, en permettant la ligature des extrémités d'ADN (Grawunder et coll., 1998). Cette ligature nécessite

la pré-adénylation de la Ligase IV qui est dépendante de l'hétérodimère Ku70/Ku80. Il a été démontré que les ligases I et III ne peuvent pas compenser l'absence de la ligase IV dans les cellules déficientes pour la ligase IV (Adachi et coll., 2001). La protéine XRCC4 (X-Ray-sensitive Cross-Complementing group 4) n'a pas d'activité enzymatique connue, mais permet de stabiliser la ligase IV (Grawunder et coll., 1997, Koch et coll., 2004) et agit comme une protéine d'échafaudage permettant d'interagir également avec d'autres protéines de la NHEJ, comme Ku (Mari et coll., 2006), PNK (Koch et coll., 2004), APLF (Iles et coll., 2007) et XLF (Ahnesorg et coll., 2006).

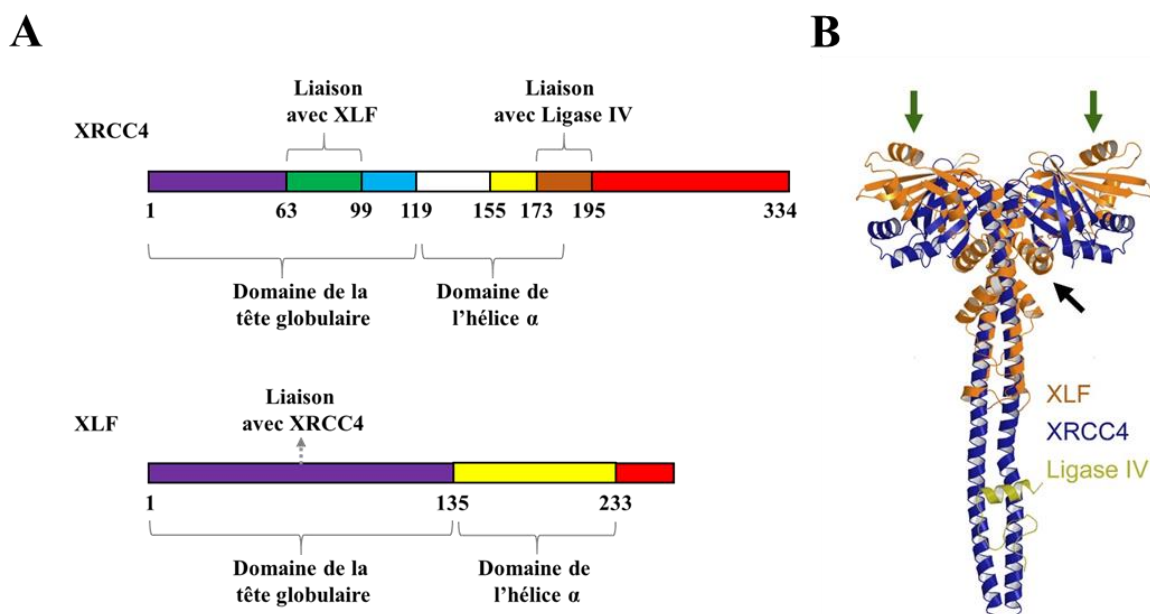
A la suite de la réparation par NHEJ, l'ensemble des protéines impliquées se dissocient de la molécule d'ADN. Cependant, peu de données sont disponibles concernant les mécanismes régissant la dissolution du complexe NHEJ. Des données récentes obtenues dans des cellules humaines montrent que la protéine E3 ubiquitine ligase RNF8 pourrait médier la dissociation de Ku des extrémités d'ADN (Feng et coll., 2011). De plus, l'état de phosphorylation de DNA-PKcs conditionne sa dissociation des CDB. En effet, l'autophosphorylation de DNA-PKcs induit un changement conformationnel conduisant à sa libération des extrémités de la CDB (Hammel et coll., 2010).

#### **1.2.4.2.2 La protéine XLF (XRCC4 Like Factor, ou Cernunnos)**

La découverte d'XLF a été précédée par l'identification d'un groupe de patients atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère « SCID » avec une forte radiosensibilité, mais n'ayant aucune mutation sur les facteurs de la NHEJ (Dai et coll., 2003). Plus tard, deux équipes ont identifié le gène responsable de ce syndrome, en utilisant deux approches expérimentales différentes.

En 2006, l'équipe de Jean Pierre de Villartay a identifié un groupe de 5 patients qui présentaient une lymphopénie B et T sévère et une microcéphalie. Un ensemble d'analyses *in vitro* sur les cellules de ces patients a démontré l'existence d'anomalies majeures du NHEJ, se traduisant notamment par une hypersensibilité aux radiations ionisantes et un défaut de réparation des CDB lors du processus de recombinaison V(D)J. Une approche de clonage par complémentation fonctionnelle à l'aide d'une banque d'ADN complémentaire a alors permis

d'identifier le gène Cernunnos, codant pour une protéine de 299 acides aminés jusqu'alors inconnue (Buck et coll., 2006) (Figure 7A).



**Figure 7 : Structure de la protéine XLF et comparaison avec XRCC4.**

A) Domaines structuraux des protéines XLF et XRCC4. XRCC4 : le domaine de la tête globulaire comprend les acides aminés (aa) 1-119 et le domaine en hélice  $\alpha$  comprend les aa 120-180. XLF : le domaine de la tête globulaire comprend les aa 1-135 et le domaine en hélice  $\alpha$  comprend les aa 136-233 (adapté de Menon et coll., 2017). B) Structure de cristal tridimensionnel des protéines XLF, XRCC4 et Ligase IV. Superposition des structures d'XLF (orange) et XRCC (bleu) liés à la Ligase IV (jaune) (adapté de Andres et coll., 2007).

En 2007, un équivalent de Cernunnos, dénommé XLF (XRCC4 Like Factor) a été identifié par l'équipe de S. Jackson à l'aide d'un crible double hybride visant à identifier les partenaires de la protéine XRCC4 (Ahnesorg et coll., 2006). En effet, XLF présente une structure similaire à celle de XRCC4 (Mahaney et coll., 2009), constituée d'un domaine en tête globulaire, d'une tige en hélice- $\alpha$  et d'un domaine C-terminal (Menon et Povirk, 2017). Les études par cristallographie ont confirmé la similitude de structure entre XLF et XRCC4 (Andres et coll., 2007 ; Li et coll., 2008). Cependant, l'étude plus attentive des structures tertiaires de ces protéines a révélé deux différences. La première est une plus grande rotation vers l'extérieur du domaine de tige en hélice- $\alpha$  dans XLF. La deuxième, contrairement à XRCC4, une partie de la double hélice située sur le domaine C-terminal de XLF se replie et s'enroule, ce qui pourrait expliquer l'absence d'interaction entre XLF et la Ligase IV (Figure 7B). XLF interagit avec le complexe

XRCC4/Ligase IV par la liaison de son domaine globulaire à celui de XRCC4 (Andres et coll., 2007).

XLF ne présente pas de fonction enzymatique connue, mais elle interagit avec le complexe XRCC4/Ligase IV (Andres et coll., 2007) et stimule la ligature d'extrémités de l'ADN par la ré-adénylation de la ligase IV (Riballo et coll., 2009). XLF stimule également l'action des polymérases  $\mu$  et  $\lambda$  (Akopiants et coll., 2009). Contrairement à ce qui est observé avec XRCC4 et la ligase IV, les souris déficientes pour XLF ne présentent pas de létalité embryonnaire. Cependant, elles présentent une forte radiosensibilité associée à une légère diminution du nombre de lymphocytes matures (Li et coll., 2008). De plus, une forte instabilité génétique a été décrite dans les cellules souches embryonnaires murines déficientes pour XLF (Zha et coll., 2007) ainsi que dans des fibroblastes déficients pour XLF (Ahnesorg et coll., 2006, Oksenyich et coll., 2012).

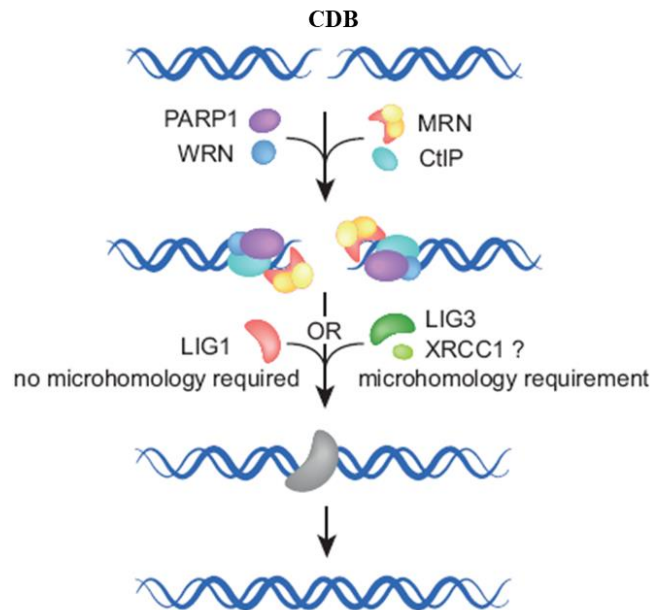
### **1.2.4.2.3 NHEJ alternatif**

Une voie alternative au mécanisme C-NHEJ a été découverte et dénommée NHEJ-alternatif (Alt-NHEJ). La mise en place de cette voie a été démontrée initialement dans les cellules déficientes pour un ou plusieurs facteurs clés de la voie C-NHEJ (Kabotyanski 1998, Wang et coll., 2003). Cependant, des études plus récentes ont révélé l'existence de la voie Alt-NHEJ dans les cellules dont la voie C-NHEJ est fonctionnelle (Deriano et Roth, 2013).

Bien que la voie Alt-NHEJ ne nécessite pas d'homologie de séquence, sa mise en place est facilitée par des micro-homologies situées de part et d'autre de la CDB. La recherche de ces micro-homologies au moment de la ligature conduit à la perte de nucléotides, ce qui est associé à la génération de plusieurs translocations chromosomiques (Simsek et Jasin, 2010 ; Zhu et coll., 2002). Contrairement au C-NHEJ qui est considéré comme un gardien de la stabilité génomique, Alt-NHEJ est considéré comme une source majeure d'instabilité génomique due à une réparation infidèle des CDB (Dueva et Iliakis, 2013).

La voie Alt-NHEJ n'est pas complètement élucidée, néanmoins plusieurs facteurs ont déjà été identifiés. On trouve notamment la protéine PARP-1 (Robert et coll., 2009) qui entre en compétition avec la protéine Ku pour la liaison aux extrémités des CDB (Wang et coll., 2006) (Figure 8). La maturation des extrémités semble avoir lieu grâce à l'intervention de la protéine

Mre11 en association avec CtIP et BRCA1 (Della-Maria et coll., 2011, Xie et coll., 2009). Concernant l'étape finale de ligature, plusieurs études ont démontré l'implication des LIG III et LIG I (Wang et coll., 2005, Simsek et coll., 2011, Della-Maria et coll., 2011, Liang et coll., 2008). Le déploiement de la LIG III dans Alt-NHEJ fait intervenir également les protéines XRCC1 et PARP1 (Liang et coll., 2008).



**Figure 8 : Représentation schématique des protéines participant à la voie Alt-NHEJ (adaptée de Dueva et Iliakis, 2013).**

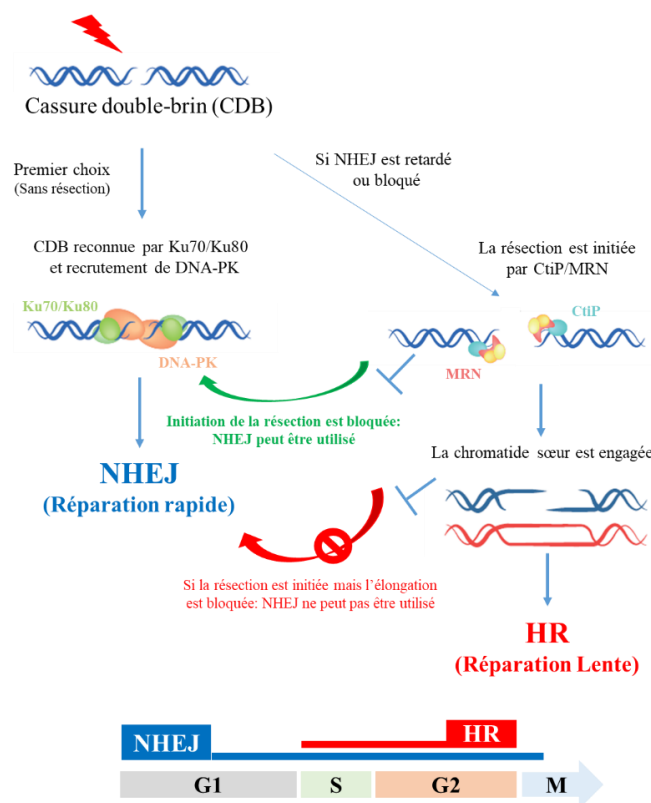
### 1.2.5 Choix du mécanisme de réparation des CDB

Plusieurs facteurs interviennent dans le choix de la voie de réparation des CDB. On trouve notamment, le stade du cycle cellulaire car NHEJ est active tout au long du cycle cellulaire, alors que HR n'est active qu'après la réplication pendant les phases S et G2, lorsqu'une chromatide sœur est présente en tant que matrice. Ainsi, les voies HR et NHEJ entrent en compétition lors des phases S et G2 (Shrivastav et coll., 2008, Arnoult et coll., 2017) (Figure 9). De plus, il a été montré que l'inhibition de certains facteurs de la voie NHEJ favorise la voie HR, indiquant que NHEJ et HR agissent séquentiellement (Delacôte et coll., 2002). La voie NHEJ a été proposée comme la voie de premier choix pour la réparation des CDB, grâce à la liaison rapide de l'hétéromère Ku70/Ku80 au niveau de la CDB, ce qui permet le recrutement de DNA-PKcs et

l'inhibition de la résection des extrémités de la CDB (Chang et coll., 2017 ; Kakaroungkas et coll., 2013). Si la progression de NHEJ est entravée, en raison de la complexité des CDB ou de la structure de la chromatine, la résection est initiée par CtIP / MRN et conduit à l'initiation de la réparation par HR (Shibata et coll., 2011).

La résection des extrémités de la CDB dépend également du cycle cellulaire par l'action des CDKs (Ira et coll., 2004). Les facteurs qui initient la résection des extrémités de la CDB sont plus actifs pendant les phases S et G2, favorisant la voie HR. C'est une autre raison pour laquelle la réparation par HR n'est possible que pendant les phases S et G2, alors que la réparation par NHEJ est dominante tout au long du cycle cellulaire (Symington et coll., 2011 ; Kakaroungkas et coll., 2013).

La structure de la chromatine au voisinage de la CDB peut également influencer le choix de la voie de réparation. En effet, la capacité des protéines de réparation à détecter et à se fixer au niveau des CDB est déterminée par les modifications des histones autour des CDB, ce qui implique le remodelage de la structure de la chromatine (Aymard et coll., 2014, Clouaire et coll., 2015, Lorat et coll., 2012).



**Figure 9: Choix de la voie de réparation des cassures double brin (CDB) (adapté de Kakaroungkas et coll., 2013).**

La jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) représente la voie de premier choix. Si NHEJ est retardé ou bloqué, la résection est initiée par CtIP/MRN, ce qui engage la recombinaison homologue (HR). Si l'initiation de la résection est bloquée, NHEJ peut toujours intervenir. Cependant, si la résection est initiée mais son élongation est bloquée, les deux voies NHEJ et HR ne pourront pas intervenir, ce qui conduit à un défaut de réparation de la CDB. La voie NHEJ fonctionne pendant toutes les phases du cycle cellulaire, contrairement à HR qui n'intervient que lors des phases S et G2.



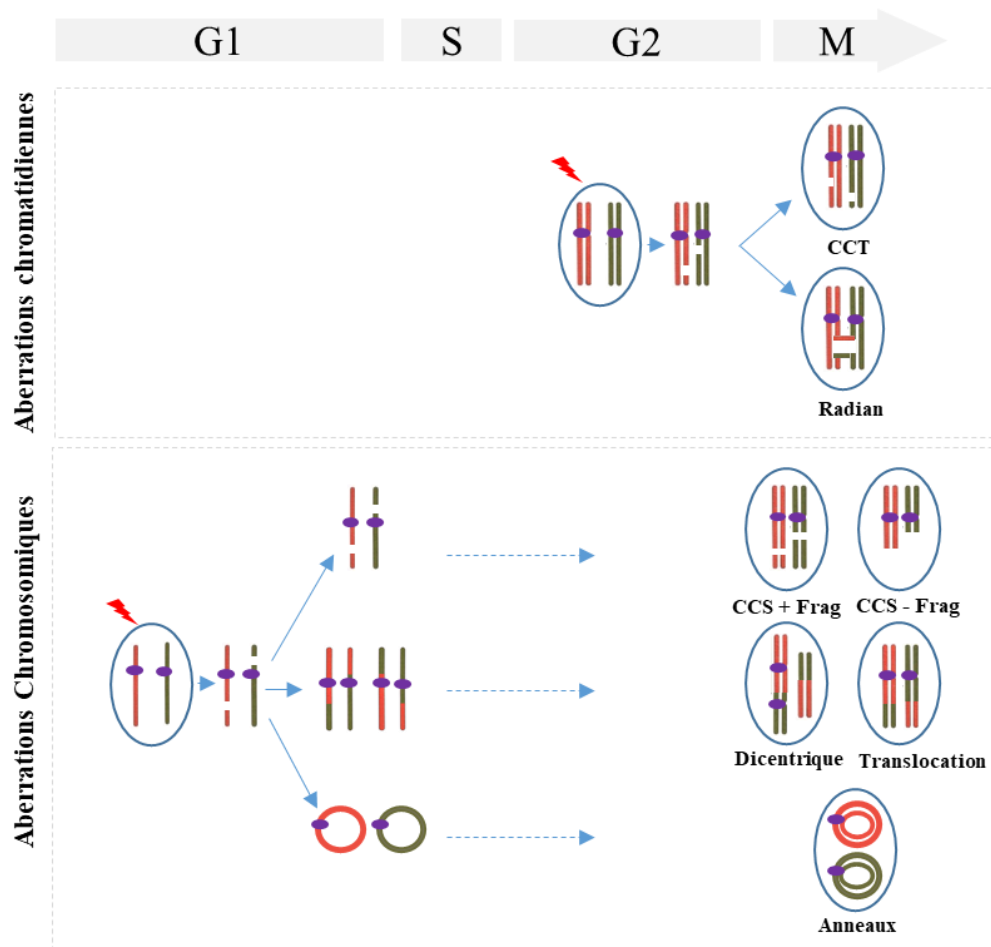
## **1.2.6 Conséquences des CDB mal réparées ou non réparées**

### **1.2.6.1 Instabilité chromosomique**

Les aberrations chromosomiques représentent la forme la plus commune de l'instabilité génétique. Elles sont générées suite à l'altération du nombre ou de la structure des chromosomes. Les anomalies du nombre appelées également aneuploïdies, correspondent au gain ou à la perte d'une ou plusieurs copies de chromosomes. Plusieurs agents mutagènes comme l'irradiation X peuvent induire une aneuploïdie en affectant la polymérisation des microtubules et la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Kirsch-Volders et coll., 1996 ; Durante et Formenti, 2018). Quant aux aberrations de structure, elles surviennent suite à un gain ou une perte de segments chromosomiques. Les mécanismes de formation des aberrations chromosomiques restent très controversés. Néanmoins, il est maintenant admis que les CDB sont les lésions les plus impliquées dans la génération des aberrations chromosomiques (Bryant et coll., 2007). Lors de la mitose, les CDB non réparées apparaissent sous forme d'une délétion terminale, conduisant à une perte de matériel génétique. Tandis que les CDB mal réparées peuvent générer des échanges intra ou inter-chromosomiques (Durante et coll., 2013).

La cytogénétique, à savoir l'étude des aberrations chromosomiques au stade de la métaphase permet de distinguer deux catégories d'aberrations : chromatidiennes et chromosomiques (Figure 10). La distinction entre ces deux catégories est importante, car pour certains agents tels que les radiations ionisantes, le type d'aberration détecté en métaphase reflète l'état de duplication des chromosomes au moment de l'irradiation (Savage, 1999). Les aberrations chromatidiennes qui impliquent une seule chromatide sont formées dans des régions d'ADN déjà dupliquées, suite à l'induction de dommages à l'ADN lors des phases S ou G2. On distingue notamment, les cassures chromatidiennes dues à la perte de fragment liée à l'absence de réparation et les figures radiales (Radianes), induites par une mauvaise réparation, conduisant à une recombinaison de chromatides entre deux ou plusieurs chromosomes. Les aberrations chromosomiques impliquent les deux chromatides d'un même chromosome, et sont généralement dérivées de cassures produites avant la réplication, pendant la phase G1 ou en début de phase S, dans des régions qui n'ont pas encore été répliquées. On distingue des cassures chromosomiques dues à une absence de réparation, se traduisant par une rupture au niveau des deux chromatides avec ou sans conservation du fragment associé. D'autre part, une mauvaise

réparation peut donner lieu à des recombinaisons entre chromosomes pour former des dicentriques, des anneaux, ou bien des réarrangements de fragments d'ADN donnant lieu à des translocations (Figure 10). Les dicentriques et les anneaux sont généralement considérés comme des aberrations instables, dans la mesure où leurs fréquences diminuent lors des divisions cellulaires successives. Cependant, les échanges réciproques de segments de chromosome tels que les translocations sont considérés comme des aberrations stables, transmissibles aux cellules filles lors des divisions cellulaires (Kaddour et coll., 2017 ; Pala et coll., 2000).



**Figure 10 : Illustration schématique de la formation des aberrations chromosomiques.**

Les aberrations chromatidiennes sont formées par les CDB induites après réplication et comprennent les cassures chromatidiennes (CCT) et les radian. Les aberrations chromosomiques sont générées par des CDB induites avant la réplication et comprennent ; les cassures chromosomiques avec ou sans fragment (CCS +/- Frag), les dicentriques, les anneaux et les translocations.

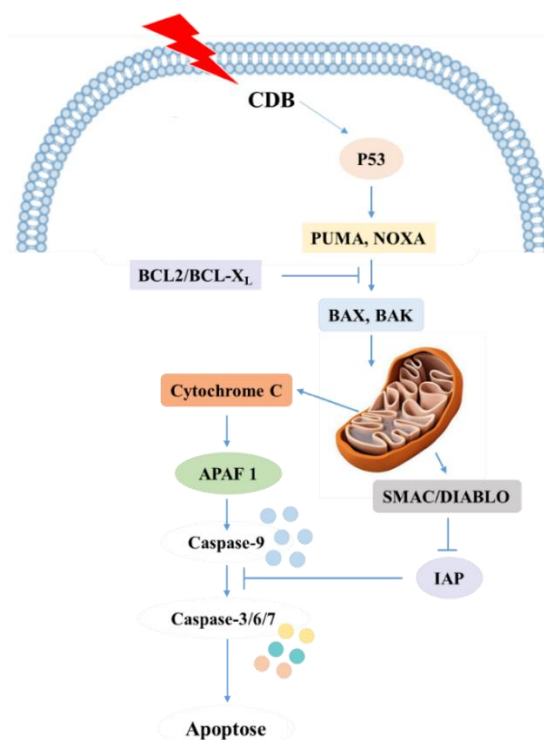
En dosimétrie radiobiologique, le dénombrement des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes circulants est utilisé pour estimer la dose absorbée par un organisme après une exposition aux radiations ionisantes (Mateuca et coll., 2006). Pour cela, la fréquence des dicentriques est déterminée puis comparée à des courbes « dose-effet » de références, préalablement établies *in vitro* pour différents débits de dose, doses et types de rayonnement. En revanche, l'étude des dicentriques est limitée aux expositions récentes, en raison des difficultés de leur transmission pendant les divisions cellulaires. L'étude des translocations est donc proposée pour estimer une exposition ancienne aux radiations ionisantes. En effet, les translocations sembleraient persister plus longtemps après l'exposition (Hartel et coll., 2018).

### **1.2.6.2 Apoptose (mort cellulaire programmée)**

La mort cellulaire par apoptose permet de prévenir l'accumulation des cellules avec un patrimoine génétique altéré. Son induction passe par deux voies principales : une voie extrinsèque, qui implique l'activation des récepteurs TNF (TNF : Tumor Necrosis Factor), et une deuxième voie dite intrinsèque ou mitochondriale, qui est médiée par des protéines appartenant à la super-famille de Bcl-2 (Nowsheen et coll., 2012).

L'induction des CDB conduit à l'activation de l'apoptose par voie intrinsèque (Figure 11). Les CDB provoquent l'activation d'ATM, qui à son tour phosphoryle et active P53. La quantité de P53 activée est déterminante pour le devenir de la cellule. Un faible niveau de CDB active une petite fraction de P53, conduisant à un arrêt du cycle par la régulation de P21 (Roos et Kaina, 2006). Cependant, avec des taux élevés de CDB, une grande quantité de P53 est activée, entraînant l'expression des gènes pro-apoptotiques PUMA (Nakano et Vousden, 2001) et NOXA (Oda et coll., 2000), qui vont à leur tour activer l'expression de BAX et BAK (Kim et coll., 2009), dont l'action est modulée par des protéines anti-apoptotiques, comme BCL2 et BCL-X<sub>L</sub> (Fletcher et coll., 2008 ; Soriano et coll., 2011). Une fois activées, BAK et BAX se fixent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, formant des pores qui permettent la libération des facteurs apoptotiques comme le cytochrome C et SMAC/DIABLO (Antonsson et coll., 2001). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome C se lie à la protéine APAF et forme l'apoptosome, qui se lie et active la protéase initiateur de l'apoptose, la caspase 9 (Jiang et coll., 2000). Cette dernière clive et active les caspases effectrices 3, 6 et 7 (Li et coll., 1997). SMAC/DIABLO promeut également l'apoptose en se fixant sur l'inhibiteur de l'apoptose (IAP),

évitant ainsi l'atténuation de l'activation des caspases (Ashkenazi et coll., 2002). Les caspases effectrices induisent des changements cyto-morphologiques caractéristiques, comprenant un rétrécissement cellulaire, la condensation de la chromatine, la formation de corps apoptotiques et enfin la phagocytose des corps apoptotiques par des cellules parenchymales ou des macrophages adjacents (Elmore et coll., 2007, Newsheen et coll., 2012).



**Figure 11: Voie de signalisation de l'apoptose induite par les cassures double-brin (CDB) (adapté de Ashkenazi et coll., 2002).**

Les CDB induisent l'apoptose par voie intrinsèque, composée par une cascade d'événements aboutissant à l'activation des caspases effectrices, 3, 6 et 7, qui sont responsables des changements cyto-morphologiques caractéristiques de l'apoptose.

Des défauts d'initiation de l'apoptose après l'induction de dommages de l'ADN sont associés au développement de plusieurs pathologies comme les maladies neurodégénératives, auto-immunes et les cancers (Elmore et coll., 2007 ; Rich et coll., 2000).

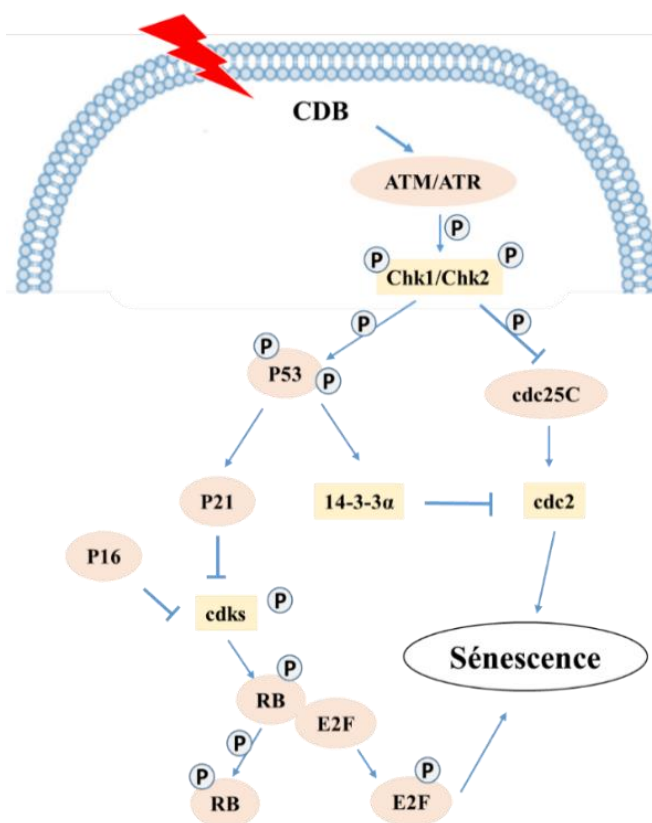
### 1.2.6.3 Sénescence

La sénescence est un état cellulaire caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire. On distingue la sénescence répllicative attribuée au raccourcissement des télomères après plusieurs divisions cellulaires (Sharpless et coll., 2015), de la sénescence prématurée induite par un stress

comme l'induction de dommages à l'ADN (Hernandez-Segura et coll., 2018). En effet, des dommages persistants au niveau de l'ADN peuvent induire une sénescence dans différents types cellulaires pendant des périodes relativement courtes (3 à 10 jours), avec ou sans raccourcissement des télomères (De Magalhães et coll., 2018 ; Muñoz-Espín et Serrano, 2014). Par exemple, l'irradiation peut déclencher le processus de sénescence, aussi bien dans les cellules normales que cancéreuses (Li et coll., 2018).

Le mécanisme d'induction de la sénescence est similaire à la voie de signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire lors de la transition G1/S (Figure 12). Les principaux effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence sont les inhibiteurs de CDK (p21 et p16) (Gewirtz et coll., 2008). Les cellules sénescents présentent des altérations structurales, telles qu'une morphologie élargie et aplatie, une modification de la membrane plasmique, l'accumulation de lysosomes et des altérations nucléaires (Hernandez-Segura et coll., 2018).

Le marqueur de sénescence le plus fréquemment utilisé est la détection par coloration histochimique de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase à pH 6, qui met en évidence l'accumulation des lysosomes dans le compartiment péri-nucléaire (Dimri et coll., 1995).

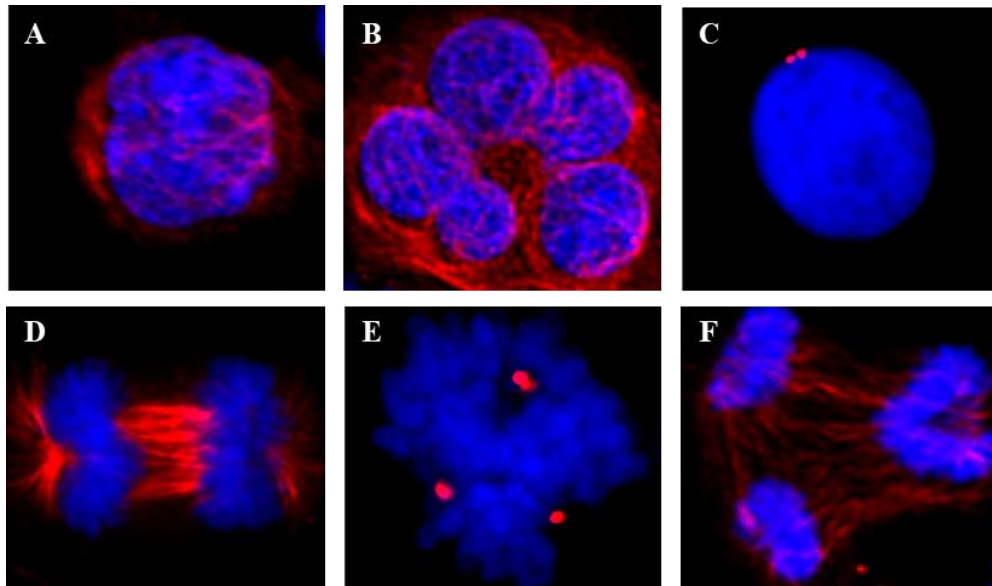


**Figure 12 : Voie de signalisation de la sénescence induite par les cassures double-brin (CDB) (adapté de Gewirtz et coll., 2008).**

Les dommages de l'ADN sont initialement détectés par ATM/ATR, ce qui active Chk1/Chk2 et stabilise la protéine P53. Cela conduit à l'activation de P21 qui agit comme inhibiteur des cdks et empêche la phosphorylation de RB et permet ainsi sa liaison avec E2F. P16 peut aussi moduler cette voie, indépendamment de P21. Cependant P16 n'est pas connue pour être impliquée dans la sénescence induite par les dommages de l'ADN. Un autre facteur important dans la voie de signalisation de la sénescence semble être cdc2, qui est inactivé par Chk1/Chk2 ou P53.

### 1.2.6.4 Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est un processus de mort cellulaire dû à une mitose aberrante, qui permet d'empêcher la prolifération de cellules mitotiques défectueuses (Roninson et coll., 2011). Elle est caractérisée par une altération de la ségrégation des chromosomes et conduit à des modifications nucléaires spécifiques comme les noyaux multiples et/ou des micronoyaux (MC Gee, 2015) (Figure 13). L'un des mécanismes d'induction de la catastrophe mitotique par les dommages à l'ADN est l'amplification des centrosomes, qui sont les centres d'organisation des microtubules lors de la formation du fuseau mitotique (Dodson et coll., 2007). Un autre mécanisme implique une défaillance de l'arrêt en G2/M, ce qui conduit au passage de la cellule endommagée en mitose (Ianzini et coll., 2006).



**Figure 13 : Caractéristiques morphologiques de la catastrophe mitotique (adapté MC Gee, 2015).**

(A) Cellule interphasique normale. (B) Cellule avec de multiples noyaux. (C) Cellule interphasique à deux centrosomes. (D) Ségrégation normale des chromosomes au cours de l'anaphase. (E) Cellule contenant > 2 centrosomes, conduisant à un fuseau mitotique multipolaire (F), à l'origine d'une aneuploïdie. ADN (bleu),  $\alpha$ -tubuline (rouge en A, B, D, F) et centrosome (rouge en C et E).

La détection et l'élimination des cellules mitotiques défectueuses sont indispensables pour la prévention de l'instabilité du génome. Une mitose aberrante peut conduire à la génération de cellules aneuploïdes ou tétraploïdes, qui sont une caractéristique des cellules tumorales (Gorden et coll., 2012).

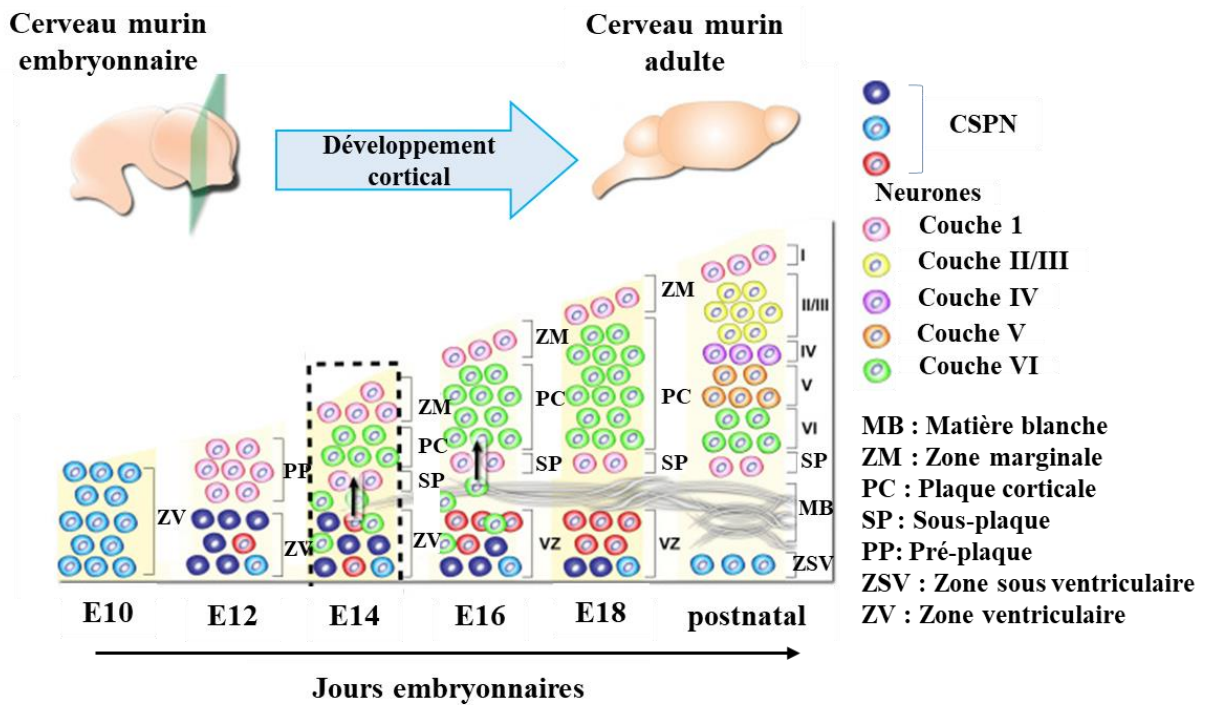
## **1.3 Neurogenèse**

### **1.3.1 Neurogenèse embryonnaire : développement du cortex cérébral**

#### **1.3.1.1 Structure du cortex cérébral**

Le cortex cérébral est le siège principal des fonctions neurocognitives du cerveau, où les informations provenant de toutes les modalités sensorielles sont traitées et intégrées pour donner lieu aux différents comportements sensori-moteurs. Le cortex est une structure complexe, qui contient différentes classes de neurones répartis dans six couches superposées (Agirman et coll., 2017, Rasband, 2016). Les neurones sont générés à partir de cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN), suivant un processus de différenciation appelé neurogenèse (Urbán et Guillemot, 2014 ; Doetsch et coll., 1999 ; Bédard et Parent 2004). Plus tard dans le développement embryonnaire, d'autres processus non neuronaux interviennent, notamment la gliogenèse permettant la génération d'astrocytes et d'oligodendrocytes (Semple et coll., 2013).

La structure du cortex varie considérablement entre les espèces de mammifères (Finlay et Darlington, 1995). Cela est directement lié au nombre de neurones, qui est déterminé au cours du développement par les divisions neurogéniques des CSPN (Borrell et Reillo, 2012). Dans le cerveau embryonnaire murin, les CSPN sont localisés essentiellement dans la zone ventriculaire (ZV) et la zone sous-ventriculaire (ZSV). Les premiers neurones produits forment la pré-plaque, qui est ensuite divisée en sous-plaque et zone marginale. La zone marginale formera la couche 1 du cortex et la sous-plaque donne lieu aux autres couches corticales. A partir du jour embryonnaire E11,5 jusqu'à E17,5 ; les CSPN produisent exclusivement des neurones qui forment les différentes couches corticales suivant une chronologie strictement contrôlée, de la couche 6, la plus profonde aux couches 2/3, les plus superficielles (Sakayori et coll., 2013) (Figure 14).



**Figure 14: Représentation du cortex cérébral murin pendant le développement embryonnaire et postnatal (adapté de Marcom et coll., 2016).**

### 1.3.1.2 Les cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN)

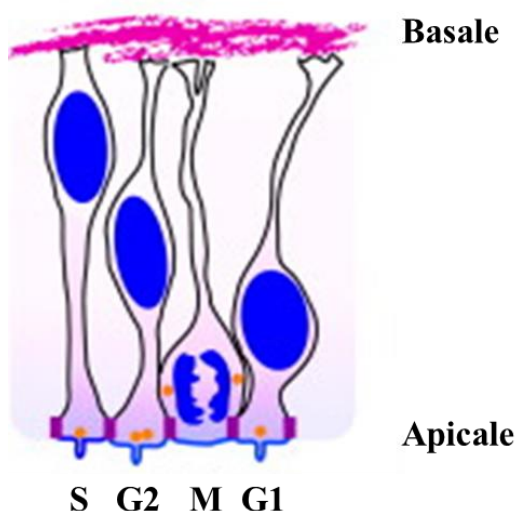
Pendant longtemps, les neurones et les cellules gliales ont été considérés comme les produits de précurseurs distincts qui divergeaient tôt durant le développement embryonnaire. Cependant, des études récentes ont caractérisé différentes catégories de CSPN, qui apparaissent à différents stades du développement et qui donnent lieu à toute la diversité de cellules neuronales et gliales (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). Les différentes catégories de CSPN se distinguent par leur potentiel de prolifération/différenciation, leur morphologie, la localisation de leur noyau et l'expression de marqueurs spécifiques (Arai et Taverna, 2017).

#### Transformation des cellules neuroépithéliales en cellules de la glie radiaire

Le premier évènement majeur dans le développement embryonnaire du cortex est la formation du tube neural qui dérive de l'ectoderme au moment de la gastrulation (Martynoga et coll., 2012). Il est composé d'une couche de cellules neuroépithéliales (CNE), qui s'étendent de

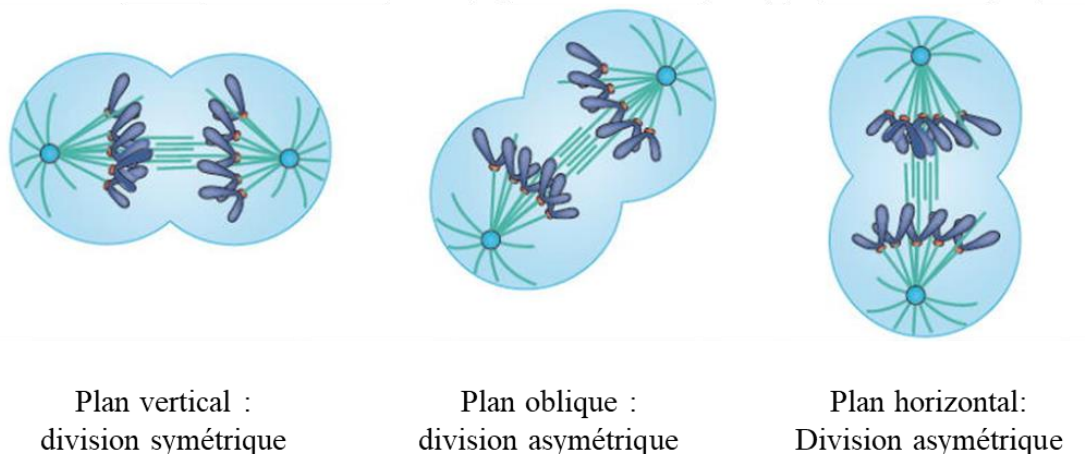


la lame basale au lumen ventriculaire du tube neural et présentent une polarité apico-basale (Götz et Huttner, 2005). Elles expriment des marqueurs de cellules souches tels que Nestin (neuroectodermal stem cell marker) et Sox2 (SRY (sex determining region Y) box 2), et sont caractérisées par la migration de leur noyau entre la surface basale et apicale, de façon synchronisée avec leur cycle cellulaire. Ce processus est appelé migration nucléaire intercinétique (MNI) : le noyau est situé à la surface apicale lors de la mitose, migre vers la surface basale pendant la phase G1, puis arrive en position basale en phase S et retourne vers la surface apicale pendant la phase G2 (Figure 15). Ainsi, les cellules se trouvant à différents stades du cycle cellulaire, donnent un aspect pseudostratifié à la ZV (Taverna et Huttner, 2010).



**Figure 15 : Migration Nucléaire Intercinétique (MNI) et polarité apico-basale des cellules neuroépithéliales (adapté de Taverna et Huttner, 2010).**

Initialement, les CNE prolifèrent par des divisions symétriques générant deux CNE identiques, permettant ainsi leur amplification (Rakic, 1988 ; Martynoga et coll., 2012). Avec le début de la neurogenèse entre le 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire chez la souris (Martynoga et coll., 2012), les CNE entament des divisions asymétriques permettant de générer les premiers neurones post-mitotiques (Figure 16). Parallèlement, les CNE commencent à acquérir des caractéristiques de cellules astrogliales, ce qui aboutit à la formation des cellules de la glie radiaire (CGR) (Noctor et coll., 2002 ; Kriegstein et Götz, 2013).



**Figure 16 : Divisions symétriques et asymétriques des CSPN (adapté de Sun et Hevner, 2014).**

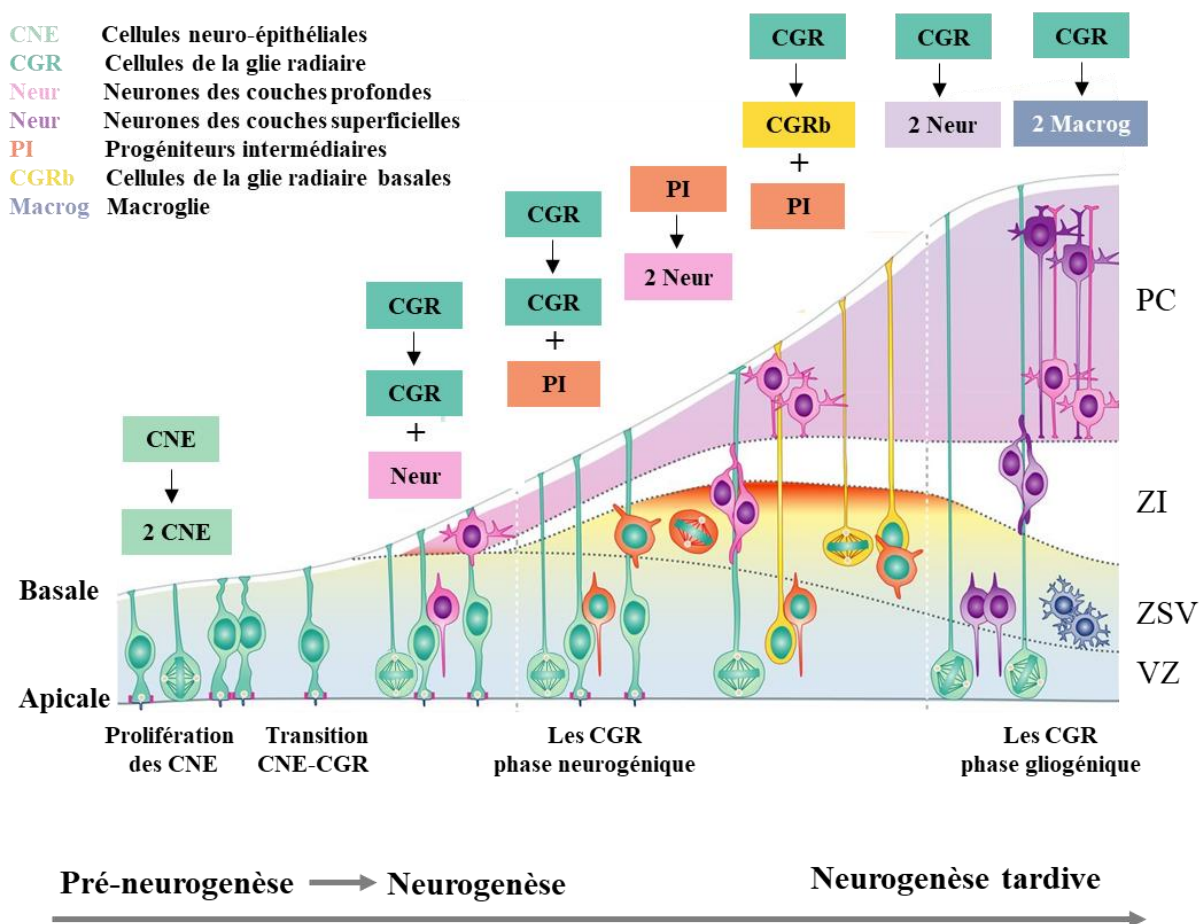
Selon l'orientation du fuseau mitotique et le plan de clivage, les divisions des CSPN sont symétriques (plan vertical) ou asymétriques (plan horizontal ou oblique). Après un clivage dans le plan vertical, les deux cellules filles demeurent dans la ZV et se divisent à nouveaux. Au contraire, un clivage dans le plan horizontal ou oblique amène la cellule qui se trouve dans le plan le plus éloigné de la ZV à ne plus se diviser et à commencer sa migration. L'autre cellule fille demeure dans la ZV pour continuer à se diviser. La répartition inégale des facteurs de transcription (comme notch-1 ou numb) dans la cellule participe à cette différenciation.

#### Les cellules de la glie radiaire (CGR) : élément clé de la neurogenèse embryonnaire

Les CGR apparaissent peu de temps avant le début de la neurogenèse. Elles ont une morphologie très proche de celle des CNE, avec un prolongement apical en contact avec la surface ventriculaire du cortex et un prolongement basal en contact avec la surface basale. Comme les CNE, les CGR conservent l'expression de nestine, présentent une forte polarité apico-basale et effectuent des divisions mitotiques au niveau de la surface apicale du ventricule, d'où le nom de CGR apicale (CGRa). Néanmoins, les CGRa diffèrent des CNE de par l'absence de jonctions serrées (Aaku-Saraste et coll., 1996) et l'expression de marqueurs tels que GLAST (glutamate-aspartate transporter), GLT-1 (glutamate transporter), BLBP (brain lipid-binding protein) et GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans certaines espèces (excepté chez les rongeurs) (Malatesta et coll., 2008).

Bien que les CGRa présentent un potentiel de différenciation plus restreint que celui des CNE, elles sont capables de générer la plupart des neurones et des cellules gliales du cerveau

(Gotz et coll., 2002 et 2005 ; Malatesta et coll., 2000 et 2008). Le produit immédiat de la division des CGRa n'est généralement pas une cellule différenciée. Souvent, les CGRa génèrent d'autres progéniteurs intermédiaires avec un potentiel neurogénique plus restreint (Haubensak et coll., 2004 ; Noctor et coll., 2004 ; Alvarez-Buylla et Kriegstein, 2013) (Figure 17).



**Figure 17 : Représentation schématique de la neurogenèse embryonnaire du cortex cérébral (adapté de Paridaen et Huttner, 2014).**

Localisation et évolution des principales CSPN, ainsi que leur différenciation neurogénique ou gliogénique.

Pendant longtemps, les CGRa ont été considérées comme l'unique population de CSPN dans la ZV. Cependant, des études plus récentes ont identifié d'autres progéniteurs, appelés progéniteurs intermédiaire apicaux (PIa) (Gal et coll., 2006). Comme les CGRa, les PIa maintiennent le contact avec la surface apicale du ventricule par des jonctions adhérentes et expriment le marqueur Pax6 caractéristique des progéniteurs neuraux. Cependant, les PIa diffèrent par la durée de leur cycle cellulaire et la nature de leur descendance. En effet, contrairement aux

CGRa, les PIa produisent directement des neurones post mitotiques au niveau de la ZV (Stancik et coll., 2010) (Tableau 2).

		Les différents types de CSPN				
		ZV			ZSV	
		CNE	CGRa	PIa	CRGb	PIb
Propriétés cellulaires	Localisation de la mitose	Apicale	Apicale	Apicale	Basale	
	Contact apical	Oui			Non	
	Contact basal	Oui	Oui	Non	Oui	Non
	Polarité à la mitose	Apico-basale	Apico-basale	Apicale	Basale	Non
	Mouvement du noyau	MNI	MNI	MNI	MST	Non
	Pax6/Tbr2	Pax6	Pax6	Pax6	Pax6	Pax6/Tbr2
	Marqueurs astrogliaux	Non	Oui	Oui	Oui	Non
	Prolifération	Oui	Oui	Non	Oui	Oui (<10%)

**Tableau 2 : Résumé des propriétés cellulaires des différents types de CSPN dans le cortex en développement (adapté de Florio et Huttner, 2014).**

Des progéniteurs intermédiaires ont été également identifiés dans la ZSV et appelés progéniteurs intermédiaires basaux (PIb). Ils sont formés par la division des CGRa à la surface apicale de la ZV, puis ils se détachent de la surface du ventricule et déplacent leurs noyaux dans la région basale. Contrairement aux CGRa, les PIb ne sont pas polarisés et ne disposent pas de jonctions adhérentes. De plus, les PIb n'expriment pas les marqueurs astrogliaux et Pax6, exprimés par les CGRa, mais, ils expriment des marqueurs spécifiques comme Tbr2 (T-box brain protein 2) (Englund et coll., 2005) (Tableau 2). Les PIb effectuent essentiellement des divisions asymétriques, produisant deux neurones. Néanmoins, environ 10% des PIb prolifèrent par divisions symétriques, conduisant à leur expansion dans la ZSV (Noctor 2004).

Récemment, des cellules de la glie radiaire ont été également identifiées dans la ZSV. Elles sont dénommées CGR basales (CGRb) (Hansen et coll., 2010). Les CGRb partagent beaucoup de

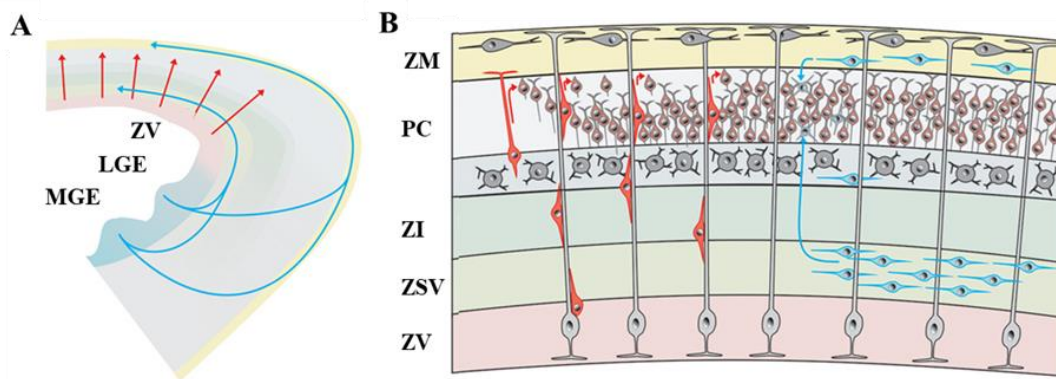
caractéristiques avec les CGRa, notamment l'expression de Pax6, les marqueurs astrogliaux et un long prolongement basal vers la surface du cortex (Florio et Huttner, 2014 ; Romero et Borrell, 2015). En revanche, contrairement aux CGRa, les CGRb ne disposent pas de prolongement apical vers la surface du ventricule et leur division est précédée par la translocation du noyau près de la plaque corticale au cours d'un processus appelé « Mitotic Somal Translocation » (MST) (Ostrem et coll., 2014) (Tableau 2). L'abondance des CGRb dans le cortex cérébral est très variable selon les espèces. En effet, les CGRb sont très peu abondantes chez la souris par rapport au macaque ou à l'homme. Cela indique l'importance des CGRb dans l'expansion et le degré de circonvolution du cortex cérébral (Romero et Borrell, 2015).

### **1.3.1.3 Migration neuronale**

Les neurones générés au niveau des zones neurogéniques migrent du site de leur dernière division mitotique vers la surface externe du cortex de façon radiale ou tangentielle (Figure 18).

La migration radiale concerne essentiellement les neurones glutamatergiques qui naissent aux niveaux de la ZV et de la ZSV et rejoignent la surface corticale, en empruntant les prolongements basaux de la glie radiaire. Les premiers neurones générés à partir du stade E10 forment une structure appelée la pré-plaque. Cette dernière se sépare en deux zones : une zone inférieure appelée sous-plaque et une zone supérieure appelée marginale. Les vagues successives de neurones viendront s'insérer entre ces deux zones afin de former la plaque corticale qui donnera naissance aux différentes couches corticales (Molyneaux et coll., 2007). Les neurones migrent selon un ordre chronologique : les premiers neurones peuplent les couches corticales profondes, tandis que les neurones qui apparaissent ultérieurement s'installent progressivement dans les couches superficielles (Rakic et coll., 2009).

La migration tangentielle concerne les interneurones GABAergiques qui naissent dans les éminences ganglionnaires latérales (LGE) et médianes (MGE), puis migrent sur une longue distance avant de rejoindre le cortex. Pour cela, les interneurones suivent la bordure externe du néocortex ou bien la surface basale de la ZSV. Une fois arrivés dans le cortex, les interneurones migrent d'une façon radiale afin de s'insérer dans les différentes couches corticales (Luhmann et coll., 2015).



**Figure 18 : Origines et voies de migration des neurones glutamatergiques et GABAergiques (adapté de Luhmann et coll., 2015).**

(A) Schéma illustrant la voie de migration radiale des neurones glutamatergiques depuis la ZV/ZSV vers les différentes couches corticales (flèches rouges) et la migration tangentielle des neurones GABAergiques depuis les éminences ganglionnaires latérale (LGE) et médianes (MGE) vers le cortex (flèches bleues). (B) Les neurones glutamatergiques (en rouge) migrent de façon radiale le long des cellules de la glie radiaire (en gris). Une fois dans la zone marginale (ZM), ils se détachent et s'alignent au-dessus des neurones de la plaque corticale (PC) précédemment insérés. La majorité des neurones GABAergiques (marqués en bleu) atteignent le cortex *via* une migration tangentielle à travers la ZSV ou la frontière externe de la ZM.

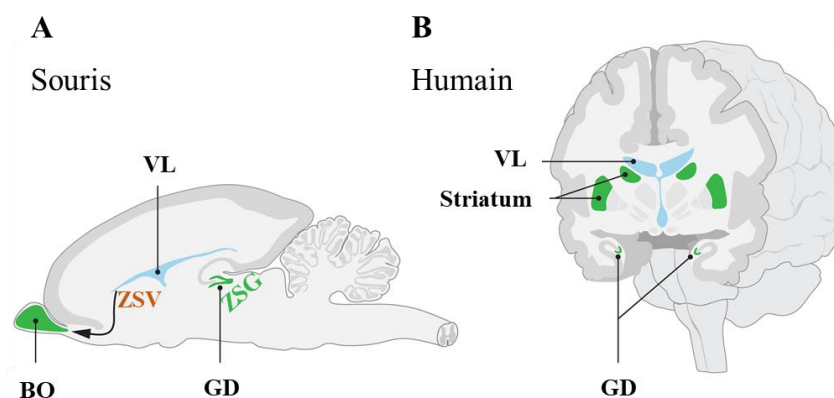
### 1.3.1.4 Apoptose neuronale

L'expansion du cortex cérébral est liée à plusieurs facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux. Notamment, la durée du cycle cellulaire, la phase d'amplification des progéniteurs et le rapport entre les divisions symétriques et asymétriques (Rakic, 1995). Outre ces paramètres de prolifération, la mort cellulaire programmée contribue également à spécifier la taille du cortex cérébral au cours du développement (Haydar et coll., 1999). Peu de temps après leurs dernières divisions, les neurones commencent à allonger leurs axones afin d'innover leurs cibles, c'est pendant cette phase qu'ils sont susceptibles de subir une mort cellulaire programmée (Dekkers et coll., 2013). En effet, il a été montré qu'environ 50% des neurones sont éliminés par apoptose lors de l'établissement des connexions avec d'autres cellules (Oppenheim et coll., 1991). Cette apoptose physiologique au cours du développement cérébral servirait à éliminer les neurones qui présentent des erreurs de formation ou de connexions synaptiques (Stiles et coll., 2010). La mort cellulaire programmée survient également plus tôt dans le développement, au sein de populations de cellules indifférenciées en prolifération dans la ZV et la ZSV (Blashke et coll., 1996, Thomaidou et coll., 1997).

L'importance de l'apoptose au cours du développement du cerveau est clairement démontrée chez les souris portant des mutations au niveau des facteurs pro-apoptotiques (Wong et Marin, 2019). Par exemple, les embryons de souris déficientes pour APAF-1, caspase 9 ou caspase 3 présentent un élargissement excessif des zones prolifératives du cortex cérébral (Cecconi et coll., 1998 ; Kuida et coll., 1998 ; Roth et coll., 2000).

### 1.3.2 Neurogenèse adulte

Pendant longtemps, il a été admis que le cerveau adulte était une structure fixe et incapable de se régénérer. Bien que la plupart des neurones du cerveau soient générés avant la naissance, il est maintenant bien établi que de nouveaux neurones sont produits en permanence dans le cerveau adulte (Ghosh, 2019). La neurogenèse reste active essentiellement dans deux régions principales du cerveau adulte, à savoir la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté (GD) et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui longe les ventricules latéraux (VL) (Mirzadeh et coll., 2008 ; Fuentealba et coll., 2012 ; Fiorelli et coll., 2015) (Figure 19). En effet, des cellules possédant des propriétés de CSPN ont été identifiées *in vitro* (Reynolds et Weiss, 1992) et *in vivo* (Doetsch et coll., 1999 ; Seri et coll., 2001) dans le cerveau adulte.



**Figure 19 : Principales zones de neurogenèse dans le cerveau adulte murin (A) et humain (B) (adapté de Ernst et Frisén, 2015).**

Les nouveaux neurones sont indiqués en vert. (A) Chez les rongeurs, les neuroblastes sont générés dans la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui tapisse le ventricule latéral (VL), puis migrent vers le bulbe olfactif (BO), une structure cruciale pour l'olfaction. (B) Chez les humains, des neuroblastes sont également présents dans la zone sous-ventriculaire, et les nouveaux neurones s'intègrent dans le striatum adjacent, qui joue un rôle essentiel dans la coordination des mouvements, l'apprentissage, la mémoire, et le contrôle de la motivation et des émotions. De nouveaux neurones sont également générés en permanence dans la zone sous-granulaire (ZSG) du Gyrus denté (GD) de l'hippocampe, une structure cérébrale essentielle pour la mémoire et le contrôle de l'humeur chez les rongeurs et les humains (A, B).

## 1.4 Réponse cellulaire aux CDB pendant le développement du cerveau

### 1.4.1 Conséquences neurologiques d'un défaut de réponse aux CDB

Le développement du système nerveux nécessite une réponse efficace aux dommages de l'ADN. La réparation de l'ADN est particulièrement critique au début du développement embryonnaire, lors de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs neuraux. Des mutations dans divers facteurs de la réponse aux CDB sont associées à plusieurs pathologies, dont la composante neurologique est l'un des aspects les plus délétères. Ces anomalies peuvent provenir d'un défaut de signalisation et/ou de réparation des CDB (Abugable et coll., 2019 ; McKinnon et coll., 2013) (Tableau 3).

	Pathologie	Protéine affectée	Structure affectée	Implications neurologiques	Implications non neurologiques
Défaut de signalisation des CDB	Ataxia Telangiectasia (A-T)	ATM	Cervelet	- Dégénération précoce des cellules de Purkinje et des neurones granuleux du cervelet, - Déficit oculomoteur.	- Immunodéficience, - Radiosensibilité, - Stérilité.
	ATLD (A-T like disease) (Maladie similaire à l'A-T)	MRE11	Cervelet	- Dégénération tardive des cellules de Purkinje et des neurones granuleux du cervelet, - Mouvement oculaire anormal.	- Radiosensibilité
	Syndrome de Nijmegen	NBS1	Cortex	- Microcéphalie, - Retard mental.	- Immunodéficience, - Radiosensibilité, - Stérilité.
	Syndrome de Seckel	ATR	Cortex	- Microcéphalie, - Retard mental.	- Retard de croissance
Défaut de réparation des CDB	Microcéphalie	XLF	Cortex	- Microcéphalie.	- Retard de croissance, - Lymphopénie, - Radiosensibilité.
	Syndrome LIG4	LIG4	Cortex	- Microcéphalie, - Retard mental.	- Immunodéficience, - Retard de croissance, - Radiosensibilité.

**Tableau 3 : Les principaux troubles neurologiques humains associés à des défauts de réponse aux dommages de l'ADN (adapté de Barzilai et coll., 2008).**



### 1.4.1.1 Conséquences neurologiques d'un défaut de signalisation des CDB

Les connaissances relatives à l'impact d'une signalisation défectueuse des CDB sur le développement du système nerveux proviennent essentiellement des études effectuées sur l'ataxie téléangiectasie (A-T) et les troubles associés. L'A-T est une maladie génétique causée par des mutations du gène ATM (Shiloh et Ziv, 2013). Elle est caractérisée par une neuro-dégénérescence progressive du cervelet due à une perte progressive de neurones (Chun et Gatti, 2004). Les patients A-T souffrent de problèmes de coordination et de locomotion (ataxie), d'une prédisposition marquée au cancer lymphoïde, d'une immunodéficience et d'une forte radiosensibilité.

Une maladie similaire à l'A-T (ATLD, A-T Like Disease) a été également décrite suite à des mutations du facteur Mre11. La similitude entre A-T et TRAT démontre que les atteintes neurologiques observées sont directement associées à une réponse défectueuse aux dommages de l'ADN. Cependant, des mutations dans le gène *Nbn* codant pour la protéine NBS1, un autre membre du complexe MRN, provoquent une maladie appelée syndrome de Nijmegen, dans laquelle la principale atteinte neurologique est la microcéphalie et non pas la dégénérescence cérébelleuse qui caractérise A-T et TRAT (Digweed et Sperling, 2004).

Les souris déficientes pour ATM sont viables, elles reproduisent assez bien le phénotype A-T observé chez l'homme, à l'exception des atteintes neurologiques (Elson et coll., 1996). Contrairement à ATM, la déficience de Mre11 et NBS1 conduit à une létalité embryonnaire (Buis et coll., 2008, Zhu et coll., 2001). Tandis que des mutations hypomorphes des gènes Mre11 et Nbn chez la souris ne reproduisent pas les atteintes neurologiques observées chez l'homme (Katyal et McKinnon, 2008).

Des mutations dans le gène ATR sont également à l'origine de plusieurs troubles du développement du cerveau, appelé syndrome de Seckel (O'Driscoll et Jeggo, 2008). Il est caractérisé par des retards de croissance, une microcéphalie et des retards mentaux. Chez la souris, la déficience d'ATR entraîne une létalité embryonnaire précoce (avant E7,5), due à une apoptose massive déclenchée par une perte de l'intégrité génomique (Brown et Baltimore et coll., 2000).

### **1.4.1.2 Conséquences neurologiques d'un défaut de réparation des CDB**

Les atteintes neurologiques causées par des défauts de réparation de l'ADN sont essentiellement associées à des mutations au niveau des facteurs de la voie NHEJ. Les patients avec des mutations hypomorphes de Ligase IV (O'Driscoll et coll., 2001 ; Altmann et coll., 2016), DNA-PKcs (Woodbine et coll., 2013) ou XLF (Buck et coll., 2006) présentent un retard de croissance, associé à une microcéphalie sévère et des difficultés cognitives (O'Driscoll et coll., 2001 ; Altmann et coll., 2016). En plus des données issues des syndromes humains, l'importance de la voie NHEJ dans le développement neural a été démontrée dans des modèles de souris transgéniques déficientes pour des facteurs impliqués dans la voie NHEJ. Par exemple, une déficience de XRCC4 ou de la Ligase IV entraîne une létalité embryonnaire due à une neurogenèse défectueuse se traduisant par une apoptose neuronale massive (Gao et coll., 1998). Les souris déficientes pour Ku70/Ku80 sont viables mais présentent une apoptose neuronale élevée, qui reste malgré tout moins sévère que celle associée à la déficience de XRCC4 et Ligase IV (Gu et coll., 1999). Cependant, les souris déficientes pour DNA-PKcs (Taccioli et coll., 1998 ; Gao et coll., 1998) ne présentent pas d'anomalies neurologiques, tandis que l'activité DNA-PKcs est primordiale pour le développement neural chez l'homme (Woodbine et coll., 2013).

Chez l'homme, la déficience d'XLF est à l'origine d'une forme de SCID (Severe Combined Immuno Deficiency) marquée par une lymphopénie B et T sévère. Les patients présentent un retard de croissance, une microcéphalie et une sensibilité cellulaire accrue aux rayonnements ionisants (Buck et coll., 2006). Les souris déficientes pour XLF manifestent une immunodéficiência légère (Li et coll., 2008). Cependant, les données actuelles ne montrent pas d'anomalies neurologiques très marquées.

### **1.4.2 Conséquences neurologiques d'une irradiation du cerveau en développement**

L'impact des radiations ionisantes sur le développement du cerveau varie considérablement en fonction de la dose et du stade de développement au moment de l'exposition. Le cerveau en développement est extrêmement radiosensible (Schull et Otake, 1999), particulièrement si l'exposition a eu lieu au cours des premières phases du développement,

à savoir entre les semaines 8 et 25 de la gestation chez l'homme, ce qui correspond aux jours embryonnaires E11 à E17 chez la souris (Verreet et coll., 2016). Cette période coïncide avec le pic de prolifération et de différenciation des progéniteurs neuraux au niveau des zones neurogéniques du cerveau embryonnaire.

Les premiers effets radio-induits se manifestent au niveau cellulaire et se traduisent par des dommages de l'ADN, des perturbations de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Plus tard dans le développement, d'autres effets se manifestent et impliquent la génération d'anomalies structurelles conduisant à des dysfonctionnements cognitifs (Verheyde et Benotmane, 2006).

### **1.4.2.1 Effets cellulaires immédiats d'une irradiation prénatale**

#### **1.4.2.1.1 Les CDB radio-induites et arrêts du cycle cellulaire**

La sensibilité du cerveau embryonnaire aux radiations ionisantes est liée à l'abondance des cellules souches et progéniteurs neuraux en prolifération (Fukuda et coll., 2005). En effet, il a été montré que les radiations sont plus néfastes sur les cellules ayant une activité mitotique importante. Par conséquent, les cellules souches en division sont généralement plus radiosensibles que les cellules différenciées (Bolus, 2017).

Les CDB sont une conséquence immédiate d'une irradiation cérébrale, elles sont induites d'une façon dose-dépendante et statistiquement significative à partir d'une dose de 10 mGy dans la zone intermédiaire du cortex d'un embryon de souris à E13,5 (Saha 2014) (Tableau 4). Les CDB sont générées de manière homogène dans tout le cortex irradié. En effet, 1 heure post irradiation, le nombre de foci  $\gamma$ -H2AX, signalant les CDB, est identique entre les zones neurogéniques (VZ et ZSV) contenant les CSPN et la plaque corticale contenant les neurones différenciés (Nowak et coll., 2006). Cependant, les CDB sont plus rapidement réparées dans les neurones post-mitotiques que dans les CSPN de la ZV et de la ZSV. Cette différence de cinétique de réparation des CDB est liée au mécanisme de réparation prépondérant dans chaque type cellulaire. En effet, la voie NHEJ qui est majoritaire dans les neurones différenciés (Iyama et Wilson, 2013) est plus rapide que la voie HR (Mao et coll., 2008). La vitesse de réparation des

CDB dépend également de la dose administrée. En effet, dans la zone intermédiaire du cortex, après une exposition à des faibles doses (jusqu'à 50 mGy), les CDB persistent plus longtemps que celles induites par une dose de 100 mGy. Cela est en corrélation avec la réduction de la capacité de réparation observée après exposition à de faibles doses de radiations (Rothkamm et Löbrich, 2003). Ces résultats présentent toutefois un intérêt particulier pour la compréhension des effets des faibles doses, devenue indispensable compte tenu de l'utilisation croissante des procédures diagnostiques à faible dose dans la pratique médicale.

Domage à l'ADN et réparation			
Stade	Temps post-irradiation	Dose	Effets
<b>E13,5</b>	1h	0,01-0,1 Gy	Domage à l'ADN d'une façon dose-dépendante
	6 h	0,1 Gy	Plus forte diminution des foci de domage à l'ADN par rapport aux faibles doses (0,01-0,05 Gy)
<b>E14,5</b>	1h	0,1- 0,5 Gy	Domage à l'ADN d'une façon dose-dépendante (2-3 foci/cellule) 0,1 Gy : arrêt partiel en G2/M, 4-6 CDB en G2. 0,5 Gy : arrêt total en G2/M
		2 Gy	Très large induction de dommages à l'ADN
	4 h	2 Gy	Reprise de la mitose
	6 h	0,5 Gy	Reprise de la mitose avec 67% de cellules en mitoses présentant des foci de CDB.
	24 h	2 Gy	Réparation totale des dommages à l'ADN, plus lentement chez les progéniteurs VZ / SVZ

**Tableau 4 : Dommages à l'ADN radio-induits et cinétique de réparation dans le cortex murin en développement (adapté de Verreet et coll., 2016).**

L'exposition aux radiations ionisantes entraîne également un arrêt du cycle cellulaire des CSPN afin de permettre la réparation des dommages de l'ADN. Cet arrêt est dépendant de la dose administrée. En effet, il a été montré qu'une irradiation à 0,5 Gy provoquait un ralentissement du cycle cellulaire, contrairement à la dose de 0,1Gy, ce qui justifie la persistance des CDB induites par les faibles doses d'irradiation (Gatz et coll., 2011). Contrairement au modèle classique de réponse aux CDB, les CSPN du cortex en développement activent essentiellement les points de contrôle intra-S et G2/M, mais de manière inattendue, n'initient pas

une activation détectable du point de contrôle G1/S, indiquant que ce dernier n'intervient pas dans le choix entre la réparation ou l'élimination des cellules endommagées (Roque et coll., 2012 ; Etienne et coll., 2012).

#### **1.4.2.1.2 Apoptose radio-induite**

L'irradiation du cerveau en développement provoque une apoptose étendue dans le cortex. Cependant, l'intensité de l'apoptose varie considérablement en fonction de la dose, de la zone et du stade du développement (Verreet et coll., 2016) (Tableau 5). Chez la souris, les CSPN de la ZV/ZSV sont extrêmement sensibles à l'apoptose radio-induite entre E13,5 et E16,5 (Hoshino et Kameyama, 1988 ; Hoshino et coll., 1991). À E14,5, de faibles doses d'irradiation (de l'ordre de 50 mGy) sont capables d'induire une apoptose détectable dans le cortex (Gatz et coll., 2011). En revanche, l'apoptose est rarement activée dans le cerveau adulte, même après une exposition à 10 Gy (Saha et coll., 2014).

La radiosensibilité des CSPN par rapport à celle des neurones post-mitotiques semble être liée également à une plus forte apoptose radio-induite (Nowak et coll., 2006). En effet, les CSPN de la ZV/ZSV montrent une activation rapide d'apoptose, 3 à 6h après l'irradiation. Tandis que les neurones de la plaque corticale montrent une augmentation significative d'apoptose seulement à 24h post-irradiation (Nowak et coll., 2006 ; Gatz et coll., 2011).

L'apoptose radio-induite semble être une conséquence des CDB non réparées (Frappart et McKinnon, 2008). Ainsi, la forte sensibilité des CSPN à l'apoptose radio-induite pourrait être liée à leur cinétique de réparation des CDB, plus lente que celle des neurones différenciés. L'initiation de l'apoptose radio-induite dans les neurones différenciés implique les protéines ATM et P53. En revanche, l'apoptose des progéniteurs neuraux nécessite la protéine P53, mais pas toujours ATM (Lee et coll., 2001). En effet, la déficience d'ATM n'empêche pas l'apoptose radio-induite dans les progéniteurs de la ZV (Lee et coll., 2001).

Apoptose			
Stade	Temps post-irradiation	Dose	Effets
<b>E11</b>	24 h	1 Gy	Apoptose principalement limitée à la PC
<b>E12,5</b>	4 h	14 Gy	Apoptose généralisée, dépendante d'ATM
<b>E12-E13</b>	6 h	1 Gy	Réduction de la viabilité cellulaire (50%), dépendante de la caspase 9
<b>E12-E13,5</b>	6 h	0,01-0,2 Gy	Large apoptose, principalement limitée à ZV/ZSV
		1,5-3 Gy	Apoptose généralisée, dose-dépendante
<b>E14,5</b>	4-8 h	1-2 Gy	Augmentation dose-dépendante de l'apoptose, et graduelle de la ZV (forte) à la ZI (faible)
	3-4 h	0,05-0,1 Gy	Apoptose modérée, spécialement dans ZV/ZSV
		2 Gy	Radiosensibilité des cellules en G2/M, dépendante de P21
	6 h	0,5 Gy	>1% d'apoptose, majoritairement en ZV/ZSV
	14 h	≥ 0,1 Gy	Apoptose réduite dans la ZV/ZSV Apoptose dans la ZI, due aux CDB persistantes
	24 h	2 Gy	Apoptose dans la ZV/ZSV Pic d'apoptose dans la ZI Augmentation d'apoptose dans la PC
<b>E15-E15,5</b>	3 h	0,5 Gy	60% d'apoptose en ZSV, 25% en ZI+PC
	4 h	14 Gy	Apoptose généralisée, dépendante d'ATM dans la ZSV
	24 h	0,5 Gy	Apoptose graduelle dans les couches superficielles, 70% en ZI+PC
<b>E17</b>	4 h + 24 h	0,1-0,2 Gy 0,4 Gy	Apoptose dans la ZV/ZSV + ZI, (4h = 24h) Apoptose dans ZV/ZSV + ZI + PC (4h = 24h)

**Tableau 5 : Apoptose radio-induite dans le cortex murin en développement (adapté de Verreet et coll., 2016).**

Une augmentation de l'apoptose au niveau du cerveau en développement a été également décrite après une exposition à une irradiation bêta issue de molécules tritiées. En effet, une injection intrapéritonéale d'eau tritiée dans des souris gestantes a induit une augmentation significative de l'apoptose dans le cerveau des embryons, 24h après l'injection (Wang et coll., 1999).

## **1.4.2.2 Effets à long terme d'une irradiation prénatale**

### **1.4.2.2.1 Conséquences sur la structure du cerveau**

Une exposition prénatale aux radiations ionisantes est associée au développement de plusieurs anomalies structurelles du cerveau, notamment une réduction significative de sa taille, en fonction de la dose et du stade de développement au moment de l'exposition (Schull et Otake, 1999 ; Yang et coll., 2017). Chez l'homme, des microcéphalies ont été rapportées chez des individus exposés lors de leur développement fœtal aux radiations issues des bombardements atomiques d'Hiroshima et Nagasaki (Otake et Schull, 1984 ; Yamazaki et Schull, 1990), ainsi que de l'accident nucléaire de Tchernobyl (Wertelecki, 2010). De plus, des études expérimentales chez le rongeur ont démontré qu'une irradiation prénatale induit des malformations cérébrales, dont la sévérité dépend de la dose, du type d'irradiation et du stade du développement. Une réduction significative du poids et de la taille du cerveau commence à se manifester avec une dose de 0,1 Gy à E11,5 (Devi et coll., 1994). Une irradiation bêta a été également associée avec le développement de malformations cérébrales. En effet, une contamination à l'eau tritiée de souris gestantes a conduit à une réduction de la taille du cerveau des portées, observée à l'âge de 2 mois pour une dose totale absorbée de 0,4 Gy (Sun et coll., 1997). Une contamination prolongée à l'eau tritiée sur 5 générations de rats a induit également le développement d'anomalies cérébrales, dont la sévérité est plus prononcée dans la 5<sup>ème</sup> génération que les précédentes (Zamenhof et van Marthens, 1981).

### **1.4.2.2.2 Conséquences sur les fonctions cognitives**

Les atteintes neurologiques induites par une irradiation prénatale peuvent entraîner des altérations psychomotrices après la naissance (Schull et Otake, 1999). En effet, des mesures de fonctions cognitives montrent l'apparition d'un retard mental sévère, une baisse du quotient intellectuel (QI) et des performances scolaires chez les enfants de femmes enceintes irradiées par les bombes d'Hiroshima et de Nagasaki (Dunn et coll., 1990).

Des altérations psychomotrices ont été également décrites chez le rongeur irradié durant le développement prénatal. Une irradiation- $\gamma$  d'embryons de rats à E15, avec des doses allant de 0,25 à 1,25 Gy a induit des changements comportementaux d'une façon dose-dépendante (Kimler

et Norton, 1988). De plus, à E12,5 une contamination à l'eau tritiée donnant une dose totale d'irradiation estimée à 0,071 ; 0,1 et 0,213 Gy a provoqué des altérations cognitives et motrices de façon dose-dépendante, notamment des défauts de coordination avec une baisse des performances d'apprentissage et de mémoire (Gao et coll., 2002).

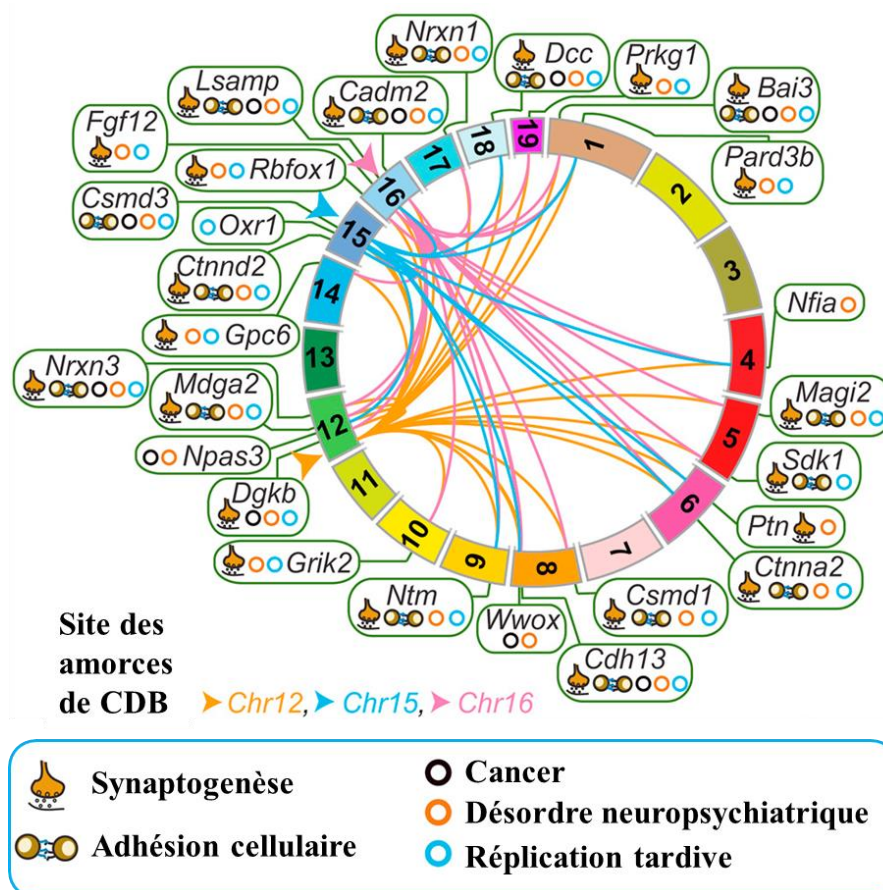
### **1.4.3 Les CDB : vecteur de diversité neuronale**

Dans certains types cellulaires comme les lymphocytes, l'induction de cassures de l'ADN et la variabilité des produits de réparation contribuent à la diversité des gènes codant pour les récepteurs d'antigènes (Jackson 1995). Récemment, plusieurs travaux de recherche ont étudié l'existence d'un tel mécanisme dans la génération de la diversité neuronale (Weissman et Gage, 2016). En effet, il a été montré que les neurones matures abritent de nombreuses altérations génomiques médiées par des clusters de CDB, proposées pour promouvoir la diversité neuronale (McConnell et coll., 2013 et 2017 ; Alt et Schwer, 2018). Ces altérations génomiques peuvent survenir lors de la division des progéniteurs neuronaux et se transmettent aux neurones post-mitotiques. La diversité des neurones ainsi générée joue un rôle important dans la physiologie neuronale tout comme dans l'étiologie des troubles neuropsychiatriques (McConnell et coll., 2017).

Les mécanismes par lesquels les altérations génomiques conduisent à la diversité neuronale restent mal connus (Alt et Schwer, 2018). Dans l'article de Pei-Chi WEI paru en 2016 dans la revue « Cell », les chercheurs du laboratoire de Frederick W. ALT ont étudié si l'absence de protéines de réparation des CDB dans les CSPN leur permettrait de localiser des séquences d'ADN sujettes à des CDB récurrentes. Pour cela, ils ont développé une technologie de séquençage haut débit, permettant la détection de translocations à l'échelle du génome (High Throughput, Genome-wide, Translocation Sequencing, HTGTS). En combinant les déficiences de la protéine XRCC4 (impliquée dans le mécanisme NHEJ) et de la protéine P53 pour éviter la mort cellulaire, ils permettent aux cassures d'ADN de persister, facilitant leur localisation et leur quantification. Ainsi, ils ont pu déterminer si les CDB étaient aléatoires ou survenues dans des gènes spécifiques. Cette étude a permis l'identification de 27 clusters récurrents de CDB, dont la grande majorité se trouve dans des gènes longs, transcrits et tardivement répliqués (Figure 20). Ces gènes sont impliqués essentiellement dans l'adhésion des cellules neuronales et les fonctions synaptiques. Des altérations génomiques au niveau des gènes abritant ces clusters récurrents de

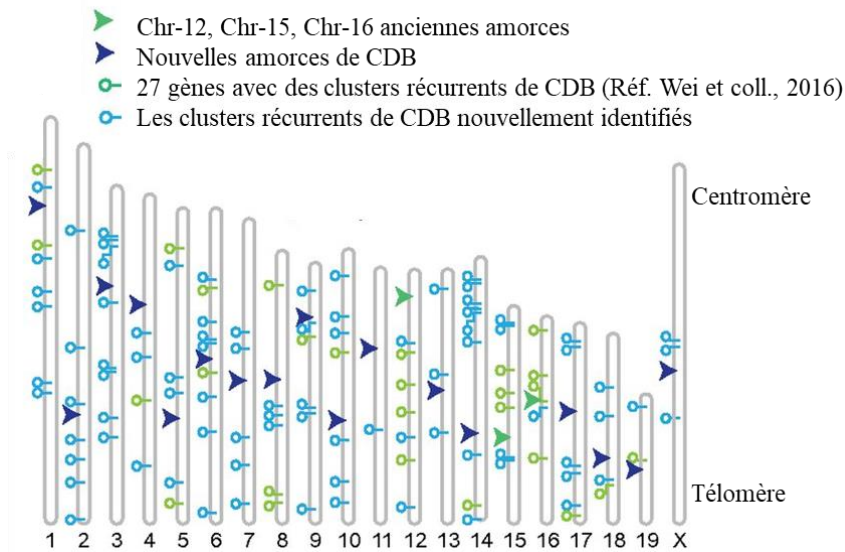


CDB sont associées à plusieurs désordres neuropsychiatriques et au développement de cancers du cerveau comme les glioblastomes (Wei et coll., 2016).



**Figure 20 : Identification de longs gènes abritant des clusters récurrents de CDB dans les CSPN (adapté de Wei et coll., 2016).**

Une étude plus récente, réalisée par la même équipe, a permis d'améliorer la résolution de la technique HTGTS. En introduisant des amorces de CDB dans les chromosomes des CSPN de souris par la technique de CRISPER/Cas9, le laboratoire de F. Alt a confirmé l'existence des 27 clusters de CDB précédemment décrit et a identifié 86 nouveaux clusters répartis sur le génome (Wei et coll., 2018) (Figure 21).



**Figure 21 : Identification des clusters de CDB après introduction d’amorces de CDB par la technique CRISPR/Cas9 (Wei et coll., 2018).**

Carte illustrant les 19 autosomes murins et le chromosome X (barres grises), l’emplacement des 20 amorces de CDB (flèches bleue). Les symboles horizontaux marquent les emplacements des clusters de CDB dans le génome des CSPN murins.

Plusieurs clusters de CDB ont été également identifiés sans induction de stress de réplication, ce qui indique que le stress de réplication ne fait qu’augmenter un processus endogène présent dans les NSPC (Wei et coll., 2018).

L’ensemble de ces résultats suggère le rôle des CDB, générés dans les CSPN et les neurones matures, dans la physiologie cérébrale, le vieillissement, le cancer, les troubles psychiatriques et neurodégénératifs (Wei et coll., 2016 et 2018).

## **2. OBJECTIFS**

Le développement du cerveau est un processus complexe, qui implique la prolifération et la différenciation de différents types de cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN) (Gotz et coll., 2016 ; Beattie et Hippenmeyer, 2017). Cela nécessite un maintien strict de leur stabilité génétique, car l'accumulation de lésions d'ADN dans les CSPN conduit au développement de plusieurs pathologies neurodéveloppementales, déjà décrites chez les patients présentant des déficits des systèmes de réparation de l'ADN (Abugable et coll., 2019 ; Mackinnon et coll., 2017) ainsi que chez les individus exposés à un stress génotoxique comme les radiations ionisantes (Otake et Schull, 1998). En revanche, des études récentes ont identifié plusieurs altérations qui surviennent dans les CSPN au cours du développement et qui contribueraient à la génération de la diversité neuronale du cerveau (Wei et coll., 2015 et 2018 ; Alt et Schwer, 2018). Ainsi, une meilleure caractérisation de la maintenance de l'intégrité génétique dans les CSPN contribuera à une meilleure compréhension de la physiopathologie du cerveau.

L'objectif principal de mon projet thèse était d'étudier la maintenance de la stabilité chromosomique des CSPN, au cours du développement et après une exposition à un stress radiatif aigu ou chronique. Les cassures doubles-brin (CDB) sont les dommages à l'ADN les plus délétères, qui sont réparés par deux voies principales, la recombinaison homologue (HR) ou la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ). Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de la voie NHEJ dans le maintien de l'intégrité génétique des CSPN, au cours du développement et en réponse aux stress radiatifs.

- **Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF**

Dans un premier temps, j'ai participé à un projet visant à étudier les conséquences d'une déficience de la protéine XLF, composante de la voie NHEJ, sur le développement embryonnaire du cerveau murin et ses répercussions neurocognitives chez la souris adulte (Article 1 en cours de re-soumission). Notre but était de caractériser l'instabilité chromosomique des CSPN du cerveau embryonnaire. Pour cela, nous avons développé un protocole permettant d'obtenir des chromosomes métaphasiques de CSPN *ex-vivo*, directement isolés du cortex embryonnaire murin, sans étape préalable de culture des cellules.

- **Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF *in vitro*, en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique**

Les grandes capacités d'autorenouvellement et/ou de pluripotence des cellules souches suggèrent qu'elles peuvent réagir différemment aux dommages à l'ADN par rapport à leur progéniture différenciée ou à d'autres cellules somatiques non-souches. En effet, plusieurs études ont démontré que les cellules souches embryonnaires et adultes sont dotées d'une réponse robuste aux dommages de l'ADN, leur permettant de mieux les réparer et d'éviter leur transmission aux cellules filles (Zou et coll., 2012 ; Lan et coll., 2012 ; Wyles et coll., 2014, Vitale et coll., 2017, Mandal et coll., 2011). La plupart de ces études sont basées sur l'utilisation de méthodes comme la quantification des foyers de réparation des dommages à l'ADN, ne permettant donc pas de caractériser l'instabilité génétique générée. De plus, les effets rapportés concernent essentiellement l'exposition à un stress génotoxique aigu et ne dressent pas les conséquences d'une exposition à un stress chronique, ce qui est nécessaire dans le contexte du développement du cerveau.

Nous avons utilisé une approche de cytogénétique moléculaire afin de comparer la maintenance de la stabilité chromosomique après un stress génotoxique aigu (radiation  $\gamma$ ) ou chronique (incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN révélée par autoradiographie cellulaire). Afin de détecter une éventuelle spécificité de réponse dans les CSPN, nous avons comparé l'instabilité chromosomique des CSPN et celle des fibroblastes embryonnaires murins (MEF), un type cellulaire non-souche et proliférant. Des CSPN et MEF isolés d'embryons de souris déficientes pour XLF ont été également caractérisés afin de comparer le rôle d'XLF dans le maintien de la stabilité chromosomique des CSPN et des MEF.

- **Optimisation de l'autoradiographie et application aux matériaux tritiés**

Parallèlement à ce travail, nous avons cherché à optimiser la sensibilité et la résolution de l'autoradiographie à l'aide de nouvelles émulsions plus radiosensibles, qui devaient faciliter l'étude de très faibles concentrations de thymidine tritiée. D'autre part, le tritium est l'un des combustibles de la réaction de fusion qui sera utilisé dans le réacteur du tokamak ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor) en cours de construction dans le sud de la France, ce qui soulève la question de son piégeage dans les parois du réacteur. Nous avons donc

travaillé sur la mise au point d'un protocole d'autoradiographie, permettant de préciser la localisation du tritium dans des matériaux modèles, notamment des plaques de tungstène qui sont choisie pour recouvrir les parois de la chambre à vide d'ITER.

### **3. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **3.1 Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF**

#### **Article 1**

#### **Impaired brain development and behavior of Xlf null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis**

Amandine Bery, Olivier Etienne, Elodie A. Pérès, **Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Antony Laugeray, Chantal Desmaze, Laurent R Gauthier, Marion Martin, Fawzi Boumezbeur, Vincent Abramovski, Stéphane Mortaud, Jean-Pierre de Villartay, Denis Le Bihan, Arnaud Menuet, François D. Boussin

**En cours de re-soumission**



### 3.1.1 Mise au point d'un protocole d'obtention de métaphase de CSPN *ex vivo*

Afin d'évaluer les conséquences de la déficience d'XLF sur la stabilité génétique des progéniteurs neuraux dans le cerveau embryonnaire au plus proche des conditions physiologiques, nous avons développé un protocole permettant l'obtention *ex vivo* des chromosomes métaphasiques des CSPN, directement après dissociation du cortex embryonnaire, sans étape de culture préalable. Cette méthodologie permet l'analyse de l'instabilité chromosomique au plus près des conditions *in vivo*, en évitant les dommages à l'ADN qui peuvent être générés par la culture cellulaire, qui pourrait également favoriser l'entrée en mitose de cellules dont la progression du cycle cellulaire aurait été bloquée *in vivo*.

L'analyse cytogénétique permet de détecter l'instabilité chromosomique et les remaniements chromosomiques à l'origine des troubles génétiques et/ou des cancers (Kalakan et coll., 2017 ; Harrison et Secker-Walker, 1998). Parmi les techniques de cytogénétique les plus classiques, la simple coloration au Giemsa permet de compter et de classer les chromosomes en fonction de leur taille et de leur indice centromérique. Tandis que des méthodes de marquage dite « banding » révèlent une alternance de bandes transversales faiblement ou fortement colorées en fonction de la condensation de la chromatine, spécifique de chaque paire chromosomique. Par la suite, le développement de méthodes de cytogénétique moléculaire telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et l'hybridation génomique comparative (CGH) a conduit à une meilleure résolution, permettant la détection de remaniements chromosomiques plus fins (Bridge, 2008). La qualité des étalements de chromosomes est absolument essentielle : les chromosomes doivent être bien étalés, et exempts de membranes cytoplasmiques.

L'obtention directe des chromosomes métaphasiques, sans étape de culture *in vitro*, a été déjà décrite, notamment à partir de prélèvements de villosités choriales ou de tissu tumoral (Simoni et coll., 1983 ; Xiao et coll., 1989 ; Morais et coll., 2015). Cependant, cette procédure présente des inconvénients techniques, comme le faible nombre de métaphases obtenus, ce qui limite son utilisation aux tissus avec un index mitotique élevé. De plus, la morphologie des

chromosomes obtenus est souvent très altérée et ne permet pas une analyse fiable (Morais et coll., 2015).

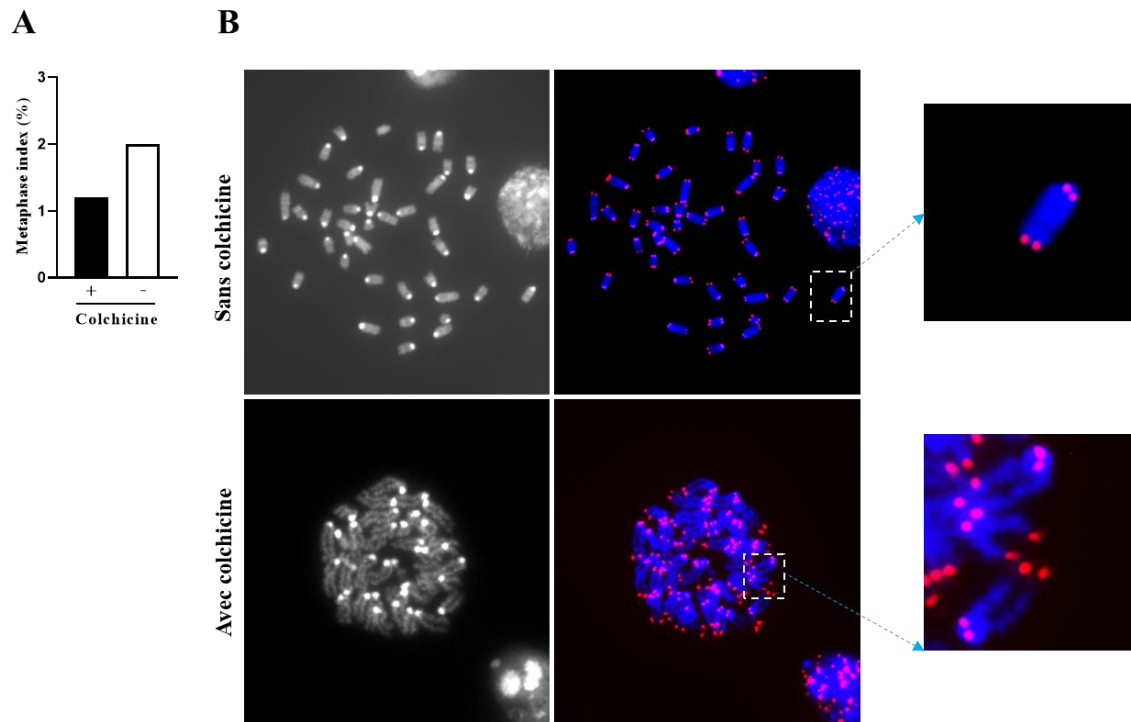
Le protocole standard d'obtention de chromosomes métaphasiques implique le blocage des cellules au stade de la métaphase, en utilisant un dérivé de colchique (colchicine ou colcémide) qui empêche la polymérisation de la tubuline et donc la formation du fuseau mitotique. Les cellules sont ensuite traitées avec une solution hypotonique, ce qui entraîne leur gonflement par différence de pression osmotique et la fragilisation des membranes cytoplasmiques et nucléaires. Les cellules sont conservées dans un fixateur chimique, par exemple un mélange d'éthanol et d'acide acétique. Les premières gouttes du mélange éthanol/acide acétique doivent être ajoutées tout en agitant la suspension cellulaire. La dernière étape consiste à étaler la suspension de cellules sur une lame de verre. Cette étape est essentielle pour obtenir un éclatement des cellules et un étalement approprié des chromosomes. En effet, la lame doit être humide, froide et inclinée pour assurer une meilleure dispersion des chromosomes. Une température de 25°C et une humidité d'environ 50 % sont également importantes pour assurer un séchage adéquat des lames.

Afin de mettre au point un protocole d'obtention directe des chromosomes métaphasiques à partir du cortex embryonnaire, nous avons optimisé chacune des étapes du protocole standard (Tableau 6). Nous avons comparé : l'utilisation de différents poisons du fuseau mitotique (Colchicine ou colcémide), différentes conditions de dissociation des cellules, différentes solutions hypotoniques et différents fixateurs.

Etape	Ajustement	Résultat	
		Nombre de métaphases	Qualité de l'étalement
Poison du fuseau mitotique	Colchicine (20 µg), injection intrapéritonéale, 2h avant sacrifice	++	+
	Colcémide (20 µg), injection intrapéritonéale, 2h avant sacrifice	+	-
	Incubation des cellules avec colchicine après dissociation (1h)	++	+
	Sans traitement	+++	+++
Milieu de dissociation	PBS	+++	+
	PBS+Glucose (0.6%)	+++	+++
Type de dissociation	Enzymatique (Collagénase-DNase)	+	+
	Mécanique P1000	+++	+++
Solution hypotonique	KCL (0,075M) 20 min à 37°C	+	+
	Citrate de sodium 0,6 % 10 min à 37°C	+	+
	KCL à 0,075M (1V) / SVF dilué au 1/6 (1V) 20 min à 37°C	+++	+++
Fixation	Méthanol (3V) – Acide acétique glacial (1V)	-	-
	Ethanol (3V) - Acide acétique (1V)	+++	+++

**Tableau 6 : Récapitulatif des tests réalisés et des résultats de l'optimisation du protocole d'obtention des chromosomes métaphasiques *ex-vivo* des CSPN isolés à partir du cortex cérébral d'embryons de souris à E14,5.**

Bien que l'utilisation d'un poison du fuseau mitotique soit très répandue en cytogénétique, nos résultats montrent que l'utilisation de colchicine ou de colcémide (injection péritonéale chez la souris gestante ou traitement des CSPN isolés) a conduit à une réduction significative du nombre de métaphases (Figure 22A) et une agglutination des chromosomes (Figure 22B).



**Figure 22 : Comparaison des étalements de chromosomes métaphasiques *ex vivo*, avec ou sans utilisation de colchicine.**

En ce qui concerne le choc hypotonique, l'utilisation de la solution de chlorure de potassium (KCL) à 0,075M mélangée avec du sérum de veau fœtal (SVF) dilué au 1/6 a permis d'améliorer la qualité des étalements par rapport à l'utilisation d'une solution de chlorure de potassium à 0,075M pur ou de citrate de sodium à 0,6%.

Ainsi, nous avons identifié les conditions les plus optimales permettant l'obtention de chromosomes métaphasiques *ex vivo* : une dissociation mécanique du cortex des embryons sans injection préalable de colchicine chez la mère gestante, une incubation pendant 20 min dans une solution de KCL à 0,075M mélangée avec du SVF dilué au 1/6, une fixation des cellules dans un mélange d'éthanol-acide acétique (3V-1V) et enfin un étalement des cellules sur des lames de verre.

Ces conditions permettent l'obtention d'un nombre suffisant de métaphases d'une qualité satisfaisante pour permettre une meilleure détection des cassures chromatidiennes et chromosomiques, et ainsi une analyse plus fiable de l'instabilité chromosomique des CSPN *ex vivo*, directement isolés du cortex cérébral d'embryons murins.

### **3.1.2 Résultats : Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF**

Au cours du développement embryonnaire du cerveau, les cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN) prolifèrent, migrent et se différencient suivant un processus hautement régulé. L'importante phase d'amplification des CSPN au début du développement nécessite un maintien strict de leur stabilité génétique. En effet, divers troubles neurocomportementaux sont observés chez des individus présentant des syndromes héréditaires, caractérisés par une réponse défectueuse aux dommages à l'ADN (Abugable et coll., 2019, Barzilai et coll., 2008 ; McKinnon et coll., 2013 et 2017).

La jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) est considérée comme la voie majeure de réparation des CDB, en raison de sa capacité à intervenir pendant toutes les phases du cycle cellulaire (Change et coll., 2017). L'importance de la voie NHEJ dans le développement du cerveau a été clairement démontrée chez les souris déficientes pour certains facteurs de ce mécanisme, tels que la ligase IV et XRCC4, dont les déficiences complètes conduisent à une létalité embryonnaire à cause d'une apoptose neuronale massive (Gao et coll., 1998 ; Barnes et coll., 1998). De plus, les déficiences de Ku70 et Ku80, autres facteurs de la voie NHEJ, conduisent également à un défaut de neurogenèse, mais qui semble moins grave que celui induit par la déficience de XRCC4 ou Ligase IV (Ferguson et coll., 2001). XRCC4-like factor (XLF) (aussi appelée Cernunnos) est un composant du complexe de ligature lors de la NHEJ (Ahnesorg et coll., 2006 ; Buck et coll., 2006). Les patients porteurs d'une mutation du gène XLF présentent une immunodéficiences (lymphopénie des cellules T et B), une microcéphalie et une sensibilité aux radiations ionisantes (Dai et coll., 2003 ; Yazsani et coll., 2017).

Contrairement aux souris déficientes pour XRCC4 et ligase IV, les souris déficientes pour XLF sont viables et présentent une légère immunodéficiences (Li et coll., 2008). En revanche, aucune altération évidente du cerveau en développement n'a été signalée à ce jour (Li et coll., 2008 ; Balmus et coll., 2016). Dans ce projet, nous nous sommes donc intéressés plus précisément à l'étude des conséquences de la déficience d'XLF sur le développement du cerveau murin et les fonctions cérébrales de la souris adulte.

- **Faible induction d'apoptose dans les progéniteurs neuraux *Xlf*<sup>-/-</sup> du cerveau embryonnaire**

Dans un premier temps, nous avons montré une augmentation, légère mais significative, de l'apoptose dans les différentes régions du cerveau embryonnaire et post-natal des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. Cette apoptose a été observée au début de la corticogénèse (E11/E12) dans les zones prolifératives (ZV et ZSV) et affectant donc les progéniteurs neuraux, puis à E13 dans la ZI et la PC, contenant les neurones post-mitotiques. Un marquage EdU/BrdU a confirmé que plus de 60% des cellules apoptotiques à E11,5 correspondent aux progéniteurs neuraux cyclants, qui sont entrés en apoptose durant les phases S/G2/M. Il est important de noter que l'apoptose associée à la déficience d'XLF est très marginale par rapport à l'apoptose massive rapportée suite à la déficience de la ligase IV et XRCC4, qui concerne essentiellement les neurones post-mitotiques (Gao et coll., 1998, Orii et coll., 2006).

En revanche, une irradiation *in utero* des embryons au stade E14,5 à la faible dose de 10 mGy (supposée induire 0,2 à 0,3 CDB par cellules) est capable d'induire une plus forte augmentation d'apoptose dans le cortex des embryons *Xlf*<sup>-/-</sup> par rapport aux embryons *wt* irradiés, ce qui montre leur radiosensibilité.

- **Augmentation de l'instabilité chromosomique dans les progéniteurs neuraux *Xlf*<sup>-/-</sup>**

D'une façon intéressante, l'instabilité chromosomique détectée par Telo-FISH dans les métaphases *wt* est plus élevée pendant les premiers stades du développement (18% des métaphases présentent des aberrations chromosomiques à E12,5 vs 6% à E14,5). En accord avec le rôle d'Xlf dans la réparation des CDB par NHEJ, l'instabilité chromosomique est significativement augmentée dans les métaphases *Xlf*<sup>-/-</sup> par rapport aux métaphases *wt* contrôles, et ce à partir de E13,5 (35% des métaphases présentent des aberrations chromosomiques pour *Xlf*<sup>-/-</sup> vs 18% pour *wt*). Les aberrations chromosomiques détectées dans les métaphases *wt* et *Xlf*<sup>-/-</sup> sont essentiellement des cassures chromatidiennes qui sont générées par les CDB survenues après répllication en S ou G2. Ces résultats sont en accord avec la récente identification de clusters récurrents de CDB au niveau des CSPN (Wei et coll., 2016 et 2018).

- **Neurogenèse prématurée dans les souris *Xlf*<sup>-/-</sup>**

Nous avons constaté une réduction de l'épaisseur du cortex et de la longueur des ventricules cérébraux des embryons *Xlf*<sup>-/-</sup>. La faible induction d'apoptose précédemment détectée dans les embryons *Xlf*<sup>-/-</sup> ne pouvant pas expliquer à elle seule ces altérations structurelles du cerveau, nous avons cherché à caractériser les conséquences de la déficience d'XLF sur l'expansion et la différenciation des CSPN. Ainsi :

- L'immunomarquage des figures mitotiques par la détection de la phosphorylation de l'histone H3 a révélé une diminution du nombre de cellules de la glie radiaire (CGR) apicales en mitose dans le cerveau des embryons *Xlf*<sup>-/-</sup> par rapport aux embryons *wt*.
- L'analyse de l'orientation du plan de clivage des CGR mitotiques a ensuite montré un revirement précoce du mode de division symétrique, prolifératif (plan verticale) vers un mode de division asymétrique, neurogénique (plan horizontale).
- L'immunomarquage à l'aide de marqueurs spécifiques (Pax6, Tbr1 et Tbr2) des différents types cellulaires présents dans le cerveau embryonnaire à différents stades de développement a montré une diminution du nombre des CGR (aux stades E13,5 et E14,5) conduisant à une réduction du nombre de neurones matures au stade plus tardif du développement (E15,5).
- Enfin, à E13,5 l'électroporation du vecteur d'expression de la GFP dans les CSPN en VZ-SVZ a permis de suivre leur destin dans le cerveau en développement et a confirmé l'orientation précoce des CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> vers la division neurogène.

L'ensemble de ces résultats montre que l'instabilité chromosomique spontanée détectée dans les progéniteurs neuraux *Xlf*<sup>-/-</sup> a provoqué un changement de destin des CSPN en les réorientant vers une différenciation prématurée.

- **Altérations de la structure du cerveau et des fonctions cognitives des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>**

L'immunomarquage avec des marqueurs spécifiques (Tbr1, Cux1 et Statb2) des différentes couches corticales a révélé une altération de la topographie du cortex dans le cerveau post-natal des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. De plus, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a ensuite permis de dévoiler des atteintes structurelles importantes du cerveau chez la souris adulte *Xlf*<sup>-/-</sup>, notamment une taille réduite du corps calleux et des modifications structurelles du cortex. Afin d'évaluer les conséquences de la déficience d'XLF sur les fonctions cognitives du cerveau,

nous avons réalisé plusieurs tests comportementaux, qui ont dévoilé une baisse de l'activité exploratoire et des interactions sociales altérées chez les souris *Xlf*<sup>-/-</sup> adultes.

## **Conclusion**

Notre étude a dévoilé une instabilité chromosomique spontanée dans les CSPN du cerveau embryonnaire, plus importante pendant les premiers stades du développement. La déficience d'XLF est associée à une augmentation de l'instabilité chromosomique des progéniteurs neuraux, conduisant à un changement de leur destin vers une neurogenèse prématurée, qui serait à l'origine des altérations neurocognitives des souris adultes. Ainsi, une légère déficience de réparation d'ADN représenterait un facteur de risque pour le développement de neuropathologies.



### 3.1.3 Impaired brain development and behavior of *Xlf* null mice linked to chromosome instability-induced premature neurogenesis (ARTICLE 1)

Amandine Bery<sup>1</sup>, Olivier Etienne<sup>1</sup>, Elodie A. Pérès<sup>1,2</sup>, **Sofiane Mokrani**<sup>1</sup>, Christine Granotier-Beckers<sup>1</sup>, Antony Laugeray<sup>3</sup>, Chantal Desmaze<sup>1</sup>, Laurent R Gauthier<sup>1</sup>, Marion Martin<sup>3</sup>, Fawzi Boumezbeur<sup>2</sup>, Vincent Abramovski<sup>5</sup>, Stéphane Mortaud<sup>3,4</sup>, Jean-Pierre de Villartay<sup>5</sup>, Denis Le Bihan<sup>2</sup>, Arnaud Menuet<sup>3,4</sup>, François D. Boussin<sup>1</sup>

1 Laboratoire de RadioPathologie, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, U1274 Inserm, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

2 Neurospin, I2BM, DRF, CEA, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

3 Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – UMR7355 CNRS - 3b, Orléans, France

4 Université d'Orléans – France.

5 Genome Dynamics in the Immune System Laboratory, INSERM, UMR 1163, Institut Imagine, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris-Cité, France

Correspondance to François Boussin, email: [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr); Tel: 33 1 46 54 97 91

#### Abstract

XRCC4-like factor (XLF also known as Cernunnos or NHEJ1) is a component of the ligation complex used in classical non-homologous end joining (NHEJ), a major DNA double strand break (DSB) repair pathway. *Xlf*<sup>-/-</sup> mouse embryos exhibit a low deficiency in DNA repair capacity increasing chromosome instability in expanding neural progenitors at early brain developmental stage. Strikingly, chromosome instability does not cause a massive neuronal apoptosis, but induces a premature neurogenesis that decreases neural progenitor expansion and impairs brain development. Consistently, adult *Xlf*<sup>-/-</sup> mice exhibit structural brain alterations and impaired social behaviors and exploratory activity. Thus, a low DNA repair deficiency inducing premature neurogenesis may be a major cause of neurobehavioral disorders such as autism spectrum disorders (ASD).

## Introduction

Neural progenitor proliferation, migration and differentiation are strictly regulated spatially and temporally during brain development. During early corticogenesis, the apical progenitors, namely the radial glial cells (RGC), expand in the ventricular zone (VZ) by symmetric divisions Zhao et coll., 2015 ; Olivieri et coll., 1984 ; Gajendiran et coll., 2001 ; Stoilov et coll., 2007, Schwarz et coll., 2008, Nenoj et coll., 2015. Then, they predominantly perform asymmetric neurogenic divisions: they generate a RGC to maintain the proliferative pool, and either a neuron or an intermediate progenitor cell (IPC). The IPC migrate to an overlying proliferating layer, the subventricular zone (SVZ), and ultimately generate a pair of neurons that migrate through the intermediate zone (IZ) to reach the cortical plate (CP) <sup>7</sup>.

Development and function of the nervous system depend on maintenance of genome stability. Numerous human neurologic disorders result from defective DNA damage signaling and repair <sup>8</sup>. Consistently, knockout mouse models have confirmed the importance of multiple DNA repair pathways for brain development.

Classical non-homologous end joining (cNHEJ) is a DNA double strand break (DSB) repair pathway performing the direct religation of broken DNA ends. DSBs may arise spontaneously in the brain from various endogenous sources, including replicative or oxidative stress, or associated with transcriptional activity <sup>9-11</sup>. NHEJ involves the Ku70/80 heterodimer (Ku) that binds to DNA ends and recruits the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) generating the DNA-PK holoenzyme. DNA-PK promotes synapsis of DNA ends, enhances appropriate end processing through activation of the Artemis endo/exo-nuclease and recruits the ligation complex made of X-ray cross-complementing protein 4 (XRCC4), DNA ligase IV (LigIV) and XLF <sup>12, 13</sup>. NHEJ is an integral part of the V(D)J recombination machinery, which generates a diverse antigenic repertoire during T and B cells development <sup>14</sup>. Human mutations in Artemis, DNA-PKcs, LIGIV, and XLF cause increased cellular radiosensitivity consistently with the DNA repair defect, various extents of severe combined immunodeficiency (SCID) due to defective V(D)J recombination, and microcephaly in the case of LigIV and XLF deficiencies. Generally, these patients do not have profound neurodevelopmental problems and the neurological disease is not progressive postnatally<sup>15</sup>. Patients with hypomorphic XRCC4 mutations do not harbor any immunological manifestations but are characterized by major developmental anomalies including the central nervous system leading to microcephalic primordial dwarfism (MPD) syndrome <sup>16</sup>. Confirming the importance

of NHEJ for brain development, complete deficiency in LIGIV and XRCC4 is lethal *in utero* in mice because of an aberrant neuronal cell death<sup>12, 13, 17-20</sup>.

Contrary to *Xrcc4*<sup>-/-</sup> or *Lig4*<sup>-/-</sup> mice, XLF knock-out (*Xlf*<sup>-/-</sup>) mice are viable with a slightly affected immune system<sup>21, 22</sup> and no obvious impairment of brain development has been reported to date<sup>21, 23</sup>. As expected from an NHEJ defect, *Xlf*<sup>-/-</sup> murine embryonic fibroblasts show spontaneous cytogenetic abnormalities, and are highly sensitive to ionizing radiation<sup>21</sup> and to the radiomimetic drug phleomycin<sup>22</sup>. The mild phenotype of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice has been shown to rely on compensating pathways from the ATM-dependent DNA damage response<sup>24-27</sup> and on overlapping functions between the V(D)J recombinase protein RAG2 and XLF in V(D)J recombination, lymphocyte development and the maintenance of genome stability<sup>28</sup>. Furthermore, it has been recently revealed that XLF shares one or more redundant functions with PAXX, a recently identified NHEJ repair factor, as, unlike *Paxx*<sup>-/-</sup> or *Xlf*<sup>-/-</sup> single mutants, mice lacking both proteins died *in utero* with an extensive cell death in the central nervous system, similarly to *Xrcc4*<sup>-/-</sup> or *Lig4*<sup>-/-</sup> mice<sup>23, 29</sup>.

Nevertheless, the consequences of XLF deficiency on mouse brain development have not been fully investigated. Here we show that the low deficit in NHEJ of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice impairs brain development and function by dysregulating the balance between expansion of neural progenitors and neurogenesis, highlighting thus the importance of NHEJ for neural progenitors at early developmental stages.

## Results and Discussion

### *Low apoptosis and DNA repair deficiency of Xlf<sup>-/-</sup> neural progenitors*

We quantified spontaneous apoptosis in the developing brain of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice by immunostaining of cleaved-caspase 3<sup>30</sup> (CC3 positive cells). In accordance with previous reports<sup>21, 23</sup>, we did not find a massive apoptosis at any developmental stages contrary to that described in LigIV or XRCC4 embryos<sup>17, 31, 32</sup>. However, we observed a low but significant increase of apoptosis in different regions of the *Xlf*<sup>-/-</sup> embryonic and post-natal brain (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 1a,b).

Spontaneous apoptosis peaked at E12.5 in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1a). Apoptotic cells were detected in the proliferative zones (VZ and SVZ) at early time points of corticogenesis (E11.5 and E12.5) and in the IZ and CP at later developmental stages (Fig. 1a), suggesting that apoptosis concerns cycling neural progenitors first, then a small fraction of

postmitotic neurons. This strikingly differs from *Xrcc4*<sup>-/-</sup> or *Lig4*<sup>-/-</sup> embryos, as well as *Lig4*<sup>Y288C</sup> mouse carrying a homozygous, hypomorphic mutation (Y288C) in *LIGIV*, in which most apoptosis occurs in post-mitotic neurons within the IZ and the CP at the peak of neurogenesis<sup>17, 31-33</sup>.

In order to more specifically detect the apoptotic cycling cells, pregnant mice at E11.5 were intraperitoneally injected with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), respectively 2.5 h and 1 h before sacrifice as previously described<sup>34, 35</sup>. Co-staining of EdU and BrdU with cleaved-caspase 3 confirmed that more than 60 % of apoptotic cells were stained by EdU and/or BrdU and therefore correspond to neural progenitors that entered apoptosis during S/G2/M phases (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1c), including 29 % cells in early S phase (EdU(-)BrdU(+) cells). Cycling neural progenitors are known to exploit homologous recombination (HR), the other main mechanism of DSB, as demonstrated by the massive apoptosis of neural progenitors at early developmental stages in various HR-deficient murine models<sup>31</sup>. Our data evidence that NHEJ is also required to prevent apoptosis of a subset of neural progenitors during early cortical development albeit in a much lesser extent.

We and others have shown that the embryonic mouse brain is highly radiation-sensitive<sup>30, 34-38</sup>. In order to assess the DNA repair activity of *Xlf*<sup>-/-</sup> neural cells, we exposed mouse E14.5 embryos *in utero* to low doses of gamma radiation (10 mGy, 50 mGy or 100 mGy; Fig. 1d). We found a dose-dependent increase of apoptosis in the embryonic brains 4 hours after irradiation. As expected from their NHEJ defect, we found a higher number of apoptotic cells in the cortex of irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos when compared to irradiated *wt* controls at each dose tested (Fig. 1d). Interestingly, apoptosis was already increased in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos even after exposure to the very low dose of 10 mGy (Fig. 1d) supposed to introduce 0.2 to 0.3 DSBs per cell according to the current estimation<sup>39, 40</sup>. These data suggest that *Xlf*<sup>-/-</sup> neural cells i) are partially deficient for NHEJ, ii) that residual NHEJ allows *Xlf*<sup>-/-</sup> neural cells to face most DSBs that occur spontaneously during brain development contrary to mice deficient for other core NHEJ factors, but, iii) that a low increase in the number of DSBs arising spontaneously or after irradiation is sufficient to reach the threshold of apoptosis induction in a dose-dependent number of *Xlf*<sup>-/-</sup> neural cells.

***Increased chromosome instability in *Xlf*<sup>-/-</sup> neural progenitors during early developmental stages.***

To evaluate the consequences of XLF deficiency on genome stability of neural progenitors, we performed Telo-FISH on metaphases collected without any culture step from the cortex of *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* embryos at different developmental stages (Fig. 1e). This method has the advantage of directly reflecting the *in vivo* situation without introducing the bias of DNA damage induced during cell cycle progression *in vitro*.

Interestingly, we found an unexpected high level of chromosome aberrations in *wt* metaphases at early cortical development stages affecting approximately 18% of metaphases at E12.5 and E13.5, whereas it concerned only around 5 % of metaphases at E14.5 and E15.5. Chromosome instability was significantly increased in *Xlf*<sup>-/-</sup> metaphases at E13.5 and E14.5 as compared to *wt* controls, reaching around 35 % of *Xlf*<sup>-/-</sup> metaphases at E13.5. The chromosome aberrations found both in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> metaphases were essentially chromatid-type aberrations (*ie.* chromatid breaks), which are the consequences of unrepaired DNA breaks occurring during or after replication in S or G2 phases. These data are consistent with a recent report by Wei and colleagues <sup>41</sup> showing a high rate of recurrent DNA breaks within large and late replicating genes in neural stem and progenitor cells. Altogether these data suggest that a higher level of DNA damage occurs in late S phase of neural progenitors at early developmental stages and that NHEJ is required to repair a subset of these DNA breaks.

### ***Premature neurogenesis in Xlf<sup>-/-</sup> mice***

Arai and colleagues <sup>42</sup> have shown that expanding progenitors have a three-fold longer S phase compared to neural progenitors involved in neurogenic divisions. Having found that XLF deficiency increased chromosome aberrations generated in late S phase during early corticogenesis when RGC expand, we investigated next whether XLF deficiency affects RGC expansion. It has been previously reported that adult *Xlf*<sup>-/-</sup> mice are smaller than *wt* controls <sup>22</sup>. Consistently, we found that the cortex thickness and the ventricular width of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice embryos remained smaller than that of *wt* embryos throughout fetal development (Supplementary Fig. 2a and b). In line with the reduced cortex size, we found a lower number of phospho-H3-positive apical mitotic figures in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos from E12.5 to E14.5 in comparison to *wt* embryos (Figure 2a and Supplementary Fig. 2c), showing a reduced number of mitotic RGC.

Symmetrical versus asymmetrical division of neural progenitors not only specifies the fate of daughter cells but also controls progenitor expansion and differentiation and eventually cortical size <sup>43</sup>. The orientation of the cleavage plane of mitotic RGC along the ventricular

surface influences the degree of asymmetry in cell division: a vertical plane is associated with a symmetric division of RGC and a horizontal plane with an asymmetric neurogenic division<sup>44, 45</sup>. Interestingly, we found that the angles formed by the segregation line of daughter chromosomes and the ventricular surface, which characterized the orientation of the mitotic cleavage planes of RGC<sup>35,46</sup>, were significantly decreased in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos as compared to *wt* embryos at E12.5 and E13.5 (Fig. 2b). Therefore, our data suggest an earlier switch of RGC from expansion toward neurogenic divisions in *Xlf*<sup>-/-</sup> deficient embryos.

This was further sustained by immunostainings of Pax6, Tbr2 and Tbr1, that we performed on coronal slices of embryos at different developmental stages. These nuclear markers allow the identification of RGC (Pax6<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>), newborn IPC (Pax6<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>), mature IPC (Pax6<sup>-</sup>/Tbr2<sup>+</sup>) and newborn neurons (Tbr1<sup>+</sup>) in the dorsal telencephalon (Supplementary Fig. 2d, e)<sup>47</sup>. As shown in Fig. 2c, we found a lower number of RGC at E13.5 and E14.5 in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos as compared to *wt* embryos. Moreover, we also found lower numbers of newborn IPC and newborn neurons at E15.5 in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos (Fig. 2c and Supplementary Fig. 2e). These results show that an early decrease in RGC expansion results in a decreased production of mature neurons at later developmental stages.

In order to further demonstrate the impact of *Xlf* deficiency on neurogenesis, we electroporated the GFP expression vector (pEBVCAGeGFP-Bsd) into neural progenitors present in the VZ-SVZ of E13.5 embryos to follow their fate in the developing brain<sup>48</sup>. Twenty-four hours after *in utero* electroporation, the GFP<sup>+</sup> cells migrated farther from the ventricle (Fig. 2d) and GFP intensity was higher in superficial layers (IZ, Supplementary Fig. 3) in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos than in *wt* embryos, confirming an increased trend of *Xlf*<sup>-/-</sup> neural progenitors for neurogenic division rather than proliferative maintenance. Interestingly, we showed that a 0.5 Gy *in utero* irradiation has similar effects on *wt* embryos (Fig. 2d), consistent with previous reports showing that ionizing radiation induces differentiation of neural stem cells<sup>49</sup>. Altogether, these data indicate that the increase of chromosome instability in neural progenitors reduced the expansion of neural progenitors in *Xlf*<sup>-/-</sup> mice in favor of premature neurogenesis.

Gogondeau and colleagues<sup>50</sup> have proposed that premature differentiation is an alternative response of *Drosophila* neural stem cells to prevent aneuploid cells from cycling. Premature differentiation of NSC has also been observed in a mouse model of centrosome amplification causing highly aneuploid cells when apoptosis was inhibited<sup>51</sup>. Here we show that premature differentiation is also the response to an increase in chromosome aberrations in mouse neural progenitors at early developmental stages.



### ***Xlf*<sup>-/-</sup> mice exhibit structural brain alterations**

We have shown that premature neuronal differentiation in embryos decreased the expansion of *Xlf*<sup>-/-</sup> RGC at early developmental stages and eventually reduced the amount of mature neurons produced and the cortex size. We therefore investigated the consequences of premature neurogenesis for cortex topographic organization in the *Xlf*<sup>-/-</sup> postnatal brain. Radial migration of projection neurons occurs in an age-dependent inside-out manner with early-born neurons occupying deeper layers, whereas late-born neurons migrate past early-born neurons to occupy superficial layers<sup>52-54</sup>. We found a significant decrease in the percentages of cells expressing Tbr1 (Supplementary Fig. 4a) in the deeper cortical layer (Layer VI) and of cells expressing Cux1 (Supplementary Fig. 4b), a marker of cortical layer II-IV, at post-natal day (PND) 0 in *Xlf*<sup>-/-</sup> pups as compared to *wt* controls. However, the percentage of cells expressing Tbr1 or Cux1 was similar in the two genotypes at PND7, when cortex topographic organization is achieved. In contrast, we found a persistent decrease in the percentage of cells expressing Satb2 (Special AT-rich sequence binding protein2), a marker of the upper layers in *Xlf*<sup>-/-</sup> pups (Fig. 2e, f, g).

We next investigated the brains of *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* adult mice using anatomical T<sub>2</sub>-weighted MRI, which confirmed that the brain volume of *Xlf*<sup>-/-</sup> was decreased by 13% compared to *wt* animals ( $p < 0.0001$ ) (Supplementary Fig. 5a). Interestingly, we found that *Xlf* deficiency affects the corpus callosum, as shown by the significant decrease of its volume related to the whole brain ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3a). Water diffusion MRI was then used to probe brain microstructure through changes in the Brownian motion of water in tissues<sup>55</sup>. The signal attenuation,  $S/S_0$ , was fitted using a kurtosis diffusion model to estimate the apparent diffusion coefficient -  $ADC_0$  and the Kurtosis, the fourth moment of the water diffusion probability distribution function<sup>56</sup>.  $ADC_0$  is considered to reflect more diffusion in the extracellular space, which also reflects the amount of cell filling (shape and size) in tissues. The Kurtosis characterizes the degree of deviation of the signal behavior from free (Gaussian) diffusion ( $K=0$  for free diffusion when the diffusion driven molecular displacements obey a Gaussian law), a marker of the heterogeneity of the diffusion environment. Results showed an increase of  $ADC_0$  value (Fig. 3b) and a drop of Kurtosis value (Fig 3c) in the corpus callosum, and conversely a significant decrease in  $ADC_0$  (Fig. 3b) associated with a reduction of Kurtosis value (Fig. 3c) in the cortex of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. These modifications were further confirmed by the synthetic ADC (sADC), which provides an optimized balance of Gaussian and non-Gaussian diffusion, maximizing sensitivity to tissue microstructure (Supplementary Fig. 5b, c)<sup>57</sup>.



Therefore, we conclude that *Xlf* null mice exhibit *i*) structural changes in the cortex probably reflecting a decrease in dendritic arborization of cortical neurons and *ii*) functional alterations of the corpus callosum, which are likely related to a reduction of fibers of white matter or to disruptions of fiber bundles. *Satb2* has been shown to be required for the specification of callosal projection neurons<sup>38, 58-60</sup> and for the control of dendritic arborization of cortical upper-layer neurons. We suggest that *Xlf*<sup>-/-</sup> brain alterations originate from the decrease of *Satb2* expression we observed in the *Xlf*<sup>-/-</sup> post-natal brains. Altogether, our study clearly shows that premature neurogenesis leads to significant brain alteration in *Xlf*<sup>-/-</sup> mice, particularly consisting in a reduced size of the corpus callosum and structural changes in the cortex.

### ***Behavioral impairment of Xlf<sup>-/-</sup> mice***

Neurodevelopmental disorders such as autism have been related to a reduced size of the corpus callosum<sup>61, 62</sup>. Therefore, in order to assess the consequences of the functional brain alterations detected in *Xlf* null mice, we compared their behaviors to that of *wt* mice by confronting them to several tasks.

We first tested the novel environment exploration and general locomotor activity of our mice in the open-field exploration test<sup>63-65</sup>. *Xlf*<sup>-/-</sup> mice did not display any difference in the time spent in the anxiogenic center part of the open-field compared to their *wt* counterparts ( $p=0.35$ ; Supplementary Fig. 6a). However, *Xlf*<sup>-/-</sup> mice showed a significant reduction of ambulatory exploration, as indicated by the decrease of total distance they travelled during the five-minutes trial as compared to *wt* mice ( $p<0.001$ , Fig. 4a), and a downward trend in time spent rearing ( $p=0.06$ ; Supplementary Fig. 6b), another exploratory behavior. Importantly, *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* mice performed similarly in horizontal bars<sup>66</sup> and grip strength tests<sup>67</sup> showing that the decreased exploratory activity of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice was not due to altered motor skills (Supplementary Fig. 6c, d).

With the aim of investigating the social dimension of behavior of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice, we exposed them to an unknown peer and measured several behavioral endpoints indicative of social abilities<sup>68</sup>. *Xlf*<sup>-/-</sup> mice showed a significant decrease in time spent rearing (non-affiliative behavior) during this social interaction task ( $p<0.01$ ; Fig. 4b). As compared with the time spent rearing in the open-field (Supplementary Fig. 6b), these data suggest that the presence of the stranger further reduced their exploratory activity. Moreover, we found that *Xlf*<sup>-/-</sup> mice spent more time interacting with the stranger (affiliative behavior) in comparison to *wt* mice (Fig.

4b). This was related to an increase of the time spent sniffing body parts of the peer (Supplementary Fig. 6e), whereas the times spent in nose and anogenital sniffing remained similar to that of *wt* mice (Supplementary Fig. 6f, g)<sup>68,69</sup>. However, interestingly, minute-by-minute analysis revealed abnormal anogenital sniffing behavior during the ethologically relevant first minute of the test (Supplementary Fig. 6g). Altogether these data show that *Xlf*<sup>-/-</sup> mice behave inadequately in the context of social encounters showing social anxiety-related behaviors during social interaction<sup>70</sup>.

To further document the impairment social skills associated with *Xlf* deficiency, we then investigated their voluntary initiation of social interaction and their ability to discriminate social novelty in the three chamber sociability test<sup>71</sup>. During the first 5 min trial of this test, mice were first free to explore the entire 3 chamber apparatus. As previously observed with the open field test, the *Xlf*<sup>-/-</sup> mice travelled a shorter total distance than *wt* mice ( $p < 0.001$ ; Fig. 4c), confirming their decreased exploratory activity. In the second trial, an unfamiliar mouse was put under a wire cup in one side chamber (mouse 1) and an object also put under an identical wire cup was placed in the other side chamber. Mice were left free to explore and initiate social contacts for 5 minutes. Both *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* mice spent more time in the chamber containing mouse 1 than in the chamber containing the object (Fig. 4d), showing their preference for social interactions. Then, in the last 5 min trial, we assessed the social novelty of our mice by introducing a novel mouse (mouse 2) in place of the object. *Wt* mice spent more time in the chamber with mouse 2 than in the chamber containing the known familiar mouse 1 ( $p < 0.01$ ; Fig. 4c), indicating their preference for social novelty. By contrast, *Xlf*<sup>-/-</sup> mice did not display any preference for the novel mouse (Fig. 4c), showing a clear deficiency for preference of social novelty.

We have thus shown here that *Xlf*<sup>-/-</sup> mice, which are characterized by a low deficiency in NHEJ, exhibit significant alterations of exploratory activity and social interactions. These mice represent therefore a new model of neurobehavioral disorders related to DNA repair deficiency. The very low level of apoptosis observed during brain development in these mice could not account for the effects observed. Rather the key determinant is the induction of premature differentiation of neural progenitors, which is related to an increase of chromosome instability at the onset of brain development.

It is now accepted that there are large polymorphisms in DNA repair genes in humans that could influence individual DNA repair capacity and could be involved in cancer development. Furthermore, humans can be exposed to numerous DNA damaging agents

(pollutants, ionizing radiation related to nuclear accidents, clinical diagnostic— CT-scan —, or treatments —radiotherapy—). Our study clearly identified premature differentiation as a major mechanism causing neurobehavioral disorders and suggests that a low DNA repair deficiency, as well as chronic exposure to agents inducing a low genotoxic stress during pregnancy, may represent important risk factors for neurobehavioral disorders such as autism spectrum disorders (ASD).

## **Materiel and methods**

### ***Animal experiments***

*Xlf*<sup>-/-</sup> mice (Vera et al 2013) in a C57Bl/6 background and *wt* controls were used in this study. Animal experiments were carried out in strict accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EU). Protocols were approved by our institutional ethic committee in charge of animal experimentation (CETEA N°44) and were authorized by French Research Ministry.

### ***Irradiation***

*In utero* irradiation were realized either with a <sup>137</sup>Cs source (IBL 637, CIS BIO International) at 0.5Gy (dose rate: 0.8 Gy/min) or with a <sup>60</sup>Co source (Alcyon) for low doses (<0.5Gy, each dose has been delivered in 2 min).

### ***Antibodies***

Rabbit anti-Pax6 (Abcam, ab5790, 1:200), rabbit anti-Tbr2 (Millipore, AB23345, 1:300), rabbit anti-Tbr1 (Abcam, ab31940, 1:100), rabbit anti-cleaved-caspase 3 (Cell signaling, 9661, 1:200), rabbit anti-Satb2 (Abcam, ab34735, 1:1000), rabbit anti-Cux1 (Santa-Cruz, sc-13024, 1:200), mouse anti-phospho H3 (Cell Signalling, 9606S, 1:300), mouse anti-BrdU (GE Healthcare, RPN20AB, 1:300), goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 or 594 conjugated secondary antibody (ThermoFischer, 1:400) or goat anti-rat Alexa Fluor 594 conjugated secondary antibody (ThermoFischer; 1:400), and goat anti-mouse Alexa Fluor 594 (ThermoFischer, A11005, 1:400).

### ***Immunofluorescent staining***

Mice were sacrificed humanely. Embryonic heads were fixed overnight at 4°C by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin with a Tissue-tek processor (VIP, Leica, Wetzlar, Germany). Five µm coronal sections were then obtained using a

microtome (Leica RM2125RT) and mounted onto glass slides for histologic analyses. Pups' brains were extracted and processed similarly. After paraffin removal and citrate treatment, the brain sections were permeabilized with 0.5% TritonX-100 in phosphate buffer saline (PBS) for 15 min and incubated for 2 h with 7.5% fetal bovine serum, 7.5% goat serum in PBS. The sections were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. After washing, the sections were incubated with appropriate secondary antibodies for 1h. After washes, nuclear staining was achieved by incubation with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) to quantify apoptosis by the detection of pyknotic nuclei<sup>30</sup>. In. Slides were mounted under Fluoromount (Southern Biotechnologies associates, Birmingham, AL, USA).

Tissues were examined under a fluorescence microscope (Pathfinder, Nikon) with a 10X or 20X objective in three channels (appearing red, green and blue in all figures) as separate files. These images were then stacked with Photoshop software (Adobe, San Jose, CA, USA).

Embryonic brains were analyzed in a standard sector of 100 µm wide from the dorsomedial telencephalon wall, as previously described<sup>34</sup>.

Pups brains were analyzed in regions of interest defined in the somatosensoriel (S) and medial (M) regions of the dorsal telencephalon. The percentages of nuclei (DAPI) stained with the antibodies directed against Satb2, Cux1 and Tbr1 were determined from using the open platform for scientific image analysis, ImageJ.

All statistical analyses were performed on Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA, Version 7.00).

### **EdU/ BrdU incorporation**

Pregnant mice at E11.5 were intraperitoneally injected with 0.1 mg 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (ThermoFisher, Waltham, MA USA) and, 1.5 h later, with 1 mg of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, St. Louis, MO). Cortical slices were obtained as described above. EdU/BrdU detection was performed as previously described<sup>34</sup>.

### **Determination of mitotic spindle orientation of RGC**

The spindle orientation of mitotic RGC was defined as the angle formed by the virtual line passing through spindle poles and the ventricular edge using an especially developed macro as previously described<sup>72, 73</sup>.

### **In utero electroporation**

*In utero* electroporation was performed as described by Shimogori and Ogawa<sup>48</sup>; including few modifications. A time-pregnant mouse was anesthetized with isoflurane gas (Temsega). The uterine horns containing E13.5 embryos were exposed. One to 1.5  $\mu$ l of GFP-expression vector pEBVCAgeGFP-Bsd kindly provided by Dr Denis Biard (CEA, iMETI, SEPIA, 750 ng/ $\mu$ l) mixed with Fast green was manually microinjected through the uterine wall into the lateral ventricle, using a calibrated glass micropipette. The dorsal telencephalon was electroporated across the uterus using two 3 mm electrodes paddles positioned on either side of the head and controlled by an electroporator (NEPA21, Sonidel). The electroporator delivered 4 pulses of 50ms at 30mV with a 950ms interval. Throughout the surgical procedure, the uterus was bathed with phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4). After the procedure the uterus was placed back in the abdominal cavity and the wound was surgically sutured. Twenty-four hours after electroporation the embryonic brains were dissected and fixed for subsequent analyses. Brains were embedded in 2% agarose solution (made in H<sub>2</sub>O) for sectioning using a vibratome (Leica VT 1200S) at a thickness of 70  $\mu$ m. GFP-positive sections were first selected under epifluorescent microscope, then stained with DAPI for nuclei labelling. Image stacks of GFP+ sections were then acquired with NIKON A1R confocal laser scanning microscope system attached to an invert ECLIPSE Ti microscope (Nikon Corp. Tokyo, Japan). The best focused plane for fluorescence is chosen automatically with NIS-Element software from image stacks. The mean distances between the edge of the ventricle and GFP-positive cell migration front were measured from 3 sites per cortical slices. Student's t test for independent samples was performed with StatView SE (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) to compare between both genotypes.

### **Chromosome instability**

Pregnant mice were sacrificed and embryonic cortices were mechanically dissociated. Cells were resuspended in a hypotonic solution (37.5 mM KCl, 8.33% fetal calf serum), then incubated for 20 min at 37°C and finally fixed by a mix of acetic acid/ethanol (1V/3V). Metaphases were spread on wet cold slides. In order to faithfully detect non repaired or non-fused extremities as well as chromosome and chromatid aberrations, telomeres were stained by Telo-FISH using a telomeric fluorescent PNA probe [Cy3-(CCCTAA)<sub>3</sub>; Applied Biosystems] as previously described<sup>74</sup>. Hybridized metaphases were then detected and captured under a Zeiss Axioplan2 microscope coupled with the metafer software (Metasystems). Images were exported and analyzed with Photoshop (Adobe).

### **Magnetic Resonance Imaging (MRI) acquisitions**

Magnetic resonance imaging was performed on a 11.7 T MRI scanner equipped with a CryoProbe (Biospec, Bruker BioSpin, Germany). *Wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice (5-months old male, n = 8 for each group) were anesthetized using isoflurane (1-2%). Body temperature was monitored and maintained at 37°C±0.5°C. The MRI protocol included an axial multi-slice Turbo spin-echo T<sub>2</sub>-weighted scan for whole-brain anatomic imaging (TE/TR=30/2500ms, rare factor=8, resolution=0.05x0.05 x0.45mm, matrix size=320x320 pixels, FOV=16x16mm, 16 non-contiguous slices, slice gap=0.15mm). Diffusion-weighted imaging (DWI) were acquired using a multi-slice and single-shot pulsed-gradient spin-echo EPI sequence (PGSE-EPI) with the following parameters: TE/TR=24/2500ms, resolution=0.125x0.125x0.45, matrix size=96x96 pixels, FOV=12x12mm, 16 non-contiguous slices, slice gap=0.15mm,  $\delta/\Delta=4/11.5$ ms, 34 b-values from 10 to 3500 s/mm<sup>2</sup>, 3 orthogonal directions).

Anatomical MRI images were used to compute the volume of the whole brain and of our regions-of-interest (cortex, hippocampus, corpus callosum and lateral ventricles) by manual segmentation. The DWI data were processed using a home-made software implemented with MATLAB (Mathworks, Naticks, MA). Gaussian and non-Gaussian diffusion parameters, ADC<sub>0</sub> (Apparent Diffusion Coefficient) and K (Kurtosis) were estimated in selected region-of-interest (ROI) by fitting the signal obtained at all b values according to the Kurtosis diffusion model<sup>56</sup>. Exploiting the DWI datasets acquired along three orthogonal directions, a synthetic ADC (sADC), comparable to the pseudo-Trace of the diffusion tensor, was calculated from two key b values (eg. 200 and 1500 s/mm<sup>2</sup>) as described previously<sup>57</sup>, to optimize the balance between Gaussian and non-Gaussian diffusion effects and sensitivity to tissue microstructure. For the Kurtosis model and the sADC calculation data were averaged over the 3 acquired directions to increase signal noise ratio and remove residual differences in gradient hardware (diffusion anisotropy effects were ignored in the ROIs used for analysis at our spatial resolution).

### **Behavioral assays**

Behavioral assays were performed in adult mice (at the age of 3 months) using the MIRcen facilities (CEA, Fontenay-aux-Roses) in the following order:

- *Horizontal bars*<sup>66</sup>: The ability of mice to grip two round wooden bars (2 and 4 mm diameters respectively) was scored as followed: Falling between 1-5 sec = 1; Falling between 6-10 sec =

2; Falling between 11-20 sec = 3; Falling between 21-30 sec = 4; Falling after 30 sec = 5. Scores obtained at each bar were then summed to get a final score for each individual.

- *Grip strength*<sup>67</sup>: The mouse is placed on a grid, which is then turned upside down. The time the mice remained attached to the grid before falling was then recorded.

*Open field*<sup>64</sup>: The open field was a squared arena (50 x 50 x 40.5 cm) with grey plexiglas floor surrounded by grey plexiglas walls, illuminated by a direct overhead lighting (55 lux). The apparatus was set up under a digital camera, which was connected to a computer under the control of the EthoVision video-tracking system (Noldus). Mice were individually placed in a corner of the open field and left to freely explore the apparatus for 5 min. The total distance travelled in the arena was recorded as a measure of locomotor activity. Time spent in the central part (a square of 25.5cm side) of the open field was automatically recorded and used as a measure of anxiety. Time spent rearing, indicative of environment-based exploration, was also computed.

*Social interaction*: Social interaction was tested in a cage (33.2 x 15 x 13 cm) with clean sawdust, illuminated by a direct overhead lighting (10 lux). *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice were individually reared and left undisturbed for 30 min until the beginning of the test. During this habituation period, all the mice had *ad libitum* access to food and tap water. Each mouse was then paired with an unfamiliar age-matched NMRI female. Social interaction between the two was recorded using a digital camera (Ikegamy with objectiv Computar 4.5-12.5mm) mounted above the cage at ceiling level. The videos were analyzed with the Observer XT software (version 10, Noldus Technology, The Netherlands) by an independent observer blind to the study protocol. Social investigation was scored as nose, body and anogenital sniffing time of the conspecific by the test mouse. The total time spent interacting was computed as the total time spent by the test mouse carrying out all sniffing behaviors. Time spent rearing was also computed as an index of nonsocial exploration. In addition, we performed a temporal analysis of social interactions by considering relevant behavioral parameters minute-by-minute. Two-way repeated measures ANOVA were used to determine whether any change in interaction time is the result of the interaction between the genotype and time min by min.

*Three-chamber test for sociability and social recognition*: Mice were run individually in a three-chambered arena made of clear polycarbonate, illuminated by a direct overhead lighting (10 lux). Retractable doorways built into the two dividing walls controlled access to the side chambers. Each of the two outside chambers had an inverted empty wire cup. The test consisted of three consecutive trials. In the first 5 min trial (habituation), the test mouse was placed in the

center chamber, and was allowed to freely explore the entire apparatus, with the wire cups empty. In the next 5 min trial (sociability), an unknown male (C57BL/6), was placed in one of the two wire cups, while a Lego™ brick was introduced in the other wire cup. In the last 5 min trial (social recognition), a second unknown male (C57BL/6) was placed in the wire cup where the object previously was. The object/novel mouse sides were alternated left and right between subjects. Automatic monitoring recorded and scored the time spent in contact with each wire cup (within a 3 cm radius proximal to each wire cage (using the EthoVision video-tracking system).

All data are presented as mean  $\pm$  SD. All statistical analyses were obtained using Student t-test with StatView SE (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

### **Acknowledgments**

We are indebted to V. Neuville, V. Barroca, J. Tilliet and C. Joubert, for animal care. Christelle Martin from SEAT, Orléans, and Karine Cambon from MIRcen, CEA for her help with the neurobehavioral assays, Denis Biard for providing his pEBV-EGFP vector, T. Kortulewski for microscopy expertise and Carl Mann for valuable comments on the manuscript. This study was supported by grants of Electricité de France (EDF) and has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 323267 (RISK-IR). This work was performed on a MRI platform of the “France Life Imaging” network partly funded by the grant “ANR-11-INBS-0006”.

A.B. obtained the data of Fig. 2c, d, and 4, and Supplementary Fig. 1b, 2d,e, and 6 and participated to manuscript writing. O.E. obtained the data of Fig. 1a, b, c, d, and 2a, b, e, f, Supplementary Fig. 1, 2a,b,c,d, 3 and 4 and participated to manuscript writing. S.M, C.G-B, and C.D. obtained the data of Figure 1e and participated to manuscript writing. L.R.G analyzed the data obtained in Fig. 2d and Supplementary Fig. 3). A.L., M.M. and A.M. analyzed the data of Fig 4 and participated to manuscript writing (Fig. 4, Supplementary Fig. 6), V.A. and J.P.V. have generated the *Xlf*<sup>-/-</sup> mice and participated to manuscript writing. E.A.P., F.B. and D.L.B. performed and analyzed MRI experiments and participated to manuscript writing (Fig. 3; Supplementary Fig. 5), F.D.B. directed the study and wrote the manuscript.



## References

1. Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**, 881-890 (2004).
2. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263 (2000).
3. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. & Ogawa, M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* **31**, 727-741 (2001).
4. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* **7**, 136-144 (2004).
5. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V. & Kriegstein, A.R. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* **508**, 28-44 (2008).
6. Taverna, E. & Huttner, W.B. Neural Progenitor Nuclei IN Motion. *Neuron* **67**, 906-914 (2010).
7. Gotz, M. & Huttner, W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 777-788 (2005).
8. McKinnon, P.J. Maintaining genome stability in the nervous system. *Nature neuroscience* **16**, 1523-1529 (2013).
9. Aguilera, A. & Garcia-Muse, T. Causes of genome instability. *Annual review of genetics* **47**, 1-32 (2013).
10. Erwin, J.A., Marchetto, M.C. & Gage, F.H. Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 497-506 (2014).
11. Madabhushi, R., *et al.* Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* **161**, 1592-1605 (2015).
12. Ahnesorg, P., Smith, P. & Jackson, S.P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313 (2006).
13. Buck, D., *et al.* Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-299 (2006).
14. Malu, S., Malshetty, V., Francis, D. & Cortes, P. Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res* **54**, 233-246 (2012).
15. Woodbine, L., *et al.* PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 2969-2980 (2013).
16. de Villartay, J.P. When natural mutants do not fit our expectations: the intriguing case of patients with XRCC4 mutations revealed by whole-exome sequencing. *EMBO molecular medicine* **7**, 862-864 (2015).
17. Gao, Y., *et al.* A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell* **95**, 891-902 (1998).
18. Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A. & Lindahl, T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current biology : CB* **8**, 1395-1398 (1998).
19. Frank, K.M., *et al.* Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* **396**, 173-177 (1998).
20. Dai, Y., *et al.* Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2462-2467 (2003).
21. Li, G., *et al.* Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Molecular cell* **31**, 631-640 (2008).
22. Vera, G., *et al.* Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Molecular and cellular biology* **33**, 701-711 (2013).
23. Balmus, G., *et al.* Synthetic lethality between PAXX and XLF in mammalian development. *Genes & development* **30**, 2152-2157 (2016).

24. Zha, S., *et al.* ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature* **469**, 250-254 (2011).
25. Liu, J.P., *et al.* Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. *Nucleic acids research* **40**, 3898-3912 (2012).
26. Oksenychn, V., *et al.* Functional redundancy between the XLF and DNA-PKcs DNA repair factors in V(D)J recombination and nonhomologous DNA end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 2234-2239 (2013).
27. Lescale, C., *et al.* Specific Roles of XRCC4 Paralogs PAXX and XLF during V(D)J Recombination. *Cell Rep* **16**, 2967-2979 (2016).
28. Lescale, C., *et al.* RAG2 and XLF/Cernunnos interplay reveals a novel role for the RAG complex in DNA repair. *Nat Commun* **7** (2016).
29. Liu, X., Shao, Z., Jiang, W., Lee, B. & Zha, S. PAXX promotes KU accumulation at DNA breaks and is essential for end-joining in XLF-deficient mice. *Nat Commun* **8** (2017).
30. Nowak, E., *et al.* Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res* **165**, 155-164 (2006).
31. Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N. & McKinnon, P.J. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10017-10022 (2006).
32. Shull, E.R., *et al.* Differential DNA damage signaling accounts for distinct neural apoptotic responses in ATLD and NBS. *Genes & development* **23**, 171-180 (2009).
33. Gatz, S.A., *et al.* Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 10088-10100 (2011).
34. Roque, T., *et al.* Lack of a p21waf1/Cip-Dependent G1/S Checkpoint in Neural Stem and Progenitor Cells After DNA Damage In Vivo. *Stem cells* **30**, 537-547 (2012).
35. Etienne, O., Roque, T., Haton, C. & Boussin, F.D. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int J Radiat Biol* **88**, 694-702 (2012).
36. Hoshino, K. & Kameyama, Y. Developmental-stage-dependent radiosensitivity of neural cells in the ventricular zone of telencephalon in mouse and rat fetuses. *Teratology* **37**, 257-262 (1988).
37. Hoshino, K., Kameyama, Y. & Inouye, M. Split-dose effect of X-irradiation on the induction of cell death in the fetal mouse brain. *Journal of radiation research* **32**, 23-27 (1991).
38. Alcamo, E.A., *et al.* Satb2 regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Neuron* **57**, 364-377 (2008).
39. Rydberg, B. Radiation-induced heat-labile sites that convert into DNA double-strand breaks. *Radiat Res* **153**, 805-812 (2000).
40. Lobrich, M., *et al.* gamma H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669 (2010).
41. Wei, P.C., *et al.* Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell* **164**, 644-655 (2016).
42. Arai, Y., *et al.* Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* **2**, 154 (2011).
43. Sun, T. & Hevner, R.F. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 217-232 (2014).
44. Gauthier-Fisher, A., *et al.* Lfc and Tctex-1 regulate the genesis of neurons from cortical precursor cells. *Nature neuroscience* **12**, 735-U734 (2009).
45. Marzesco, A.M., Mora-Bermudez, F. & Huttner, W.B. Neurogenesis in G minor. *Nature neuroscience* **12**, 669-671 (2009).
46. Konno, D., *et al.* Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* **10**, 93-U78 (2008).

47. Englund, C., *et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *Journal of Neuroscience* **25**, 247-251 (2005).
48. Shimogori, T. & Ogawa, M. Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. *Dev Growth Differ* **50**, 499-506 (2008).
49. Hladik, D. & Tapio, S. Effects of ionizing radiation on the mammalian brain. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **770**, 219-230 (2016).
50. Gogondeau, D., *et al.* Aneuploidy causes premature differentiation of neural and intestinal stem cells. *Nat Commun* **6** (2015).
51. Marthiens, V., *et al.* Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* **15**, 731-+ (2013).
52. Angevine, J.B. & Sidman, R.L. Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in Mouse. *Nature* **192**, 766-& (1961).
53. Rakic, P. Neurons in Rhesus-Monkey Visual-Cortex - Systematic Relation between Time of Origin and Eventual Disposition. *Science* **183**, 425-427 (1974).
54. Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H. & Macklis, J.D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 755-769 (2013).
55. Le Bihan, D. & Iima, M. Diffusion Magnetic Resonance Imaging: What Water Tells Us about Biological Tissues. *Plos Biol* **13** (2015).
56. Iima, M., *et al.* Quantitative Non-Gaussian Diffusion and Intravoxel Incoherent Motion Magnetic Resonance Imaging Differentiation of Malignant and Benign Breast Lesions. *Invest Radiol* **50**, 205-211 (2015).
57. Iima, M. & Le Bihan, D. Clinical Intravoxel Incoherent Motion and Diffusion MR Imaging: Past, Present, and Future. *Radiology* **278**, 13-32 (2016).
58. Dobрева, I., Waeber, G., James, R.W. & Widmann, C. Interleukin-8 secretion by fibroblasts induced by low density lipoproteins is p38 MAPK-dependent and leads to cell spreading and wound closure. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 199-205 (2006).
59. Britanova, O., *et al.* Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron* **57**, 378-392 (2008).
60. Zhang, L., *et al.* Satb2 Is Required for Dendritic Arborization and Soma Spacing in Mouse Cerebral Cortex. *Cerebral cortex* **22**, 1510-1519 (2012).
61. Egaas, B., Courchesne, E. & Saitoh, O. Reduced size of corpus callosum in autism. *Archives of neurology* **52**, 794-801 (1995).
62. Frazier, T.W. & Hardan, A.Y. A meta-analysis of the corpus callosum in autism. *Biological psychiatry* **66**, 935-941 (2009).
63. Christmas, A.J. & Maxwell, D.R. A Comparison of Effects of Some Benzodiazepines and Other Drugs on Aggressive and Exploratory Behaviour in Mice and Rats. *Neuropharmacology* **9**, 17-+ (1970).
64. Holmes, A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav R* **25**, 261-273 (2001).
65. Prut, L. & Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology* **463**, 3-33 (2003).
66. Daecon, M. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp* **e2609** (2013).
67. Meyer, O., Hugh, A., Tison, A., Weldon, C. & Riley, M. A Method for the Routine Assessment of Fore and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehavioral Toxicology* **1**, 233-236 (1979).
68. Scattoni, M.L., Ricceri, L. & Crawley, J.N. Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+tf/J mice during three types of social encounters. *Genes Brain Behav* **10**, 44-56 (2011).
69. Winslow, J.T. Mouse social recognition and preference. *Current protocols in neuroscience* **Chapter 8**, Unit 8 16 (2003).

70. Mines, M.A., Yuskaitis, C.J., King, M.K., Beurel, E. & Jope, R.S. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS one* **5**, e9706 (2010).
71. Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C. & Crawley, J.N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 490-502 (2010).
72. Godin, J., *et al.* Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* **27**, 392-406 (2010).
73. Rousseau, L., *et al.* In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. *PLoS one* **7**, e37194 (2012).
74. Gauthier, L.R., *et al.* Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**, 629-640 (2012).

## **Legends to Figure**

### **Figure 1: Apoptosis and chromosome instability in *Xlf*<sup>-/-</sup> mouse brain.**

#### **a/ Spontaneous apoptosis in the embryonic dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice**

The bar graph shows the mean number of cleaved caspase 3-positive cells  $\pm$  s.e.m detected per cortical slice in the different layers of the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* mouse embryos from E11.5 to E15.5 (See supplementary Fig1). VZ: ventricular zone (red); SVZ: subventricular zone (white), IZ: intermediate zone (blue); CP: cortical plate (grey); n: number of embryos that were obtained from at least two different litters. Stars inside the bars indicate the statistical significance between the mean number of apoptotic cells found in a *Xlf*<sup>-/-</sup> cortical layer and in the *wt* control. Stars just above the bars indicate the statistical significance between the total number of apoptotic cells found in *Xlf*<sup>-/-</sup> dorsal telencephalon and that found in the *wt* controls. \* $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , Mann-Whitney Test.

#### **b/ Spontaneous apoptosis in *Xlf*<sup>-/-</sup> postnatal mouse brains**

Scatter plots show the mean numbers per coronal slice of cleaved caspase 3-positive cells + s.e.m. found in different regions of the *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> brain at postnatal day 0. Subventricular zone (SVZ), corpus callosum (CC), cortex (C) and striatum (Str). n: number animals (left and right hemispheres analyzed separately except for CC). \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , Mann-Whitney Test.

#### **c/ Spontaneous apoptosis of proliferating cells in *Xlf*<sup>-/-</sup> E11.5 brains**

Up: Experimental scheme: pregnant mice (E11.5) were intraperitoneally injected with EdU and with BrdU 1.5 hour later. They were then sacrificed after one last hour. EdU and/or BrdU staining of apoptotic cells (cleaved caspase3-positive cells) was then analyzed in cortical slices as previously described<sup>34, 35</sup> (see Supplementary figure 1). Down: The donut chart shows the percentages  $\pm$  s.d. of cleaved-caspase 3-positive cells with a EdU(-)BrdU(-) nucleus (cells in G1 or G0, in blue), with a EdU(-)BrdU(+) nucleus (cells in early S, in red), with a EdU(+)BrdU(+) nucleus (cells in late S, in orange) or with a EdU(+)BrdU(-) nucleus (cells in G2, in green) found in the dorsal telecephalon. Data were obtained from 4 embryos from 2 different litters.

#### **d/ High radiosensitivity of neural cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos at E14.5**

The mean number + s.e.m. of apoptotic cells (cleaved-caspase 3 staining) per coronal slice were quantified in the dorsal telencephalon *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos 4 hours after *in utero* exposure to

low dose of ionizing radiation (0Gy, 10mGy, 50mGy or 100mGy). n: number of embryos from at least two different litters. \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mann-Whitney Test.

### **e/ Chromosome instability in neural progenitors NSPC in the developing *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryonic brains**

Pregnant mice were sacrificed at different days of gestation. Metaphases spreads were collected from the dorsal telencephalons of the embryos and analyzed for chromosome aberrations by Dapi and telomere staining by TeloFISH. Bar graph shows the number of chromatid-type (*ie.* Chromatid breaks) aberrations and chromosome-type (*ie.* chromosome breaks) aberrations per 100 metaphases from *wt* (blue) and *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) embryonic brains. On the right, example of chromosome aberrations (Dapi in blue level and telomeres in red): a chromosome break (up, CSB) and a chromatid break (down, CTB). Eighty metaphases from at least 4 embryos of two different litters were analyzed. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, Mann-Whitney.

### **Figure 2: Premature neurogenesis in the *Xlf*<sup>-/-</sup> embryonic brain**

#### **a/ Reduced number of mitotic RGC in *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos**

Up: Phospho-Histone H3 immunostaining of apical mitoses (RGC) at the ventricular surface of the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos at E13.5. Down: numbers of apical mitoses in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos from E11.5 to E15.5. The number of embryos analyzed are given inside the bars. \*p<0.05, \*\*p<0.01, Mann-Whitney Test.

#### **b/ Decrease of spindle angles in *Xlf*<sup>-/-</sup> RGC**

On the left, method of measurement of spindle angles in RGC. Cleavage plane (white line) is deduced from the orientation of the sister chromatids (white lines) and the ventricle edge (dashed red line). The smallest angle between the cleavage plane and the ventricle edge is then calculated. Scale bar, 5µm. V: ventricle.

On the right, quantification of mitotic spindles angles in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> RGC at different developmental stages. The number of mitoses analyzed (n) are indicated inside the bars. They were obtained from at least 3 to 5 embryos. \*p<0.05; \*\*p<0.01, Mann-Whitney test.

#### **c/ Early decrease in RGC expansion results in a decreased production of neurons.**

Mean number ± s.e.m. of RGC (Pax6<sup>+</sup>/Tbr2<sup>-</sup>), newborn IPC (Pax6<sup>+</sup>/Tbr2<sup>+</sup>), mature IPC (Pax6<sup>-</sup>/Tbr2<sup>+</sup>) and newborn neurons (Tbr1<sup>+</sup>) in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos per coronal slice at different developmental stages. The numbers of embryos analyzed (identical for Pax6 and Tbr2 co-immunostainings) are indicated in the figure \*p<0.05; \*\*p<0.01, Mann-Whitney test.

#### **d/ Electroporation of GFP vector in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos**

On the top left, experimental scheme showing the injection of early decrease in RGC expansion results in the end in a decreased production of neurons at later developmental stage. vector (green arrows and green needle) into the ventricle of embryonic mice at E13.5 and the orientation of the electrodes (-: anode; +: cathode) during electroporation.

On the bottom left, detection of GFP-expressing cells (green) in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> and unirradiated or irradiated (WT-IR) *wt* embryos 24h after the electroporation. Scale bar, 100µm. V: ventricle. The dash line delineates the ventricular edge of the dorsal telencephalon. On the right, the bar graph presents the mean maximum distance of migration from the ventricle edge (µm) of GFP<sup>+</sup> cells in *wt* (white), *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) and *wt*-IR (blue) embryos. n=6 embryos/group. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, Mann-Whitney test.

**e/ Immunodetection of Satb2 (green) and CTIP2(red) in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> and *wt* brain at PND 0.**

Nuclei are labelled with DAPI (grey level). The figure shows the regions of interest in the somatosensoriel (S) and medial (M) regions.

**f/ Decreased percentage of Satb2-expressing cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at PND 0.**

Data have been obtained in the somatosensoriel (S) and medial (M) from 7 *wt* mice and 6 *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. \*p<0.05, Mann-Whitney test.

**g/ Decreased percentage of Satb2-expressing cells in the dorsal telencephalon of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at PND 7.**

Data have been obtained in the somatosensoriel (S) and medial (M) from 6 mice per group. \*p<0.05, Mann-Whitney test.

**Figure 3: Structural alterations of the *Xlf*<sup>-/-</sup> adult brain revealed by MRI (5 months old)**

**a/ Reduction of the size corpus callosum in *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice**

On the left, different regions of interest defined on anatomical T<sub>2</sub>-weighted MRI: cortex (1), the corpus callosum (2) and the lateral ventricles (3). On the right, the volume of the cortex, the lateral ventricle and the corpus callosum are expressed as a percentage of the volume of the whole brain. n = 8 mice/group. Mean ± s.d. \*\*p<0.01, Student t test.

**b/ Alteration of the ADC<sub>0</sub> in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice**

On the left, representative anatomical MRI based of T<sub>2</sub>-weighted imaging and color-coded ADC<sub>0</sub> maps obtained from diffusion-weighted MRI analyses in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice.

On the right, the quantification of non-diffusion gaussian parameter  $ADC_0$  in several brain structures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. n=8 mice/group. Mean  $\pm$  s.d, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Student t test.

#### **c/ Alteration of the $ADC_0$ in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice**

On the left, representative anatomical MRI based to T2-weighted imaging and color-coded Kurtosis maps obtained from diffusion-weighted MRI (DWI) analyses in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice.

On the right, the quantification of non-diffusion gaussian parameter Kurtosis in the different regions of interest. n=8 mice/group. Mean  $\pm$  s.d, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , Student t test.

### **Figure 4: Behavioral impairment of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice**

#### **a/ Exploration abnormalities of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice in the Open-field (4 months old)**

Mean distance travelled  $\pm$  s.d. (on the left) and velocity  $\pm$  s.d.(on the right) by *Xlf*<sup>-/-</sup> mice and *wt* controls during the five-minute trial in the open-field were used as an index of ambulatory exploration. See Results and MM. n=29 mice/group. \*\*\* $p < 0.001$ , Student t test.

#### **b/ *Xlf*<sup>-/-</sup> mice behave inadequately in the context of social encounters**

Mean time  $\pm$  s.d. spent by *Xlf*<sup>-/-</sup> mice and *wt* controls in affiliative and non-affiliative interactions were measured in the social interaction test. Affiliative explorations were defined as sniffing the stimulus mice (nose + body + anogenital) of the non-affiliative explorations corresponded to rearing. n=29 mice/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Student t test.

#### **c/ The preference for social novelty is altered in *Xlf*<sup>-/-</sup> mice**

Exploration activity, sociability and preference for social novelty of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice were challenged in the three chamber sociability test (see text and MM). The bar graph on the left shows the distance travelled  $\pm$  s.d. during the habituation phase. The bar graph in the middle shows the times  $\pm$  s.d. the mice spent in contact with the wire cup containing the mouse1 (grey) or the one containing the object (white) during the sociability phase. Both *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice showed a preference for mouse 1. The bar graph on the right shows the times  $\pm$  s.d. the mice spent with the wire cup containing the mouse 1 (grey) or the one containing mouse 2 (green) during the social novelty phase. Contrary to *wt* mice, *Xlf*<sup>-/-</sup> mice show no preference for social novelty. n=29 mice/group. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , Student t test.



## **Supplementary Figure 1:**

### **a/ Spontaneous apoptosis in the developing brain of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice.**

Up: Coronal sections of cerebral hemisphere of E14.5 *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos stained with DAPI (gray) and cleaved-caspase-3 (red). Dash lines delineate the different cortical zones. VZ/SVZ: ventricular zone / subventricular zone; IZ: intermediate zone; CP: cortical plate. white arrows: cleaved-caspase 3-positive cells. Bottom: Enlargements of the white box areas. V, ventricle. Blood vessels are colored in orange.

### **b/ Increased apoptosis in the SVZ of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at post-natal day 0**

White arrows indicate cleaved-caspase-3-positive cells (red) in coronal slices from *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. V, ventricle. Blood vessels are colored in orange.

### **c/ Spontaneous apoptosis of proliferating cells.**

See text and Figure 1c. up: Coronal section of the cerebral hemisphere of an E11.5 *Xlf*<sup>-/-</sup> embryo stained with DAPI (gray), cleaved-caspase-3 (red), EdU (purple) and BrdU (green). Bottom: examples of the different types of co-stainings of apoptotic cells. V, ventricle.

## **Supplementary Fig. 2: The cortex thickness and the ventricular width of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice embryos remained smaller than that of *wt* embryos throughout the fetal development**

### **a/ Mean thickness of the dorsal telencephalon $\pm$ s.e.m. of developing *wt* (white) and *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) embryos at different developmental stages**

Cortex thickness  $\pm$  s.e.m. has been measured in the medial parts of the dorsal telencephalons. 3 slices have been analyzed per embryos. The number of embryos analyzed are indicated under the histogram. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney test.

### **b/ Mean ventricular width $\pm$ s.e.m of *wt* (white) and *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) embryos at different developmental stages**

On the top left, the schema shows the ventricular width that has been measured (green). Measures have been performed on 2 different coronal slices per embryos. The number of embryos analyzed are indicated under the histogram. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### **c/ Phospho-Histone H3 immunostaining (red) of mitotic RGC at the ventricular surface (white dot-line) in coronal slices of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos at E12.5.** V, ventricle.

### **d/ Co-immunostaining of Pax6/Tbr2 in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at E13.5**

### **e/ Immunostaining of Tbr1 in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at E15.5.**

White stars: blood vessels.

### **Supplementary Fig. 3: Electroporation of GFP vector in the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos**

The GFP-expression vector pEBVCAGeGFP-Bsd has been electroporated into the ventricles of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos at E14.5. Twelve hours after electroporation, *wt* embryos have been irradiated *in utero* (0.5 Gy, 0.8 Gy/min; *wt-IR*). The animals were sacrificed at 24 hours after electroporation. On the left, detection of GFP-positive cells in coronal slices of the dorsal telencephalon of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos and *wt-IR* embryos.

Fluorescence intensity of GFP<sup>+</sup> cells (green) was measured in two regions of interest with a width of 186  $\mu$ m that were defined in coronal slices of the dorsal telencephalon: ROI-1 containing the VZ and SVZ (white boxes: areas within 100  $\mu$ m from the ventricles with a width of 186  $\mu$ m) and ROI-2 (yellow boxes: 100  $\mu$ m from the ventricles edge to 300  $\mu$ m) containing the IZ and CP. Scale bar: 100 $\mu$ m.

The histogram shows the mean ratio  $\pm$  s.e.m. of the GFP intensity measured in the SVZ-IZ versus that measured in the VZ and SVZ. Data have been obtained from 6 embryos from different litters per group. \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, Mann-Whitney test.

### **Supplementary Fig. 4**

#### **a/ Decreased percentage of cells expressing Tbr1 in the deeper cortical layer (Layer VI) at PND 0 but not at PND7 in *Xlf*<sup>-/-</sup> mice**

Left: Immunostaining of Tbr1 (red) in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at PND0. Nuclei are labelled with DAPI (white). S and M indicates the somatosensoriel (S) and medial (M) region of the dorsal telencephalon in which Tbr1<sup>+</sup> cells were quantified.

Right, Scatter plots showing the mean percentages of Tbr1-positive/DAPI nuclei  $\pm$  Ss.d. at PND0 and PND7 in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. Numbers of embryos analyzed are indicated. \**p*<0.05, Mann-Whitney test.

#### **b/ Decreased percentage of cells expressing Cux1 at PND 0, but not at PND7 in *Xlf*<sup>-/-</sup> mice**

Left: Immunostaining of Cux1 (red) in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice at PND0. Nuclei are labelled with DAPI (white). S and M indicates the somatosensoriel (S) and medial (M) region of the dorsal telencephalon in which Tbr1<sup>+</sup> cells were quantified.

Right, scatter plots showing the mean percentages of Cux1-positive DAPI nuclei  $\pm$  s.d. at PND0 and PND7 in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice. Numbers of embryos analyzed are indicated. \**p*<0.05, Mann-Whitney test.

**Supplementary Fig. 5: *Xlf* deficiency induces a microcephaly in adult mice (5 months old)**

**a/ Reduction of the whole brain volume in *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice.**

Quantitative analysis of whole brain volume from manual segmentation in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice by anatomical MRI based on T2-weighted imaging. n=8 mice/group. Mean ± s.d., \*\*\*p<0.001, Student t test

**b/ Representative anatomical MRI based to T2-weighted imaging (left) and color-coded sADC maps (right) obtained from diffusion-weighted MRI (DWI) analyses in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice.**

**c/ Alteration of sADC in the cortex and the corpus callosum in *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice**

Measurement of sADC in the cortex and the corpus callosum of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice (8 per group). Mean ± s.d., \*p<0.05; \*\*\*p<0.001, Student t test

**Supplementary Fig. 6: Behavioral tests in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice (4 months old)**

**a/ Anxiety levels of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice are similar in the Open-field**

Time ± s.d. spent in the center of the Open-field during a five-minute trial was used as an index of anxiety. n=29 mice/group. \*p<0.05, \*\*p<0.01, Student t test.

**b/ Reduced exploration activity of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice in the Open-field**

Time ± s.d. spent rearing was measured during the five-minute trial in the Open-field. n=29 mice/group. \*p<0.05; \*\*p<0.01, Student t test.

**c/ Normal motor skills of *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice in the horizontal bars test**

The test was performed as previously described<sup>66</sup>. The ability of mice to grip two round wooden bars (2 and 4 mm diameters respectively) was scored as followed: Falling between 1-5 sec = 1; Falling between 6-10 sec = 2; Falling between 11-20 sec = 3; Falling between 21-30 sec = 4; Falling after 30 sec = 5. Scores obtained at each bar were then summed to get a final score for each individual. Mean score ± s.d. *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice are shown in the histogram (20 mice/group).

**d/ Normal motor skills of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice in the grip strength test**

The test was performed as previously described<sup>67</sup>. The mice were placed on a grid, which was then turned upside down. The time the mice remained attached to the grid before falling was then recorded. Mean latency (s) ± s.d. to fall down of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> adult mice (20 mice/group) are shown in the histogram.

**e/ *Xlf*<sup>-/-</sup> mice spent more time in body sniffing during the social interaction test**

Left, mean time  $\pm$  s.d. spent in body sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in body sniffing by *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, Student t test.

**f/ Similar times spent in nose sniffing by *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mice during the social interaction test**

Left, mean time  $\pm$  s.d. spent in nose sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in nose sniffing by *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, Student t test.

**h/ Decreased time spent in anogenital sniffing by *Xlf*<sup>-/-</sup> mice during the first minute of the social interaction test**

Left, mean time  $\pm$  s.d. spent in anogenital sniffing during the five-minute trial.

Right, minute-by-minute analyses of the time spent in anogenital by *Xlf*<sup>-/-</sup> (red) and *wt* (black) mice. n=29 mice/group. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, Student t test.

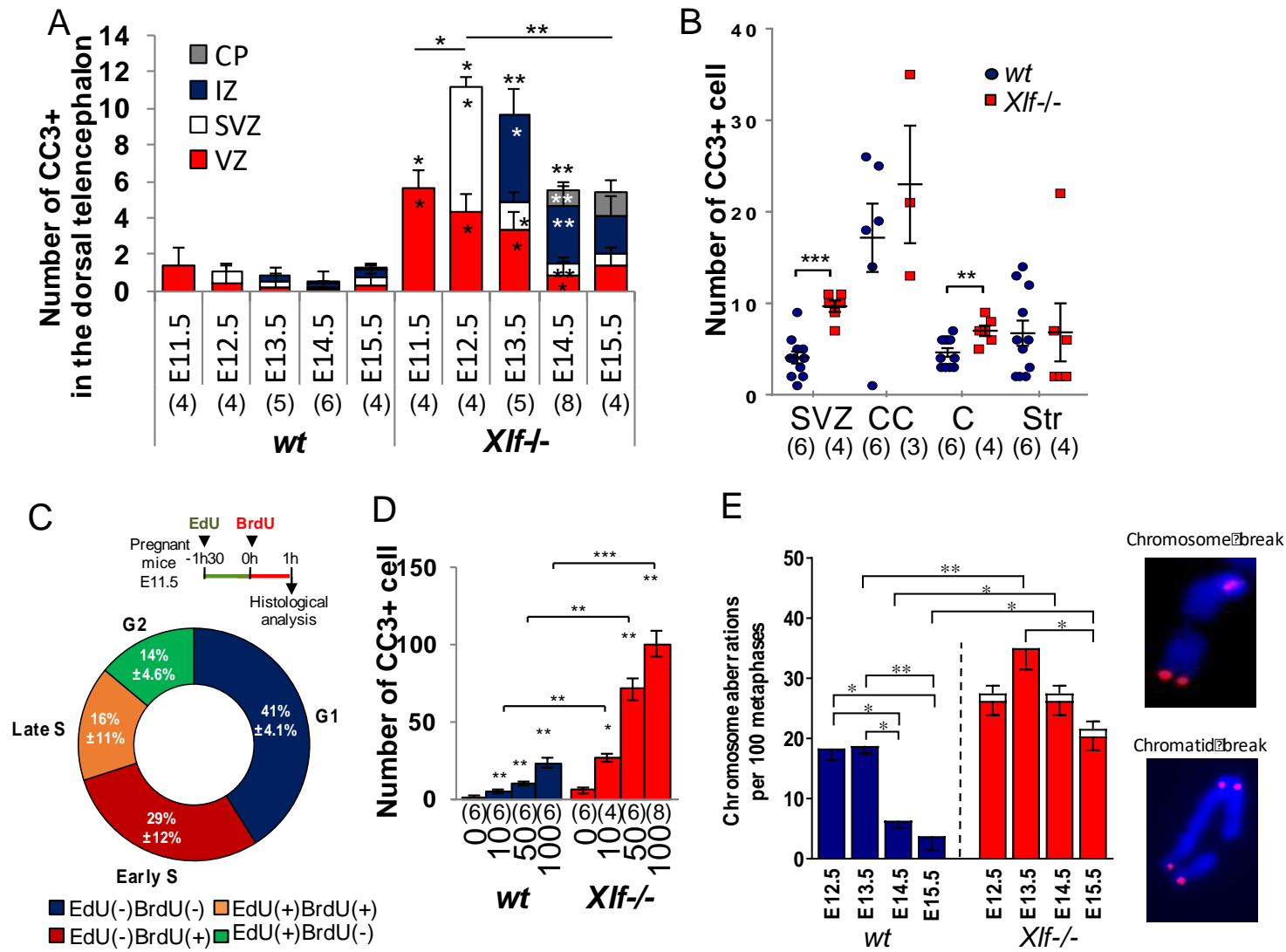


Fig. 1

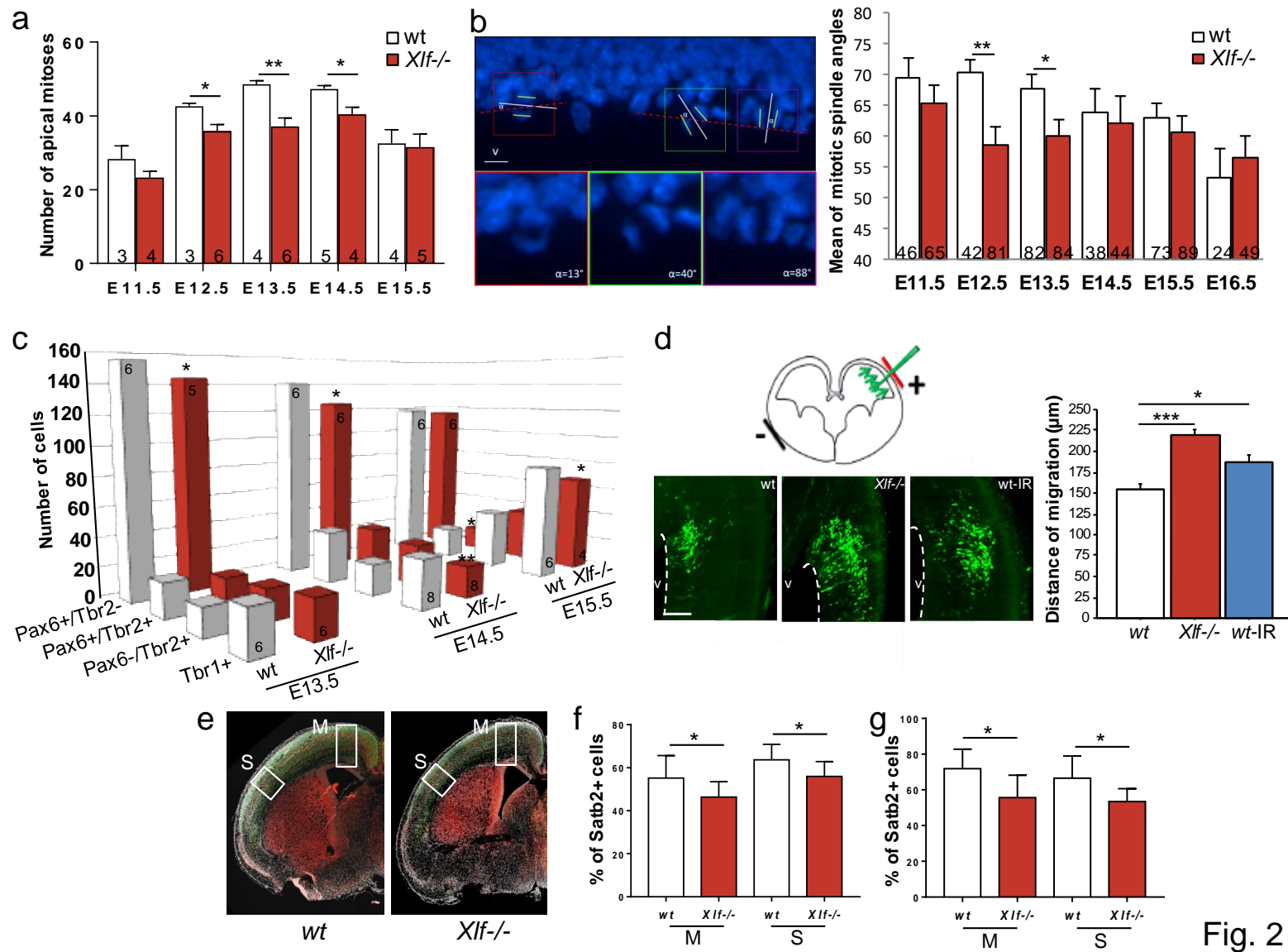


Fig. 2

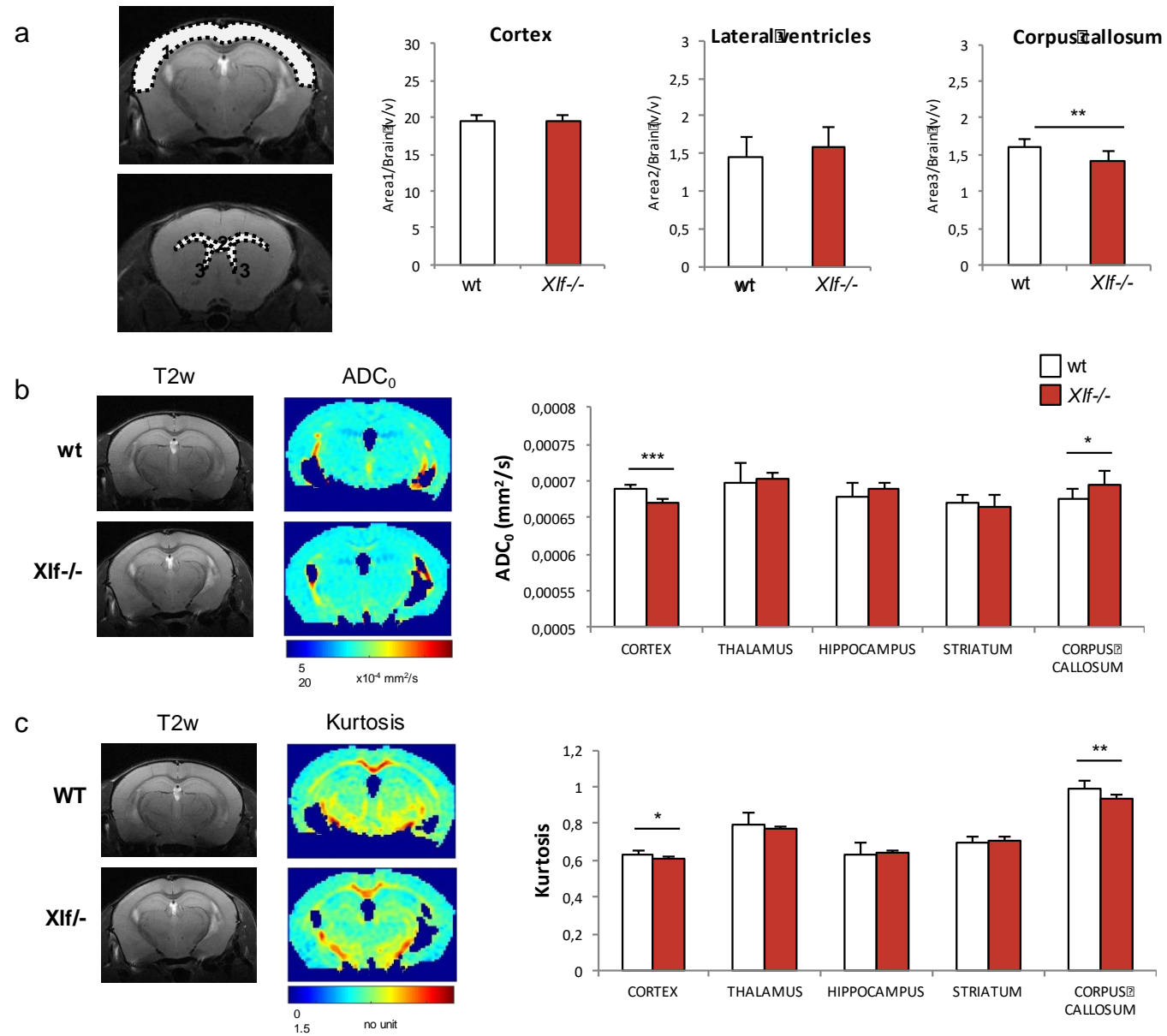


Fig. 3

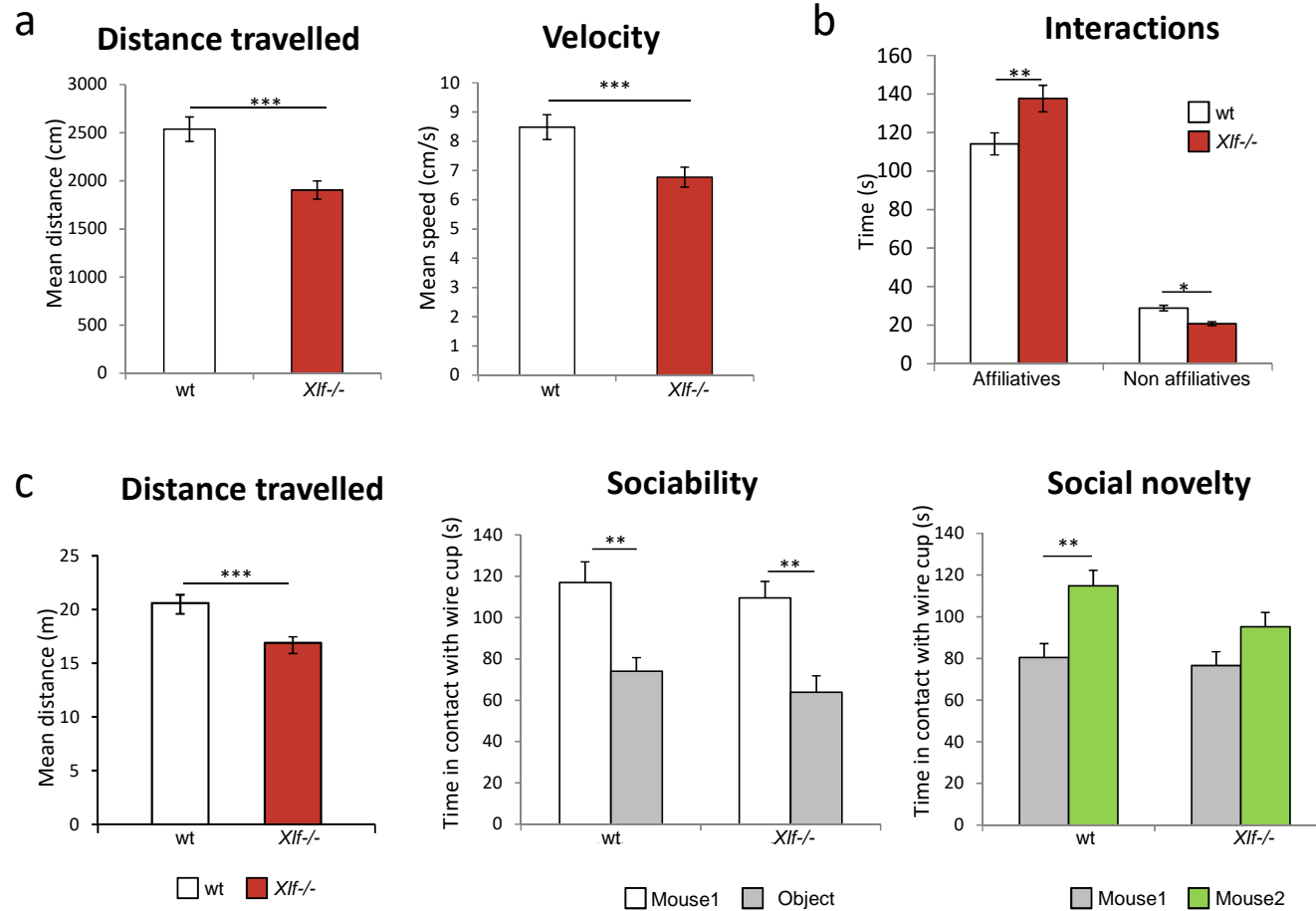
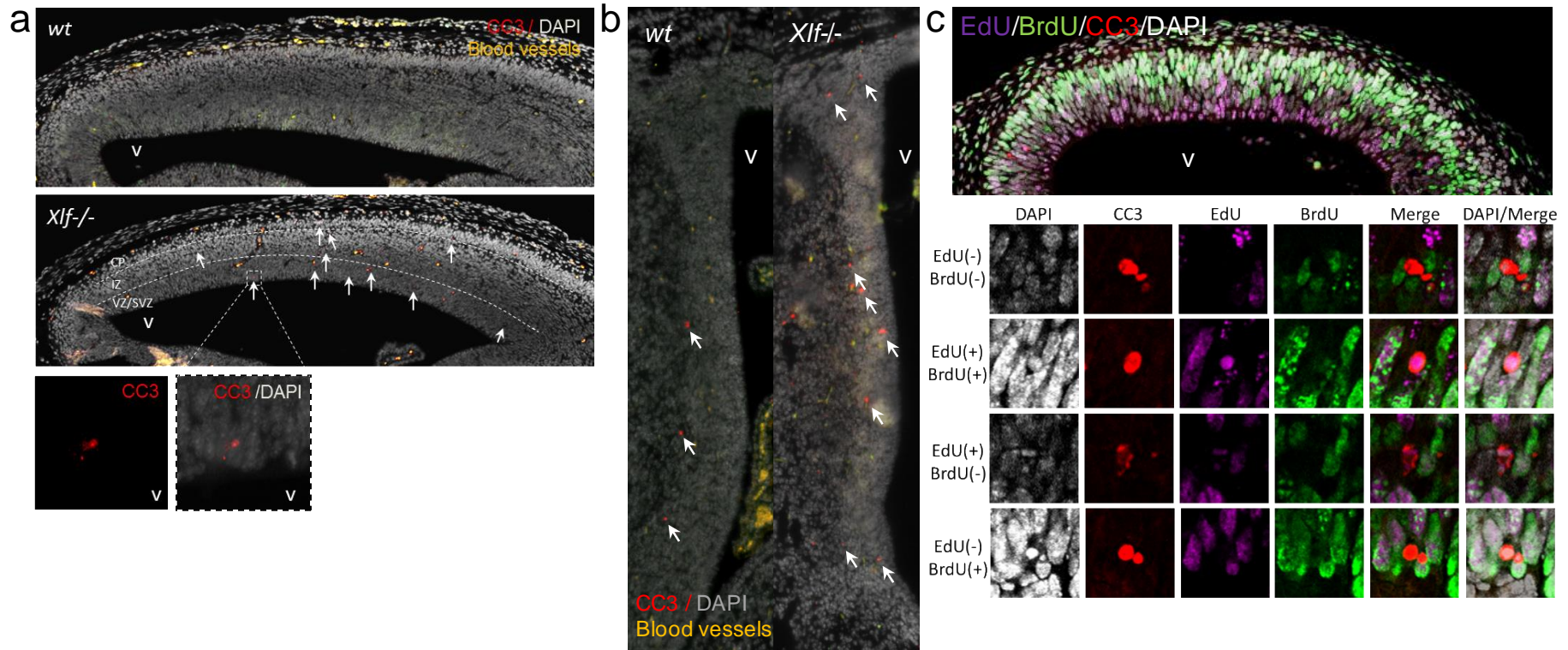
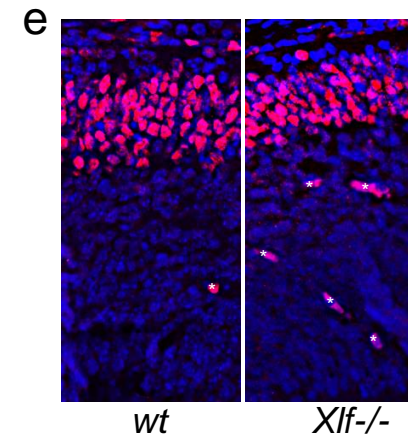
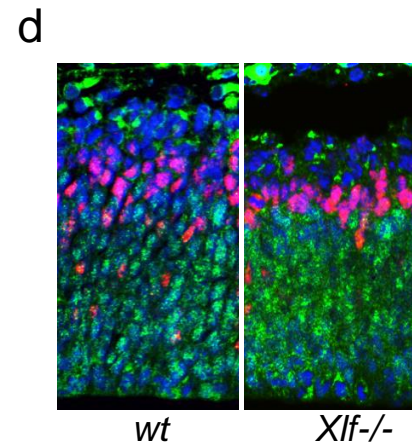
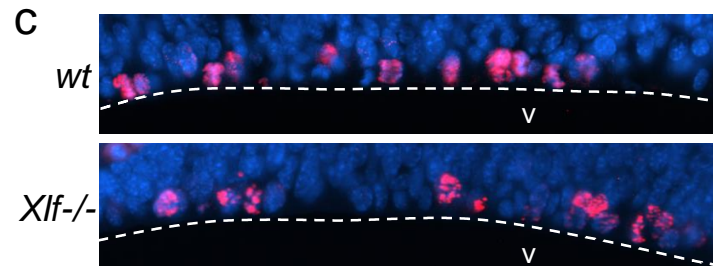
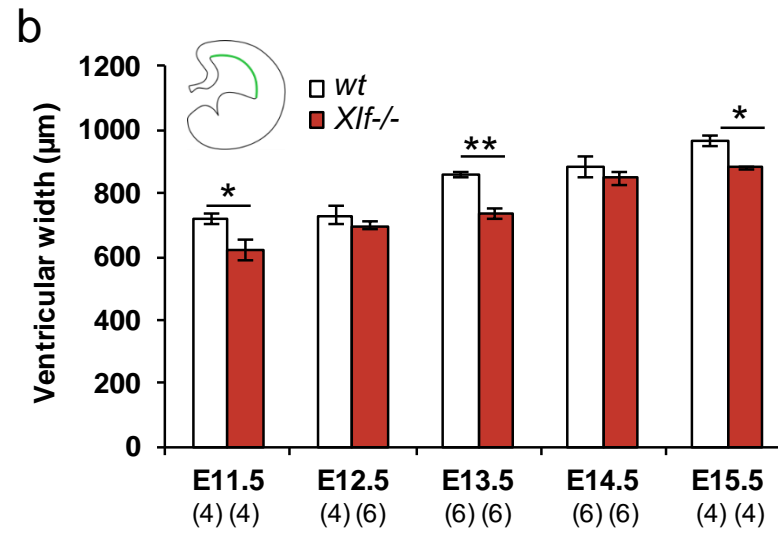
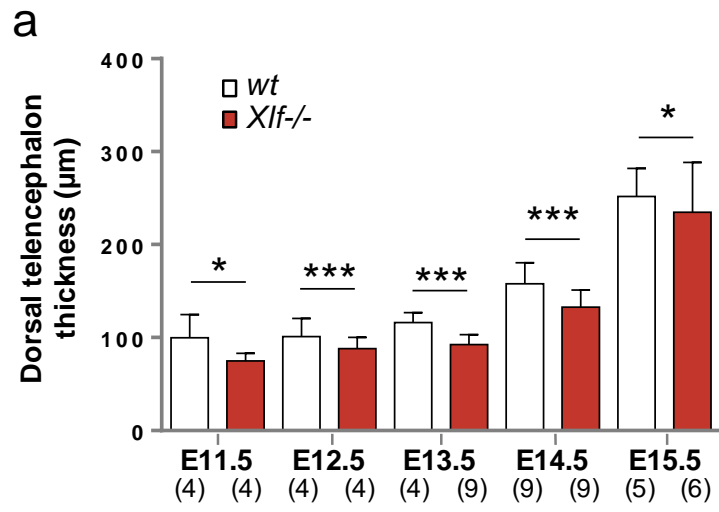


Fig. 4

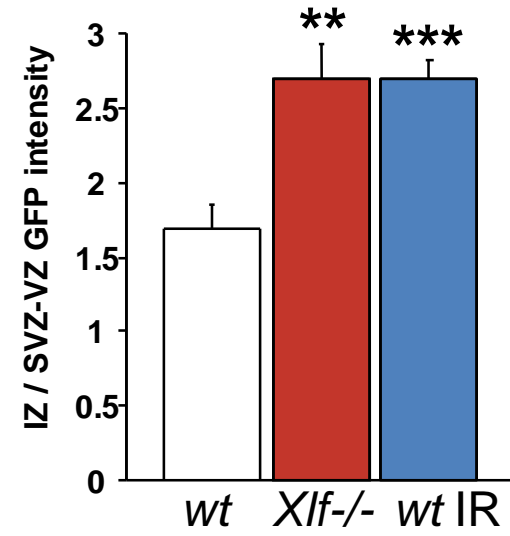
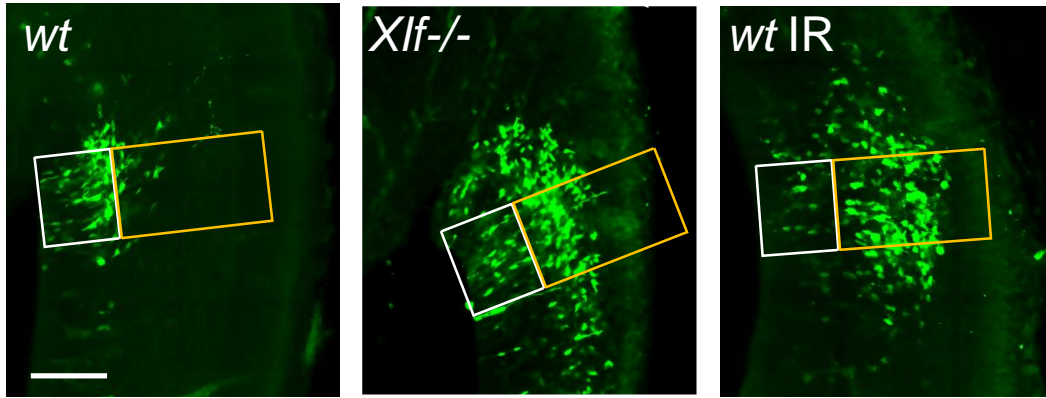




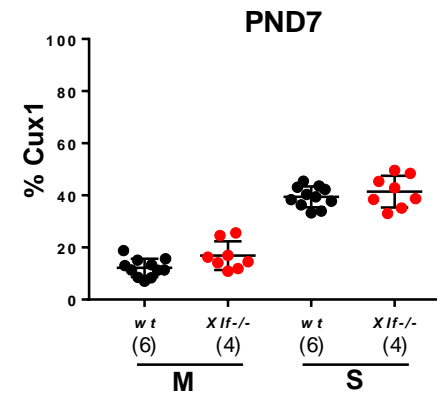
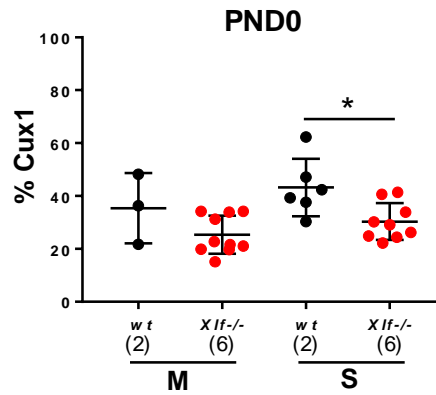
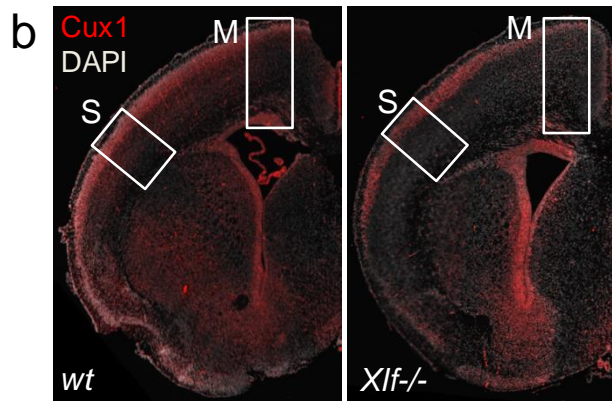
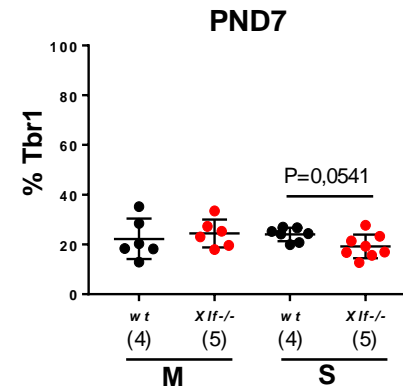
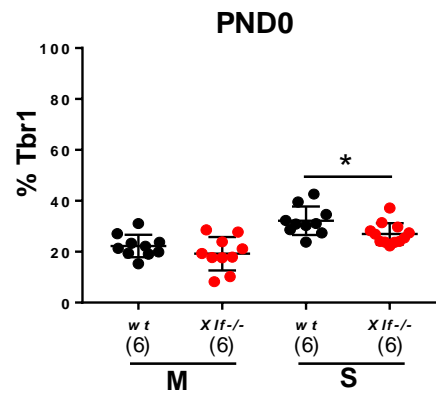
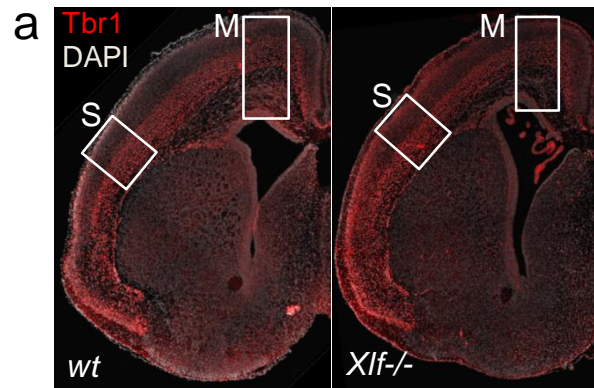
Supplementary Fig. 1



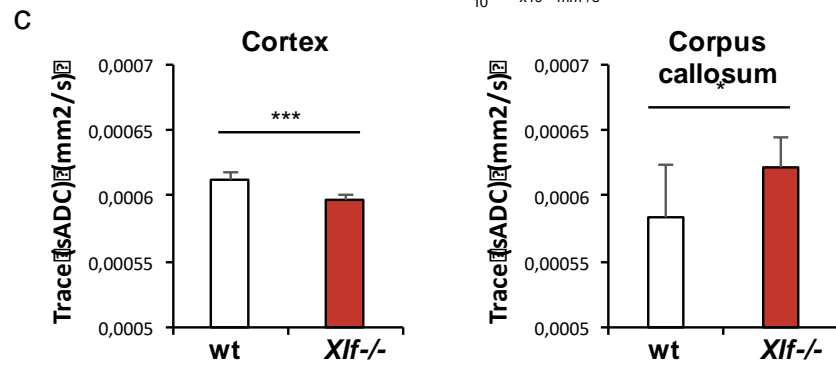
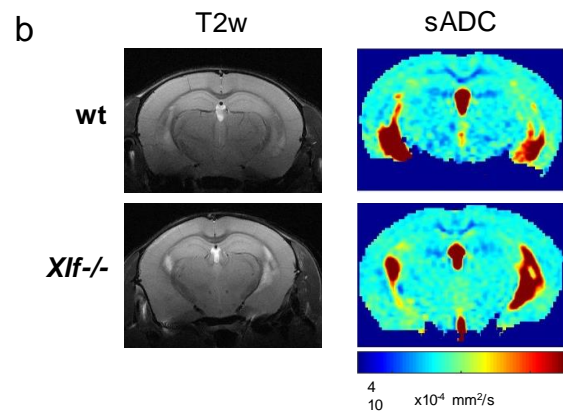
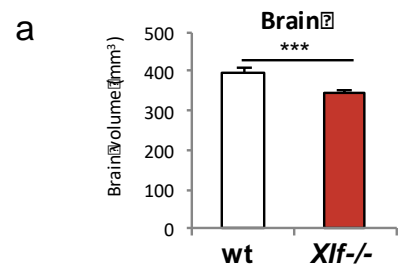
Supplementary Fig. 2



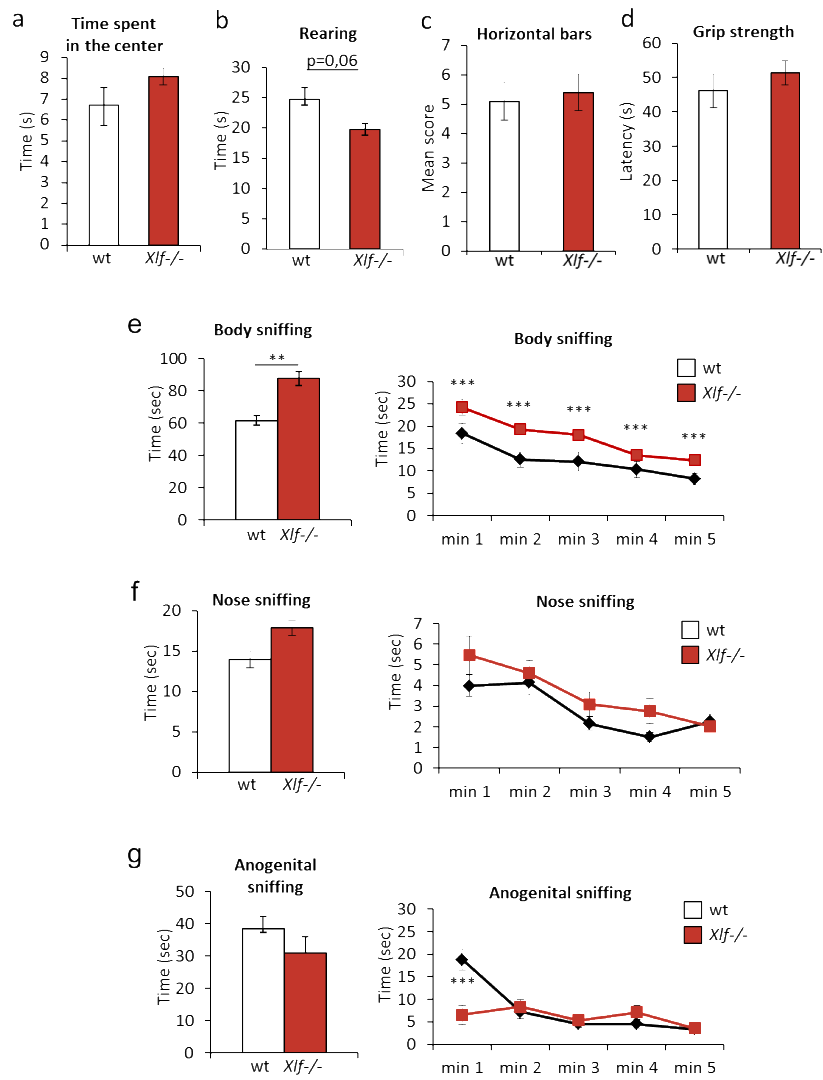
Supplementary Fig. 3



Supplementary Fig. 4



Supplementary Fig. 5



Supplementary Fig. 6

### **3.1.4 Discussion article 1 : Caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris déficientes pour XLF**

Dans cet article, nous avons révélé une instabilité chromosomique dans les CSPN du cerveau embryonnaire, qui est plus marquée au cours des premiers stades du développement. Cette instabilité est plus élevée dans les CSPN embryonnaires de souris *Xlf*<sup>-/-</sup>, provoquant une neurogenèse prématurée, qui serait responsable des atteintes neurocognitives observées chez la souris *Xlf*<sup>-/-</sup> adulte.

#### **L'instabilité génétique dans les CSPN au cours du développement pourrait être à l'origine de la diversité neuronale**

Le génome est naturellement sujet à des dommages dans le contexte de divers processus cellulaires, comme la réplication et la transcription de l'ADN. Un défaut de réparation de l'ADN affecte particulièrement le cerveau. Cela est clairement illustré par les atteintes neurologiques graves, dues à des syndromes héréditaires caractérisés par une déficience des systèmes de réparation de l'ADN (McKinon et coll., 2017). La façon dont les altérations génomiques se forment et la façon dont les cellules neuronales réparent les dommages à l'ADN reste une question fondamentale pour la compréhension de la physiopathologie du cerveau.

Nous savons maintenant que certains des mécanismes responsables de la formation de ces altérations génomiques jouent un rôle dans la génération de la diversité informationnelle, à l'exemple du système de recombinaison V(D)J permettant de générer une grande diversité de récepteurs d'antigènes au niveau des lymphocytes T (Tonegawa, 1988). Récemment, plusieurs clusters récurrents de CDB ont été identifiés dans des CSPN, au niveau de gènes longs et tardivement répliqués qui sont impliqués dans des pathologies neuropsychiatriques (Wei et coll., 2016 et 2018). Wei et ses collègues suggèrent qu'un mécanisme de recombinaison entre ces clusters serait à l'origine de la diversité neuronale (Wei et coll., 2016 et 2018 ; Alt et coll., 2018). En accord avec la littérature, nous avons mis en évidence une instabilité chromosomique au sein des CSPN, directement isolés du cerveau d'embryons de souris. Cette méthodologie constitue l'une des forces de notre approche puisqu'elle permet de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques et ainsi éviter les biais induits par la culture cellulaire. Il convient

de noter que nous avons observé essentiellement des cassures chromatidiennes qui sont générées après réplication en fin de S et G2.

L'instabilité chromosomique dans les CSPN est plus importante lors des premiers stades du développement du cerveau murin (E11,5 et E12,5). Cette période coïncide avec la phase d'expansion des cellules de la glie radiaire (Taverna et coll., 2014 ; Postiglione et Hippenmeyer, 2014) qui est suivie par une période de différenciation neurogénique. Les clusters de CDB décrit par Wei et ses collègues ont été identifiés à l'aide d'une technique de séquençage haut débit permettant la détection de translocations à l'échelle du génome (HTGTS) dans des CSPN du cerveau murin post natal (PN8-14). Il serait donc intéressant d'appliquer cette technique aux CSPN embryonnaires afin de vérifier leur formation au stade embryonnaire et d'évaluer leur fréquence en fonction du stade du développement.

### **Les altérations neurologiques des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> sont-elles liées à une différenciation prématurée des progéniteurs neuraux ?**

Pendant les premiers stades de la neurogenèse, les progéniteurs neuraux prolifèrent puis se différencient de façon finement régulée afin de générer le grand nombre de neurones présents dans le cerveau. Cela exige un maintien strict de leur intégrité génétique ce qui explique l'importance des voies de réparation de l'ADN dans le développement du cerveau (Abugable et coll., 2019 ; Barzilai et coll., 2008 ; McKinnon et coll., 2017). Conformément au rôle essentiel de la voie NHEJ durant les premiers stades de la neurogenèse (Gao et coll., 1998) nous avons mis en évidence plusieurs altérations neurologiques chez les souris déficientes pour XLF.

Des études réalisées sur des modèles de souris déficientes pour XLF ont montré une augmentation de l'instabilité chromosomique dans les fibroblastes et les cellules souches embryonnaires (Zha et coll., 2011, Oksenysh et coll., 2012). En accord avec ces données, nous avons montré une augmentation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. Il convient de noter que nous avons observé essentiellement des cassures chromatidiennes tandis que les études précédentes ont principalement décrit des cassures chromosomiques. Les défauts de réparation par NHEJ sont associés à la génération de plusieurs réarrangements chromosomiques (translocations), témoins d'une réparation infidèle des CDB (Sishc et Davis, 2017, Karanjawala et coll., 1999). Il serait donc intéressant d'évaluer



la fidélité de réparation des CDB dans les CSPN du cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> en réalisant des marquages Multi-Fish sur des métaphases *ex vivo*, permettant de détecter d'éventuels réarrangements chromosomiques (translocations) et de préciser leur localisation.

Nous avons mis en évidence des altérations structurelles du cerveau des souris adultes *Xlf*<sup>-/-</sup>, qui sont accompagnées de plusieurs anomalies comportementales. Nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'instabilité chromosomique des CSPN embryonnaires conduit à leur mort par apoptose et/ou à une neurogenèse prématurée, qui seraient responsables des atteintes neurocognitives.

#### Apoptose des progéniteurs neuraux dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>

Pendant le développement neural, divers processus cellulaires, tels que la prolifération, la neurogenèse, la migration et la synaptogenèse doivent être coordonnés afin d'aboutir à une structure et un fonctionnement approprié du système nerveux. Bien que la plupart de ces événements impliquent la prolifération des cellules nerveuses, une apoptose survient lors du développement et implique une perte substantielle de cellules. Une des fonctions principales de l'apoptose dans le développement du cerveau est son rôle dans la régulation de la migration neuronale et l'établissement de circuits neuronaux fonctionnels (Buss et Oppenheim, 2004 ; Buss et coll., 2006). L'apoptose survient également pendant les stades précoces de la neurogenèse au sein des progéniteurs neuraux, ce qui a un impact important sur le développement cérébral (Blaschke et coll., 1996 ; Yeo et Gautier, 2004). Les données sur cette phase précoce de la mort des cellules neuronales proviennent essentiellement de l'étude de modèles murins défectueux pour la réparation de l'ADN. En effet, les modèles murins déficients pour HR ou NHEJ manifestent une apoptose massive dans le système nerveux en développement, entraînant parfois une létalité embryonnaire (Orii et coll., 2006 ; Gao et coll., 1998).

Nous avons montré une augmentation de l'apoptose au cours du développement embryonnaire du cerveau des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. Contrairement à l'apoptose décrite en cas de déficience de XRCC4 et ligase IV, affectant essentiellement les neurones post-mitotiques (Gao et coll., 1998 ; Orii et coll., 2006 ; Gatz et coll., 2011), l'apoptose associée à la déficience d'XLF est légère et touche en premier lieu les progéniteurs neuraux, puis les neurones post-mitotiques. Ainsi, nos résultats démontrent la perte de progéniteurs neuraux dans le cerveau embryonnaire

des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> par apoptose, conduisant à la réduction de leur pool, qui serait en partie responsable de la réduction de l'épaisseur du cortex détectée en fin de développement.

### Neurogenèse prématurée dans les souris *Xlf*<sup>-/-</sup>

La neurogenèse nécessite une coordination précise entre la prolifération cellulaire, la mort et la différenciation. Lorsqu'elles sont confrontées à une instabilité génétique, les cellules activent une réponse aux dommages à l'ADN conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, une réparation des dommages ou bien une élimination des cellules endommagées par apoptose. Cependant, des études sur des cellules souches suggèrent qu'une instabilité génétique peut également conduire à une différenciation cellulaire, afin d'éviter l'amplification de cellules souches dont le génome est altéré (Sherman et coll., 2011). En effet, il a été rapporté qu'en cas d'aneuploïdie, les CSPN de drosophile entrent en différenciation prématurée afin d'éviter la prolifération et l'expansion des cellules aneuploïdes (Gogendeau et coll., 2015). La neurogenèse prématurée a été également décrite chez les progéniteurs neuraux de souris, qui entrent en différenciation prématurée suite à des anomalies centromériques, mais seulement après inhibition de l'apoptose (Marthiens et coll., 2013), cela confirme le rôle de la différenciation prématurée comme une alternative pour les cellules présentant une instabilité génétique.

A l'aide de plusieurs approches, nous avons montré un changement du destin des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>, en passant très tôt dans le développement d'un mode de division symétrique permettant leur amplification vers un mode de division asymétrique permettant leur différenciation. Par conséquent, nos résultats démontrent que l'instabilité chromosomique élevée dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> a provoqué leur différenciation prématurée. La diminution précoce de l'amplification des CSPN entraîne par la suite une diminution de la production de neurones matures, conduisant au rétrécissement du cortex cérébral observé chez les souris *Xlf*<sup>-/-</sup>.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre la durée du cycle cellulaire et la balance entre la prolifération et la différenciation des cellules souches. Par exemple, les cellules souches embryonnaires présentent un cycle cellulaire plus court que celui de leurs cellules filles différenciées (Beckers et coll., 2006, Coronado et coll., 2012). Dans les progéniteurs neuraux, il a été démontré qu'un allongement de la phase G1 était suffisant pour favoriser leur

différenciation (Calegari et coll., 2005 ; Arai et coll., 2011). Afin de donner une autre démonstration de l'implication de la neurogenèse prématurée dans les altérations cérébrales des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>, il serait intéressant de comparer la durée du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> avec celle des souris sauvages *wt*.

**3.2 Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF *in vitro*, en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique**

**ARTICLE 2**

**Higher chromosome stability in mouse embryonic neural stem and progenitor cells than in fibroblasts in response to acute or chronic genotoxic stress**

**Sofiane Mokrani**, Christine Granotier-Beckers, Olivier Etienne, Thierry Kortulewski, Christian Grisolia, Jean-Pierre de Villartay, François D. Boussin

**En cours de soumission**

### **3.2.1 Résultats : Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF *in vitro*, en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique**

Une exposition prénatale aux radiations ionisantes est associée au développement de plusieurs pathologies neurodéveloppementales (Otake et Schull, 1998), liées aux dommages de l'ADN radio-induits dans les CSPN (Nowak et coll., 2006 ; Roque et coll., 2012 ; Rousseau et coll., 2012). D'autre part, il a été démontré que les cellules souches sont dotées d'une réponse robuste aux dommages à l'ADN, leur permettant de maintenir leur intégrité génétique plus efficacement que les autres cellules somatiques non-souches (Maynard et coll., 2008 ; Mandal et coll., 2011 ; Insinga et coll., 2014). Les données actuellement disponibles proviennent essentiellement de l'étude des cellules souches embryonnaires et des cellules souches hématopoïétiques. Cependant peu d'études ont caractérisé la spécificité de réponse aux dommages à l'ADN des cellules souches neurales.

Dans cet article, nous avons utilisé une approche de cytogénétique moléculaire (Telo-FISH et Multi-FISH) afin de comparer la stabilité chromosomique des CSPN et des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) après une exposition à un stress radiatif aigu ou chronique. Etant donné que les MEF sont des cellules différenciées toujours en prolifération, cela nous a permis de détecter une éventuelle spécificité de réponse dans les CSPN liée à leur état souche. Nous avons également caractérisé l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF déficients pour XLF afin de comparer l'importance du mécanisme NHEJ dans le maintien de leur stabilité génétique.

Les CSPN et les MEF sont isolés à partir d'embryons de souris à E14,5 et cultivés dans des conditions leur permettant de proliférer à un niveau similaire (approximativement un doublement de population par 24h). Les CSPN ont été spécifiquement cultivés en présence de facteurs de croissance (EGF+FGF) afin de maintenir leur caractère souche.

#### **A. Réponse à un stress génotoxique aigu : irradiation $\gamma$**

Premièrement, nous avons comparé la réponse des CSPN et des MEF à une irradiation- $\gamma$ . Nous avons ainsi démontré :

- 24h après l'irradiation :

Une induction dose-dépendante de l'apoptose radio-induite dans les CSPN, mais pas dans les MEF. Parallèlement, les CSPN présentent moins d'aberrations chromosomiques que les MEF, ce qui suggère le rôle de l'apoptose dans le maintien de la stabilité chromosomique des CSPN, en éliminant les cellules les plus endommagées. En revanche, malgré la forte apoptose radio-induite dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup>, leur niveau d'aberrations chromosomiques est plus élevé que celui des CSPN *wt*, indiquant que le maintien de la stabilité génétique dans les cultures de CSPN n'est pas uniquement lié à l'apoptose, mais associé en partie au mécanisme NHEJ.

- 3h après l'irradiation :

A ce stade, l'apoptose n'est pas encore activée et on constate une diminution dose-dépendante de l'index métaphasique, similaire dans les CSPN et les MEF. L'index métaphasique représente le pourcentage de cellules en métaphase parmi l'ensemble des cellules vivantes. Ainsi, l'activation du point de contrôle G2/M semble identique dans les deux types cellulaires. Dans ces conditions, Les CSPN *wt* présentent moins d'aberrations chromosomiques que les MEF *wt*. Ces aberrations sont essentiellement des cassures chromatidiennes, générées par les CDB induites après réplication, pendant les phases S ou G2. Ces résultats suggèrent que les CSPN *wt* réparent mieux et plus rapidement les CDB que les MEF *wt*. En accord avec le rôle d'XLF dans la réparation des CDB, les cellules *Xlf*<sup>-/-</sup> présentent plus de cassures chromatidiennes que les cellules *wt* aussi bien dans les CSPN que dans les MEF. De façon intéressante, les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> présentent moins de cassures chromatidiennes que les MEF *Xlf*<sup>-/-</sup>, suggérant que la déficience d'XLF n'abolit pas la différence de réparation entre les CSPN et les MEF.

Il convient de noter que les cellules *Xlf*<sup>-/-</sup> montrent également une augmentation des cassures chromosomiques à la plus forte dose (1 Gy), qui sont générées par les CDB induites avant réplication. Or, le temps de cycle des deux types cellulaires fait que 3h après irradiation, les cellules n'auraient pas eu le temps d'entrer en métaphase en ayant été irradiées avant la réplication. La grande fréquence des cassures chromatidiennes indique qu'il pourrait en réalité s'agir de « fausses » cassures chromosomiques, dues à deux cassures chromatidiennes induites

au même niveau sur les chromatides sœurs du même chromosome, impossibles à différencier par la technique de Telo-FISH.

## **B. Réponse à un stress génotoxique chronique : incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN**

Afin de comparer la maintenance de la stabilité chromosomique des CSPN et des MEF en réponse à un stress génotoxique chronique, nous les avons cultivés en présence de thymidine tritiée ( $^3\text{H-T}$ ), dont les désintégrations radioactives sont connues pour induire des CSB et des CDB (Cleaver et coll., 1972 ; LeMotte et Little, 1984).

Premièrement, nous avons caractérisé l'instabilité chromosomique après 24h et 72h de contamination par la  $^3\text{H-T}$ , correspondant respectivement à un cycle ou au plus 3 cycles d'incorporation de  $^3\text{H-T}$ . A 24h, les CSPN et les MEF présentent exclusivement des cassures chromatidiennes, survenues après réplication, à savoir après l'incorporation de  $^3\text{H-T}$ . A 72h, contrairement au CSPN, les MEF présentent également une augmentation des cassures chromosomiques, indiquant une fois de plus la meilleure préservation de la stabilité chromosomique dans les CSPN.

Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'incorporation de la  $^3\text{H-T}$  dans l'ADN avec le temps, mise en évidence par autoradiographie cellulaire, n'est pas associée à une augmentation des cassures chromatidiennes, aussi bien dans les CSPN que dans les MEF et ce quel que soit le statut du gène *Xlf*. Cela suggère le développement d'une réponse adaptative à la  $^3\text{H-T}$  indépendante d'XLF.

Ensuite, nous avons montré que l'incorporation préalable de  $^3\text{H-T}$  dans l'ADN a permis de réduire significativement l'instabilité chromosomique induite par une irradiation- $\gamma$  ultérieure dans les CSPN mais pas dans les MEF. Cet effet est aboli par la déficience d'XLF. L'ensemble de ces résultats montrent que la réponse adaptative est plus efficace dans les CSPN que dans les MEF, due aux meilleures capacités des CSPN à réparer un grand nombre de CDB, qui nécessitent l'implication d'XLF.

Afin de mieux caractériser la capacité des CSPN et des MEF à maintenir leur stabilité chromosomique face à un stress génotoxique prolongé, nous les avons cultivés en présence de

$^3\text{H-T}$  pendant 7 jours. L'apoptose est induite de façon chronique à de faibles niveaux dans les CSPN *wt* et à des niveaux plus élevés dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup>, mais toujours pas dans les MEF. Quant à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, elle est légère et constante dans les CSPN *wt*, mais devient plus importante avec le temps dans les autres types cellulaires.

En ce qui concerne l'instabilité chromosomique, le niveau de cassures chromatidiennes dans les MEF reste constant durant les 5 premiers jours, puis augmente brusquement les jours suivants. Cela, est lié essentiellement à l'apparition d'une population de cellules fortement endommagées, contenant à la fois des aberrations chromatidiennes et chromosomiques. A l'inverse, la plupart des CSPN *wt* cyclants (plus de 80%) ne présentent aucune aberration chromosomique, contrairement aux CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> qui présentent un niveau élevé d'aberrations chromosomiques associé à la formation de plusieurs translocations, témoignant d'une réparation infidèle des CDB. Ces résultats révèlent qu'une induction chronique de dommages à l'ADN conduit à une perte progressive de la stabilité chromosomique des MEF, contrairement aux CSPN qui maintiennent leur intégrité génétique sur le long terme. La réponse des CSPN est liée à une réparation efficace des dommages à l'ADN leur permettant de développer une réponse adaptative à un stress génotoxique chronique. Cette dernière implique partiellement *Xlf* et agit conjointement avec les arrêts du cycle cellulaire et l'apoptose afin de préserver la stabilité de leur génome.

## **Conclusion**

Pris dans leur ensemble, nos résultats démontrent que les CSPN maintiennent leur intégrité génétique plus efficacement que les MEF en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique. Cela semble s'appuyer sur une réponse robuste aux dommages à l'ADN impliquant à la fois une meilleure réparation des CDB et une sensibilité accrue à l'apoptose radio-induite qui permet d'éviter l'accumulation de cellules instables. Ces résultats soulignent également l'importance d'*XLF* dans cette réponse au stress radiatif. Enfin, notre étude a clairement démontré que les CSPN embryonnaires empêchent la persistance de dommages à l'ADN, ce qui est en parfaite adéquation avec leur rôle essentiel pendant le développement du cerveau qui nécessite un maintien strict de leur stabilité génétique.



### **3.2.2 Higher Chromosome Stability in Mouse Embryonic Neural Stem and Progenitor Cells than in Fibroblasts in Response to Acute or Chronic Genotoxic Stress (ARTICLE 2)**

**Sofiane Mokrani<sup>\*1</sup>, Christine Granotier-Beckers<sup>\*†1</sup>, Olivier Etienne<sup>1</sup>, Thierry Kortulewski<sup>1</sup>, Christian Grisolia<sup>2</sup>, Jean-Pierre de Villartay<sup>3</sup>, François D. Boussin<sup>1†</sup>**

\* Contributed equally to this work

†: Corresponding author, email: [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr) or [christine.granotier@cea.fr](mailto:christine.granotier@cea.fr)

1: Laboratoire de RadioPathologie, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, U1274 Inserm, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, 18 route du Panorama 92265 Fontenay-aux Roses, France.

2: CEA, IRFM, 13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

3: Genome Dynamics in the Immune System Laboratory, Inserm, UMR 1163, Institut Imagine, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris-Cité, France

**Running Title: Chromosome Maintenance in Neural Stem and Progenitor cells in Response to Acute or Chronic Genotoxic Stress**

**Key words: neural stem and progenitor cells, mouse embryonic fibroblasts, chromosome stability, adaptive response, non-homologous end-joining, radiation**

## **Abstract**

High fidelity of genetic transmission in NSPCs has been long time considered to be crucial for brain development and homeostasis. However, recent studies have identified recurrent DSB clusters in dividing NSPCs, which may underlie the diversity of neuronal cell types. This raised the interest in understanding how NSPCs sense and repair DSBs and how this mechanism could be altered by environmental genotoxic stress caused by pollutants or ionizing radiation. Here, we show that embryonic mouse neural stem and progenitor cells (NSPCs) have significantly higher capacity than mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to maintain their chromosome stability in response to acute ( $\gamma$ -radiation) and chronic (tritiated thymidine - $^3\text{H-T}$ - incorporation into DNA) genotoxic stress. Cells deficient for XLF/Cernunnos, which is involved in non-homologous end joining DNA (NHEJ) repair, highlighted important variations in efficacy of DNA repair pathways between the two cell types. Strikingly, a progressive and generalized chromosome instability was observed in MEFs cultured with  $^3\text{H-T}$  at long-term, whereas NSPCs cultured in the same conditions, preserved their chromosome stability thanks to higher DNA repair activity further enhanced by an adaptive response and also to the elimination of damaged cells by apoptosis. This specific DNA damage response of NSPCs may rely on the necessity for preservation of their genome stability together with their possible function in creating neuronal genetic diversity.

## Introduction

Brain development is a tightly-regulated process, highly susceptible to DNA damaging agents, such as ionizing radiation. Several studies have reported that neural stem and progenitor cells (NSPC), which generate successively the main cells of the central nervous system, namely neurons, astrocytes and oligodendrocytes, are highly sensitive to radiation-induced DNA damage (Hoshino and Kameyama, 1988; Nowak et al., 2006).

Upon DNA damage, cells activate the DNA damage response (DDR), a network of signaling pathways that sense, signal and repair DNA lesions, promoting cell checkpoints that slow or halt cell-cycle progression of proliferating cells. This is supposed to allow more time for DNA repair and/or for the elimination of damaged cells by apoptosis (Jackson, 2002).

Stem cells are thought to have a very robust DDR, allowing them to repair and avoid accumulation and transmission to their progeny of DNA lesions, as well as to preserve their regenerative potential (Vitale et al., 2017 for review). Distinct features of the DDR of embryonic NSPC have thus been reported. In the developing mouse brain, these highly proliferating cells are highly prone to radiation-induced apoptosis (Gatz et al., 2011; Nowak et al., 2006; Semont et al., 2004; Verreet et al., 2016). They activate the intra-S and G2/M checkpoints (Etienne et al., 2012; Gatz et al., 2011; Roque et al., 2012), but they did not activate the G1/S checkpoint, which could contribute to restore the neural progenitor pool and resume the brain development more rapidly after genotoxic stress (Etienne et al., 2012; Roque et al., 2012).

Classical non-homologous end-joining (C-NHEJ) and homologous recombination (HR) are the two major repair pathways of DNA double-strand breaks (DSB), which are the most deleterious form of DNA damage induced by ionizing radiation, potentially leading to mutations and large chromosomal rearrangements. C-NHEJ functions all along the cell cycle, performing the direct religation of broken DNA ends, whereas HR requires long stretches of similar sequences and operates during post-replication phases (Her and Bunting, 2018).

NHEJ involves the Ku70/80 heterodimer (Ku) that binds to DNA ends and recruits the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) to form the DNA-PK holoenzyme. DNA-PK promotes synapsis of DNA ends, enhances appropriate end processing through activation of the Artemis endo/exo-nuclease and recruits the ligation complex made of X-ray cross-complementing protein 4 (XRCC4), DNA ligase IV (LigIV) and XRCC4-like factor (XLF, also known as Cernunnos or NHEJ1) (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006).

DSB also occur as intermediates in various biological events. NHEJ is thus an integral part of V(D)J recombination machinery, which generates a diverse antigenic repertoire during T and B cells development (Arya and Bassing, 2017 for review). Consequently, human mutations in Artemis, DNA-PKcs, LigIV and XLF not only cause increased cellular radiosensitivity consistently with the DNA repair defect, but also cause various extents of severe combined immunodeficiency (SCID) due to defective V(D)J recombination. In addition, mutations in LigIV and XLF are associated with microcephaly.

Several studies have demonstrated the importance of a functional NHEJ during brain development. XRCC4 and LigIV deficiency result in massive neuronal cell death leading to embryonic mouse lethality (Barnes et al., 1998; Frank et al., 1998; Gao et al., 1998). Recent studies have identified recurrent DSB clusters in dividing NSPC, which are frequently joined to each other, thus potentially leading to gene diversification in NSPC. NHEJ may have thus a role in neuronal physiology reminiscent to that it plays in the V(D)J recombination machinery (Alt and Schwer, 2018; Wei et al., 2016, 2018).

Contrary to *Xrcc4*<sup>-/-</sup> or *Lig4*<sup>-/-</sup> mice, *Xlf*<sup>-/-</sup> mice are viable with a slightly affected immune system (Li et al., 2008; Vera et al., 2013) and the brain of *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos only shows scarce apoptotic cells (Abramowski et al., 2018). The mild phenotype of *Xlf*<sup>-/-</sup> mice has been shown to rely on compensating pathways from the ATM-dependent DNA damage response (Zha et al., 2011), on overlapping functions between RAG2 and XLF in V(D)J recombination and the maintenance of genome stability (Lescale et al., 2016) and on redundant function with PAXX for DNA repair during mammalian brain development *in vivo* (Abramowski et al., 2018; Balmus et al., 2016; Liu et al., 2017). Nevertheless, as expected from NHEJ defect, *Xlf*<sup>-/-</sup> murine embryonic fibroblasts (MEF) show spontaneous cytogenetic abnormalities and are highly sensitive to ionizing radiation (Li et al., 2008) and to the radiomimetic drug phleomycin (Vera et al., 2013).

To gain insights on specific features of the DNA damage response of NSPC, here we compared the effects of acute ( $\gamma$ -radiation) and chronic (incorporation of tritiated thymidine — <sup>3</sup>H-T— into DNA) genotoxic stress on mouse embryonic NSPC and on proliferating non-stem cells, MEF, using molecular cytogenetic approaches. To further investigate the respective importance of DNA repair pathways for the two types of cells we compared cells isolated from *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> C57Bl/6 mouse embryos.



## Materials and Methods

### Primary cell cultures and treatments

Mouse embryonic NSPC were obtained from *wt* C57Bl/6N (Charles Rivers) and *Xlf*<sup>-/-</sup> deficient (Abramowski et al., 2018) mouse embryos at E14.5 days of gestation. Animals were humanely sacrificed according to European Communities Council Directive (2010/63/EU). Dorsal telencephalic cortices were dissected and then mechanically dissociated into single cells. NSPC were then cultured in NeuroCult™ Proliferation Medium (Stemcell Technologies Inc.) containing 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Millipore) at 37°C, in a controlled atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> according to the Technical Manual Version 2.1.0 (2016) to generate floating primary neurospheres. The free-floating primary neurospheres were seeded onto laminin (1 µg/cm<sup>2</sup>, Sigma)-coated flasks without dissociation in 5 mL of fresh medium in T-25 flasks. In these conditions, NSPC formed an adherent monolayer in an undifferentiated state. At each passage, cells were harvested by trypsinization and re-seeded (5\*10<sup>5</sup> cells /flask) in 5 mL of fresh medium.

MEF were harvested from the same animals as above and cultured according to the standard protocol (Saeed et al., 2012). Briefly, head and internal organs were removed and the remaining tissues were minced and digested with 0.05% trypsin/EDTA 1 mM (Gibco) for 10 min at 37°C. Cell suspension was filtered through 70 µm cell strainer (Falcon) and then plated in a T-75 flasks containing DMEM (Gibco) with 10 % fetal bovine serum (Gibco) and 1 % penicillin-streptomycin solution (Sigma) at 37°C, in a controlled atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. When MEF reached 80 % confluence, they were trypsinized and reseeded into T-25 flask (3\*10<sup>5</sup> cells/flask) with 5 mL of fresh medium.

Twenty-four hours after seeding, adherent NSPC and MEF were  $\gamma$ -irradiated using a <sup>137</sup>Cs source (GSR D1, Gamma Service Medical GmbH) at 0.2, 0.5 and 1 Gy with a dose rate of 0.8 Gy/min. <sup>3</sup>H-T incorporation was performed by adding [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (PerkinElmer, Specific Activity: 1.75 TBq/mmol) to the culture medium at the final concentrations of 0.185, 0.37, 0.74 or 1.85 KBq/mL.

### Apoptosis assay

Apoptosis induction was analyzed by assessing the caspases 3/7 activity using CellEvent™ Caspase 3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. Briefly, NSPC and MEF were cultured in 24 well Glass Bottom Plates (Greiner bio-one) at a density of 2\*10<sup>5</sup> cells per well. Cells were  $\gamma$ -irradiated or

contaminated by increasing concentrations of  $^3\text{H-T}$ . At the end of the experiments, each well was loaded with 10  $\mu\text{M}$  of CellEvent™ Caspase 3/7 Green Detection Reagent and Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma) for nuclear counterstaining. Cultures were incubated 30 min at 37°C, and then imaged under live fluorescence microscopy (NIKON). Image analysis was accomplished using NIS-Elements software.

### **Telo-FISH (Telomere-Fluorescent *In Situ* Hybridization)**

Cells were treated for two hours at 37 °C with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  colchicine (Sigma) added to the culture medium. They were then harvested with trypsin and re-suspended in hypotonic solution (37.5 mM KCl, 8.33% fetal calf serum) for 30 min at 37°C, cells were then fixed by acetic acid /ethanol (1V/3V) and kept at 4°C overnight. Metaphase chromosomes preparation was obtained by spreading the cells on cooled wet glass slide. After air drying, Telo-FISH staining was performed using a telomeric fluorescent PNA probe [Cy3-(CCCTAA)<sub>3</sub>; Applied Biosystems] as previously described (Pennarun 2008), chromosomes were counterstained using DAPI (Sigma, 1 $\mu\text{g/mL}$ ). Metaphases were imaged using Zeiss Axioplan2 microscope coupled with Metafer imaging software (MetaSystems). In each case, at least 50 metaphases per condition were analyzed. Polyploid metaphase are frequent in MEF cultures, the study was limited to metaphase with 4 n-chromosomes.

### **Multi-FISH (Multi-Fluorescent *In Situ* Hybridization)**

Metaphase spreads were prepared as for Telo-FISH experiments. Metaphases were hybridized with a 21XMouse probe kit (MetaSystems) according to the manufacturer's instructions. Images were captured using a Zeiss Axioplan2 microscope. In each case, at least 30 euploid metaphases (with 4 n chromosomes) were analyzed with M-FISH software (ISIS, MetaSystems).

### **Cellular autoradiography**

$^3\text{H-T}$  incorporation was detected by cellular autoradiography as previously described (Granotier et al., 2005). Briefly, slides were dipped into liquid photographic emulsion (NTB, Carestream), after drying in a humidified atmosphere, slides were stored at 4°C for an exposure time of 4 days. Slides were developed in Kodak D-19 (Kodak), and then stained with Mayer's hemalum (Merck). Metafer software enable to image the same metaphases analyzed for cytogenetic assay.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Significant differences between experimental groups were analyzed by Kruskal-Wallis test for multiple comparisons (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).



## Results

### Cell checkpoints activation and chromosome instability are associated with apoptosis in irradiated mouse NSPC, but not in irradiated MEF

To compare the DNA damage responses of NSPC and MEF, cells isolated from *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> mouse embryos (E14.5) were cultured in conditions allowing them to proliferate at similar rates whatever their *Xlf* status (*i.e.* approximately one population doubling per 24h, Fig 1A). In these conditions, the different cell types show a low basal chromosome instability (Fig 1B). However, consistently with the role of *Xlf* in DNA repair, *Xlf*-deficient cells showed higher chromosome instability compared to *wt* cells (Fig 1B) and importantly, both *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF exhibited a higher frequency of chromosome aberrations than their NSPC counterparts.

Freshly isolated cells were exposed to different doses of  $\gamma$ -radiation (0, 0.2, 0.5 or 1 Gy). We observed a dose-dependent increase of apoptosis at 24h post-irradiation (PI) only in cultures of NSPC (reaching  $17.8 \pm 0.7$  % of cells after 1 Gy, Fig 1C). This is in accordance with previous studies showing that neural progenitors, but not MEF, are highly prone to radiation-induced apoptosis (Kashiwagi et al., 2018; Nowak et al., 2006; Roque et al., 2012; Semont et al., 2004). Emphasizing the difference between the two types of cells, *Xlf* deficiency increased radiation-induced apoptosis of NSPC, but had not such effects on MEF (Fig 1C).

Telo-FISH performed on metaphases harvested at 24h PI showed a dose-dependent increase of chromosome aberrations (Fig 1D), consisting mainly of chromosome breaks, *ie.* chromosome-type aberrations generated from unrepaired DSBs induced before DNA replication (in G1 or S phase in unreplicated chromosome regions). Evidencing the defect in DNA repair in the absence of *Xlf*, the numbers of these chromosome aberrations were increased in *Xlf*-deficient cells. Moreover, the detection of dicentric chromosomes in 1Gy-irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF (Fig 1D) uncovers the decreased fidelity of DNA repair resulting from *Xlf* deficiency when cells have to deal with a high number of DSBs.

Interestingly, the chromosome stability after an acute genotoxic stress appears better preserved in NSPC than in MEF. Indeed, radiation-induced chromosome aberrations were less abundant in *wt* NSPC than in *wt* MEF, as well as in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC than in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF (Fig 1E). Accordingly, the percentage of metaphases without any detectable chromosome aberration was higher in NSPC than in MEF at each dose tested (Fig 1E).

*Xlf* deficiency strongly impacted the metaphase index of irradiated NSPC, suggesting that cell cycle checkpoints and apoptosis promote genetic stability in cultures of NSPC by eliminating damaged cells (Fig 1F). However, other mechanisms may contribute to a better

preservation of chromosome stability of irradiated NSPC as compared to irradiated MEF. Indeed, irradiated *wt* NSPC and *wt* MEF showed a similar dose-dependent decrease of the metaphase index despite differences in apoptosis induction (Fig 1F and 1C) and apoptosis did not prevent some irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC to reach metaphase with high numbers of chromosome aberrations.

### **NSPC have higher DNA repair capacity than MEF from late S phase to metaphase**

In order to investigate more specifically the DNA repair activity in MEF and NSPC irradiated in late S or G2 phase, Telo-FISH was performed on metaphases harvested at 3h PI when radiation-induced apoptosis was not detected yet in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC at any dose tested (Fig 2A). Metaphases from irradiated cells showed a dose-dependent increase of chromosome aberrations, which were nearly 10 times more abundant than at 24h PI for each type of cells (Fig 2B), indicating that surviving cycling cells at 24h PI had repaired most of radiation-induced DNA breaks, even in the absence of *Xlf*.

Chromosome aberrations observed at 3h PI were essentially chromatid breaks, which result from unrepaired double strand breaks (DSBs) induced after replication either in late S or in G2 phase, which is consistent with the experimental design. Significantly less chromatid breaks were numbered in *wt* NSPC than in *wt* MEF at each dose tested (Fig 2B). Accordingly, the percentages of cells without any detectable chromosome aberrations were higher in NSPC than in MEF cultures (Fig 2C). This lower level of chromosome instability was not related to differences in cell checkpoints activation since *wt* NSPC and *wt* MEF showed similar dose-dependent decreases of the metaphase index (Fig 2D). These results reveal therefore the higher capacity of *wt* NSPC as compared to *wt* MEF to repair DSBs induced during late S and G2 phase, thereby reducing the number of chromatid breaks persisting at metaphase.

### ***Xlf* deficiency impacts less severely the DNA repair capacity from late S to G2 phase in NSPC than in MEF**

Evidencing the importance of *Xlf* for DSB repair in S and G2 after irradiation, chromosome aberrations were increased 3 to 4 times at 3h PI in irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF as compared to their *wt* counterparts at each dose tested (Fig 2B). Interestingly, radial figures, *ie.* chromatid-type aberrations involving two or more chromosomes, were detected after 1 Gy at similar levels in both *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC ( $0.3 \pm 0.09$  /metaphase) and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF ( $0.3 \pm 0.08$  /metaphase) (Fig 2E), whereas they were undetectable at lower doses in these cells, as well as

in irradiated *wt* cells, giving another clue on the decreased fidelity of DNA repair in the absence of *Xlf* when NSPC and MEF have to deal with a high number of DNA breaks.

Irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC showed significantly less chromosome aberrations than irradiated *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF at each dose tested (reaching  $7.7 \pm 0.4$  aberrations/metaphases in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and  $12.7 \pm 0.9$  in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF after 1 Gy) (Fig 2B). Mitotic indexes of both types of irradiated cells were similarly decreased in a dose-dependent manner as compared to *wt* controls (Fig 2D) in the absence of apoptosis induction (Fig 2A), showing that *Xlf* deficiency delayed cell cycle progression similarly in the two types of irradiated cells.

Altogether, these data reveal that, although *Xlf* is critically involved in DSB repair from late S to G2 phase, *Xlf* deficiency impacts less severely the DNA repair capacity in NSPC than in MEF.

### **Lower chromosome instability in NSPC cultured with <sup>3</sup>H-T than in MEF**

We then compared the responses of NSPC and MEF to chronic DNA damage induction. To this aim, cells were cultured for several cell cycles in the presence of various concentrations of tritiated thymidine (<sup>3</sup>H-T, 0 to 1.85 KBq/mL). <sup>3</sup>H-T is incorporated into DNA of cycling cells during S phase. Once incorporated, radioactive decays of <sup>3</sup>H-T are known to induce both DNA single-strand and double-strand breaks (Cleaver et al., 1972; LeMotte and Little, 1984), resulting in chronic DNA damage induction in the cells and their progeny (Geard, 1975). Due to the semi-conservative DNA replication, each chromatids of all chromosomes contains one tritiated DNA strand at the first metaphase after <sup>3</sup>H-T incorporation (Fig 3A). At the second metaphase in presence of <sup>3</sup>H-T, all chromosomes keep only one parental “cold” DNA strand of one chromatid. Then, in the absence of recombination and selective pressure, the number of chromosomes per cell containing one cold DNA strand diminishes progressively after each cell cycle. Thus, along with further cell replications in presence of <sup>3</sup>H-T, all chromosomes tend to have incorporated two times more <sup>3</sup>H-T than that after the first round of <sup>3</sup>H-T incorporation, which is supposed to increase the rate of chronic DNA damage.

<sup>3</sup>H-T incorporation has been assessed by cellular autoradiography on metaphases collected after 24h and 72h of cultures, when cells could have incorporated <sup>3</sup>H-T during no more than one entire S phase, and up to three successive S phases respectively. As shown in (Fig 3B), the numbers of silver grains/metaphase increased in a concentration- and time-dependent manner in both NSPC and MEF cultures, evidencing the successive rounds of <sup>3</sup>H-T incorporation. However, important variations in the number of silver grains per metaphase were

observed at the highest concentrations of  $^3\text{H-T}$  in both NSPC and MEF, thereby evidencing delays in transition from S to M phase at 24h, as well as delays in the whole cell cycle progression at 72h. These effects were more marked in *Xlf*<sup>-/-</sup> cells (Fig 3B). Accordingly, metaphase indexes decreased in a concentration and time-dependent manner (Fig 3C), confirming the effects of  $^3\text{H-T}$  incorporation on the cell cycle. As observed with  $\gamma$ -radiation, this decrease was associated with NSPC apoptosis, which was enhanced in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC. By contrast only a low level of apoptosis was observed in MEF cultured with the highest  $^3\text{H-T}$  concentration tested (1.85 KBq/mL) in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF (Fig 3D), confirming the differences in apoptosis induction between NSPC and MEF in response to DNA damage.

As shown in Table 1,  $^3\text{H-T}$  induced both chromatid breaks, and chromosome-type aberrations consisting mostly in chromosome breaks. Chromatid breaks were detected at both 24h and 72h after  $^3\text{H-T}$  addition in the culture medium, whereas chromosome breaks were significantly increased only after 72h, showing that both types of aberrations were directly the consequences of decays from  $^3\text{H-T}$  incorporated into DNA (*ie.* from DSBs induced during either S or G2 phase for chromatid breaks and before the last S phase in presence of  $^3\text{H-T}$  for chromosome-type aberrations).

Both types of aberrations were increased in *Xlf*<sup>-/-</sup> cells as compared to *wt* cells (Fig 3E), evidencing the importance of *Xlf* for the repair of DNA damage induced by  $^3\text{H-T}$  decays all along the cell cycle. Additionally, a few dicentrics were observed at the highest  $^3\text{H-T}$  concentrations in metaphases of *Xlf*<sup>-/-</sup> cells, confirming once again the decreased fidelity of DNA repair in the absence of *Xlf* in both NSPC and MEF when exposed to high genotoxic stress (Table 1).

As a consequence of differences in the composition of their respective culture media,  $^3\text{H-T}$  incorporation was two times greater after 24h in MEF than in NSPC at each  $^3\text{H-T}$  concentration (Fig 3B). Therefore, to evidence differences in the effects of  $^3\text{H-T}$  between MEF and NSPC, we compared chromosome instability in conditions leading to similar levels of  $^3\text{H-T}$  incorporation in the two types of cells: NSPC cultured with 0.74 KBq/mL *vs* MEF cultured with 0.37 KBq/ml (Fig 3F). In these conditions, a low apoptosis was induced in *wt* NSPC cultures (less than 10%) (Fig 3D), which presented a decrease of the metaphase index similar as that in *wt* MEF (around 30%) (Fig 3C), but a lower number of chromosome aberrations (Fig 3E and F). Strikingly, no chromosome breaks were detected after 72 h in *wt* NSPC cultures, whereas around 20 % of *wt* MEF metaphases contained one chromosome break, indicating a lower chromosome instability in NSPC than in MEF cultured with  $^3\text{H-T}$ .

### **Adaptive response to <sup>3</sup>H-T incorporation reduced chromatid-breaks in irradiated NSPC but not in irradiated MEF**

Interestingly, despite the increase of the amount of <sup>3</sup>H-T incorporated into metaphase chromosomes from 24h to 72h due to its presence in both parental and neo-synthesized DNA strands at 72h (Fig 3B), the number of chromatid breaks per metaphase did not increase in both NSPC and MEF cultures at any concentration tested and whatever their *Xlf* status (Fig supp. 1). This suggests that both types of cells developed an adaptive response to the chronic genotoxic stress, reducing therefore the number of chromatid-type aberrations induced by the radioactive decays of <sup>3</sup>H-T during S and G2 phase, independently of their *Xlf* status.

Human blood lymphocytes cultured with <sup>3</sup>H-T have been previously shown to develop an adaptive response decreasing the chromatid breaks induced by high dose of X-rays (Olivieri et al., 1984). To further explore the possible development of such adaptive response in NSPC and MEF, cells that had been cultured for 48h with <sup>3</sup>H-T were  $\gamma$ -irradiated (1 Gy) and metaphases were collected at 3h PI (Fig 4A). In the aim to compare the effects of similar <sup>3</sup>H-T incorporation rates in the two types of cells, NSPC were cultured with <sup>3</sup>H-T at 0.74 KBq/mL and MEF with <sup>3</sup>H-T at 0.37 KBq/mL. Ten to twenty times more chromatid breaks were found in 1 Gy-irradiated cells as compared to non-irradiated cells cultured with <sup>3</sup>H-T (Fig 4B, 4C and Fig supp. 1). Tritium contamination did not change the number of chromatid breaks induced by  $\gamma$ -radiation in MEF (Fig 4B). By contrast,  $\gamma$ -irradiated *wt* NSPC that had previously incorporated <sup>3</sup>H-T showed less chromatid- and chromosome-type aberrations than control cells (Fig 4C). This effect was not related to higher level of apoptosis (Fig 4D), nor to stronger activation of the G2/M checkpoints (Fig 4E), indicating therefore that <sup>3</sup>H-T incorporation increased the DNA repair capacity of NSPC. This effect was not observed in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC (Fig 4C), indicating that this effect depends on *Xlf*.

Altogether these data suggest that both NSPC and MEF developed an adaptive response to chronic DNA damage that allowed NSPC, but not MEF, to reduce chromosome instability induced by subsequent high dose of  $\gamma$ -radiation exposure.

### **Maintenance of chromosome stability is more efficient in long term cultures of NSPC with <sup>3</sup>H-T than in MEF**

We then compared the long-term consequences of chronic DNA damage on NSPC and MEF cultures. To this end, cells were cultured for 7 days with <sup>3</sup>H-T at 0.74 KBq/mL and 0.37 KBq/mL respectively. Telo-FISH staining and cellular autoradiography were performed on

metaphases recovered at days 1, 3, 5 and 7 (Fig 5A). The number of silver grains per metaphase increased with time in *wt*, as well as in *Xlf*-deficient cells (Fig 5B), confirming that the  $^3\text{H-T}$  concentrations used allowed the determination of the progressive effects of many successive rounds of incorporation in our different types of cells.

As shown on Fig 5C, apoptosis was chronically induced at low levels in *wt* NSPC cultures and at higher levels in that of *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC, but not in that of MEF whatever their *Xlf* status, consistently with the data obtained at earlier times after contaminations (Fig 3D). Interestingly, mitotic index of *wt* NSPC was slightly decreased in presence of  $^3\text{H-T}$ , but remained stable over time (Fig 5D). By contrast, mitotic index *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC but also that of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF decreased constantly.

The number of chromatid breaks induced by tritium incorporation per metaphase was higher in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF than in *wt* MEF (Fig 5E). These numbers remained stable in metaphases collected at day 3, as compared to those collected at day 1 for the two types of cells (Fig 5E), confirming the induction of an adaptive response to the chronic genotoxic stress independently of the *Xlf* status. However, it increased thereafter both in *wt* MEF and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF. Besides, the number of chromosome breaks increased at day 3 (Fig 5F), and remained stable thereafter in *wt* MEF, but increased with time in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF, together with the appearance of dicentrics at day 7 in these cells (Fig 5G). Consequently, the percentage of cells without any chromosome aberrations decreased with time in both *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF, when the percentage of highly damaged cells containing both chromatid- and chromosome-type aberrations increased progressively, especially in *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF cultures (Fig 6 and supp.2). Altogether, these data demonstrate that despite the initial development of an adaptive response, chronic DNA damage led a progressive loss of control of chromosome stability with cell divisions in *wt* MEF cultured with  $^3\text{H-T}$ , which was aggravated by *Xlf*-deficiency.

On the contrary, *wt* NSPC cultured with  $^3\text{H-T}$  showed a constant decrease in chromosome aberrations after day 1, which was mainly related to a significant decrease in chromatid breaks (Fig 5H). Besides, the number of chromosome breaks per metaphase remained stable and lower to that found in *wt* MEF (Fig 5I). Consequently, after 7 days in culture with  $^3\text{H-T}$ , more than 82% of *wt* NSPC did not present any chromosome aberration (Fig 6 and supp.2) vs. only 27% of *wt* MEF.

By contrast, *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC cultured with  $^3\text{H-T}$  showed a stably elevated number of chromatid breaks (Fig 5H), and a significant increase with time of both chromosome breaks (Fig 6I) and dicentrics (Fig 5J). Consequently, the percentage of surviving *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC without

any chromosome aberration decreased along with the apparition of some cells containing both chromatid- and chromosome-type aberrations (Fig 6 and supp.2), showing a progressive increase in chromosome instability and therefore the importance of *Xlf* for the maintenance of genome stability.

Finally, multi-FISH analysis on metaphases recovered after 7 days in culture with  $^3\text{H-T}$  (Fig 5K) did not show any chromosome rearrangements in *wt* NSPC, whereas such chromosome aberrations were detected in a significant percentage of the other cell types including *wt* MEF (Fig 5L and M).

Altogether these data show that contrary to MEF, in which chronic DNA damage induced a progressive loss of chromosome stability, NSPC cultured with  $^3\text{H-T}$  maintained more efficiently their chromosome stability at long-term. This appears to rely on a better capacity to face DNA damage, further increased by the development of an adaptive response.

These data confirm therefore that NSPC developed an adaptive response to chronic DNA damage induced by  $^3\text{H-T}$  incorporation into their DNA, which reduced the number of chromatid breaks detectable at the following metaphases. Together with checkpoint activation and apoptosis induction, this adaptive response allowed NSPC to maintain their chromosome stability, and thereby enabled *wt* NSPC to proliferate without any detectable chromosomal aberrations. This adaptive response was at least partially abolished by *Xlf* deficiency.

Interestingly, the high level of apoptosis and the strong activation of cell checkpoints could not prevent the increase of chromosome-type aberrations in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC, clearly demonstrating the importance of *Xlf* for NSPC to maintain their genetic stability at long-term when they are exposed to chronic DNA damage.

## Discussion

Genome stability of NSPC has been long time considered to be crucial for brain development and homeostasis. However, recent studies have identified recurrent DSB clusters in dividing NSPC, which may underlie the diversity of neuronal cell types and have a role in neuronal physiology through a mechanism reminiscent to V(D)J recombination involving NHEJ (Alt and Schwer, 2018; Wei et al., 2016, 2018). This raised the interest in understanding on how NSPC sense and repair DSB and how this mechanism could be altered by environmental genotoxic stress caused by pollutants or ionizing radiation during brain development. This is particularly emphasized by the observation that many of these recurrent DSB clusters are located in chromosome regions containing genes involved in the etiology of neurodevelopmental and psychiatric disorders and cancers (Alt and Schwer, 2018; Wei et al., 2016, 2018).

We have shown here that embryonic mouse NSPC have significantly higher capacity than MEF to maintain their chromosome stability in response to acute ( $\gamma$ -radiation), as well as chronic ( $^3\text{H-T}$  incorporation) genotoxic stress. This appears to rely on a higher DNA repair activity further enhanced by an adaptive response. Together with apoptosis, which is induced in NSPC but not in MEF in response to DNA damage, this prevented the progressive development in NSPC of the generalized chromosome instability observed in MEF cultures with  $^3\text{H-T}$  at long-term.

By using different methods, several reports have shown that the DDR of pluripotent and multipotent stem cells differs from that of other somatic cells and allows an efficient maintenance of their genomic integrity (Lan et al., 2012; Mandal et al., 2011; Vitale et al., 2017; Wyles et al., 2014; Zou et al., 2012). It has Irradiated NSPC have been reported to have a faster DSB repair activity, monitored by quantification of DSB repair foci (Kashiwagi et al., 2018). Here, we have used molecular cytogenetic approaches to examine genetic stability at the chromosomal level. The main limitations of these techniques are that they can be performed only on metaphase spreads and cannot detect small rearrangements or intra-chromosomal rearrangements. However, they can evidence complex karyotypes and structural abnormalities, allowing us to highlight important variations in the maintenance of chromosome stability between MEF and NSPC.

Interestingly, these variations occurred particularly during late S and G2/M phase. It is therefore tempting to propose that the higher capacity of NSPC to repair radio-induced DNA



breaks during S-G2 phase results from an adaptation of the DNA repair machinery to the high rate of recurrent DNA breaks within large and late replicating genes reported by Wei and colleagues in these cells (Wei et al., 2016).

Cultures of NSPC with  $^3\text{H-T}$  represent a highly relevant *in vitro* model to study the effect of chronic genotoxic stress on the developing brain. One of the main interests of our study is that we compared, for the first time to our knowledge, the response to chronic genotoxic stress of proliferating embryonic NSPC to that of another type of proliferating embryonic, non-stem cells.

NSPC are well known to be highly prone to radiation-induced apoptosis, as an alternate outcome to non-repaired DNA damage (Acharya et al., 2010; Gatz et al., 2011; Nowak et al., 2006; Roque et al., 2012; Semont et al., 2004; Sokolov and Neumann, 2013), contrary to MEF (Kashiwagi et al., 2018). Consistently, we showed that  $^3\text{H-T}$  incorporation triggered a dose-dependent apoptosis in NSPC, but not in MEF. This apoptosis clearly prevented the proliferation of NSPC accumulating chromosome aberrations at long-term cultures with  $^3\text{H-T}$ . Conversely, we showed that the lack apoptotic response favored the accumulation of chromosome aberrations in MEF. Together with a lower DNA repair capacity this contributed to a dramatic decrease of the percentages of cells without any chromosome aberrations in MEF cultured with  $^3\text{H-T}$  at long-term.

Our cytogenetic data are clearly in accordance with a major role of XLF in NHEJ since: *i)* *Xlf* deficiency highly increased the chromosome instability induced by acute, as well as chronic genotoxic stress in both NSPC and MEF ; *ii)* we showed that XLF loss reduced the DNA repair fidelity at intermediate dose (1Gy) of  $\gamma$ -radiation, as well as at high rates of  $^3\text{H-T}$  incorporation in both types of cells, *iii)* they also revealed the importance of XLF for the repair of chromatid breaks occurring either spontaneously, after  $\gamma$  radiation, or  $^3\text{H-T}$  decays during the late S and G2 phase. . However, we found that the consequences of *Xlf* deficiency on chromosome instability were less severe in NSPC than in MEF in response to  $\gamma$  radiation, as well as in short term cultures with  $^3\text{H-T}$ , suggesting a variation of its requirement for DNA repair in function of the cell type. This is further emphasized by the lower level of basal chromosome instability observed in cultures of *Xlf*  $^{-/-}$  NSPC as compared to *Xlf*  $^{-/-}$  MEF. Overall, *Xlf* deficiency altered moderately the basal level of DNA repair in cultures of *Xlf*  $^{-/-}$  NSPC, consistently with the mild impact on brain development of *Xlf* deficiency leading only to a few apoptotic cells detected in the embryonic brain (Abramowski et al., 2018; Liu et al., 2017). This mild *in vivo* effect has been related to redundant functions between XLF and PAXX

in DNA-end tethering (Abramowski et al., 2018; Liu et al., 2017) suggesting that one possible explanation for the differential effects of XLF loss on DNA repair in MEF and NSPC should be sought in different levels of expression of PAXX between the two types of cells.

Adaptive response has been initially defined as the resistance to high doses of radiation acquired by different cell types after an exposure to low doses of ionizing radiation (Devic et al., 2018; Ikushima et al., 1996 for review), we showed here that an adaptive response was also developed by NSPC to reduce the effects of long-term chronic genotoxic stress. Different end points, *ie.* DNA damage foci, cell killing, mutation induction, micronuclei formation, chromosome aberration induction have been used to evidence this effect (Gajendiran et al., 2001; Nenoj et al., 2015; Olivieri et al., 1984; Schwarz et al., 2008; Stoilov et al., 2007; Zhao et al., 2015). Cytogenetic adaptive response expressed in late S or G2 reducing the yield of chromatid-type aberrations induced by high dose of X radiation has been thus reported in lymphocytes cultured with <sup>3</sup>H-T (Olivieri et al., 1984), as well as in lymphocytes, bone marrow cells and germinal cells after low dose of ionizing radiation (Farooqi and Kesavan, 1993; Jacquet et al., 2008). In line with these data, we have shown that 48h in culture with <sup>3</sup>H-T reduced the number of chromatid breaks induced by 1Gy of  $\gamma$ -radiation in NSPC. This cytogenetic adaptive response was not refound in *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC confirming the role of NHEJ in the adaptive response reported by previous studies in other cell models and by other methods (Klammer et al., 2010, 2012; Shelke and Das, 2015). It has been thus reported that in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to a priming dose of 0.1 Gy followed by a challenging dose of 2 Gy showed significantly increased expression of the proteins involved in NHEJ between primed and non-primed cells (Shelke and Das, 2015).

In our study, MEF differed from NSPC by not developing a cytogenetic adaptation after a challenging dose of 1 Gy, although previous studies have reported an adaptive response after low dose radiation in these cells by using a plasmid end-joining assay (Klammer et al., 2010, 2012). This apparent discrepancy between these studies and ours may be explained by the difference in the endpoints used. Moreover, the authors also revealed that the effect they observed occurred only within a narrow window of X ray doses (Klammer et al., 2012), suggesting that it may be too low to be detected after the challenging dose we used by cytogenetic methods in MEF. This is further sustained by our observation that MEF, similarly as NSPC, developed an adaptive response to chronic DNA damage evidenced by the stabilization of the number of chromatid breaks observed in successive metaphases despite the increase amount of <sup>3</sup>H-T incorporated into their DNA.

To conclude, our data indicate that embryonic mouse NSPC can more efficiently than MEF face a large number of DSB and resist to chronic genotoxic stress at long-term. Comparative transcriptomic and proteomic studies of the different factors engaged in the DNA damage response, and particularly NHEJ, should probably give new mechanistic insights on these differences between the two types of cells. Further studies should determine whether long-term chronic genotoxic stress caused by  $^3\text{H-T}$  alters the stem cell potential, and or induces the selection of particular subpopulations of NSPC. This should prove to be very useful in understanding the effects on brain development of chronic exposure to DNA damaging agents.

## Acknowledgments

We thank all members of LRP for their helpful discussions. This work was supported by grants from CEA [Segment Radiobiologie and Programme Toxicologie de la DRF to FB, Amont-Aval PhD program to SM] and by Electricité de France (EDF).

## References

- Abramowski, V., Etienne, O., Elsaid, R., Yang, J., Berland, A., Kermasson, L., Roch, B., Musilli, S., Moussu, J.-P., Lipson-Ruffert, K., et al. (2018). PAXX and Xlf interplay revealed by impaired CNS development and immunodeficiency of double KO mice. *Cell Death Differ.* *25*, 444–452.
- Acharya, M.M., Lan, M.L., Kan, V.H., Patel, N.H., Giedzinski, E., Tseng, B.P., and Limoli, C.L. (2010). Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 1846–1855.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* *124*, 301–313.
- Alt, F.W., and Schwer, B. (2018). DNA double-strand breaks as drivers of neural genomic change, function, and disease. *DNA Repair* *71*, 158–163.
- Arya, R., and Bassing, C.H. (2017). V(D)J Recombination Exploits DNA Damage Responses to Promote Immunity. *Trends Genet. TIG* *33*, 479–489.
- Balmus, G., Barros, A.C., Wijnhoven, P.W.G., Lescale, C., Hasse, H.L., Boroviak, K., le Sage, C., Doe, B., Speak, A.O., Galli, A., et al. (2016). Synthetic lethality between PAXX and XLF in mammalian development. *Genes Dev.* *30*, 2152–2157.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J.-L., Hufnagel, M., le Deist, F., et al. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* *124*, 287–299.
- Cleaver, J.E., Thomas, G.H., and Burki, H.J. (1972). Biological damage from intranuclear tritium: DNA strand breaks and their repair. *Science* *177*, 996–998.
- Devic, C., Ferlazzo, M.L., and Foray, N. (2018). Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose-Response* *16*.
- Etienne, O., Roque, T., Haton, C., and Boussin, F.D. (2012). Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int. J. Radiat. Biol.* *88*, 694–702.
- Farooqi, Z., and Kesavan, P.C. (1993). Low-dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. *Mutat. Res.* *302*, 83–89.

- Gajendiran, N., Tanaka, K., Kumaravel, T.S., and Kamada, N. (2001). Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 42, 91–101.
- Gatz, S.A., Ju, L., Gruber, R., Hoffmann, E., Carr, A.M., Wang, Z.-Q., Liu, C., and Jeggo, P.A. (2011). Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10088–10100.
- Geard, C.R. (1975). Chromosomal aberrations in three successive cell cycles of *Wallabia bicolor* leukocytes after tritiated thymidine incorporation. *Radiat. Res.* 61, 118–127.
- Granotier, C., Pennarun, G., Riou, L., Hoffschir, F., Gauthier, L.R., De Cian, A., Gomez, D., Mandine, E., Riou, J.-F., Mergny, J.-L., et al. (2005). Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* 33, 4182–4190.
- Her, J., and Bunting, S.F. (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 293, 10502–10511.
- Hoshino, K., and Kameyama, Y. (1988). Developmental-stage-dependent radiosensitivity of neural cells in the ventricular zone of telencephalon in mouse and rat fetuses. *Teratology* 37, 257–262.
- Ikushima, T., Aritomi, H., and Morisita, J. (1996). Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat. Res.* 358, 193–198.
- Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696.
- Jacquet, P., Buset, J., Neefs, M., and Vankerkom, J. (2008). Studies on the adaptive response in mouse female germ cells X-irradiated in vitro at two different stages of maturation. *Vivo Athens Greece* 22, 179–186.
- Kashiwagi, H., Shiraishi, K., Sakaguchi, K., Nakahama, T., and Kodama, S. (2018). Repair kinetics of DNA double-strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural stem/progenitor cells and their differentiated neurons exposed to ionizing radiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 59, 261–271.
- Klammer, H., Kadhim, M., and Iliakis, G. (2010). Evidence of an adaptive response targeting DNA nonhomologous end joining and its transmission to bystander cells. *Cancer Res.* 70, 8498–8506.
- Klammer, H., Zhang, L.-H., Kadhim, M., and Iliakis, G. (2012). Dependence of adaptive response and its bystander transmission on the genetic background of tested cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 88, 720–726.
- Lan, M.L., Acharya, M.M., Tran, K.K., Bahari-Kashani, J., Patel, N.H., Strnadel, J., Giedzinski, E., and Limoli, C.L. (2012). Characterizing the Radioresponse of Pluripotent and Multipotent Human Stem Cells. *PLoS ONE* 7.
- LeMotte, P.K., and Little, J.B. (1984). DNA damage induced in human diploid cells by decay of incorporated radionuclides. *Cancer Res.* 44, 1337–1342.

Lescale, C., Lenden Hasse, H., Blackford, A.N., Balmus, G., Bianchi, J.J., Yu, W., Bacoccina, L., Jarade, A., Clouin, C., Sivapalan, R., et al. (2016). Specific Roles of XRCC4 Paralogs PAXX and XLF during V(D)J Recombination. *Cell Rep.* *16*, 2967–2979.

Li, G., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Brush, J.W., Goff, P.H., Murphy, M.M., Franco, S., Zhang, Y., and Zha, S. (2008). Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Mol. Cell* *31*, 631–640.

Liu, X., Shao, Z., Jiang, W., Lee, B.J., and Zha, S. (2017). PAXX promotes KU accumulation at DNA breaks and is essential for end-joining in XLF-deficient mice. *Nat. Commun.* *8*, 1–13.

Mandal, P.K., Blanpain, C., and Rossi, D.J. (2011). DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 198–202.

Nenoi, M., Wang, B., and Vares, G. (2015). In vivo radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. *Hum. Exp. Toxicol.* *34*, 272–283.

Nowak, E., Etienne, O., Millet, P., Lages, C.S., Mathieu, C., Mouthon, M.-A., and Boussin, F.D. (2006). Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat. Res.* *165*, 155–164.

Olivieri, G., Bodycote, J., and Wolff, S. (1984). Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* *223*, 594–597.

Roque, T., Haton, C., Etienne, O., Chicheportiche, A., Rousseau, L., Martin, L., Mouthon, M.-A., and Boussin, F.D. (2012). Lack of a p21waf1/cip -dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 537–547.

Saeed, H., Taipaleenmäki, H., Aldahmash, A.M., Abdallah, B.M., and Kassem, M. (2012). Mouse embryonic fibroblasts (MEF) exhibit a similar but not identical phenotype to bone marrow stromal stem cells (BMSC). *Stem Cell Rev. Rep.* *8*, 318–328.

Schwarz, S.B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Ertl-Wagner, B., Hell, R., and Schaffer, M. (2008). The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* *3*, 12.

Semont, A., Nowak, E.B., Silva Lages, C., Mathieu, C., Mouthon, M.-A., May, E., Allemand, I., Millet, P., and Boussin, F.D. (2004). Involvement of p53 and Fas/CD95 in murine neural progenitor cell response to ionizing irradiation. *Oncogene* *23*, 8497–8508.

Shelke, S., and Das, B. (2015). Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to  $\gamma$  radiation. *Mutagenesis* *30*, 365–379.

Sokolov, M., and Neumann, R. (2013). Lessons learned about human stem cell responses to ionizing radiation exposures: a long road still ahead of us. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 15695–15723.

Stoilov, L.M., Mullenders, L.H.F., Darroudi, F., and Natarajan, A.T. (2007). Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis* *22*, 117–122.

Vera, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Malivert, L., Lim, A., Bole-Feysot, C., Martin, C., Florkin, B., Latour, S., Revy, P., et al. (2013). Cernunnos deficiency reduces thymocyte life span and alters the T cell repertoire in mice and humans. *Mol. Cell. Biol.* 33, 701–711.

Verreet, T., Verslegers, M., Quintens, R., Baatout, S., and Benotmane, M.A. (2016). Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. *Neural Plast.* 2016, 1243527.

Vitale, I., Manic, G., De Maria, R., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017). DNA Damage in Stem Cells. *Mol. Cell* 66, 306–319.

Wei, P.-C., Chang, A.N., Kao, J., Du, Z., Meyers, R.M., Alt, F.W., and Schwer, B. (2016). Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell* 164, 644–655.

Wei, P.-C., Lee, C.-S., Du, Z., Schwer, B., Zhang, Y., Kao, J., Zurita, J., and Alt, F.W. (2018). Three classes of recurrent DNA break clusters in brain progenitors identified by 3D proximity-based break joining assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 1919–1924.

Wyles, S.P., Brandt, E.B., and Nelson, T.J. (2014). Stem Cells: The Pursuit of Genomic Stability. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20948–20967.

Zha, S., Guo, C., Boboila, C., Oksenysh, V., Cheng, H.-L., Zhang, Y., Wesemann, D.R., Yuen, G., Patel, H., Goff, P.H., et al. (2011). ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature* 469, 250–254.

Zhao, Y., Zhong, R., Sun, L., Jia, J., Ma, S., and Liu, X. (2015). Ionizing Radiation-Induced Adaptive Response in Fibroblasts under Both Monolayer and 3-Dimensional Conditions. *PLoS ONE* 10.

Zou, Y., Zhang, N., Ellerby, L.M., Davalos, A.R., Zeng, X., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Responses of Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Progeny to Ionizing Radiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 100–105.

## **Legends to figures**

**Figure 1: Apoptosis contributes to preserve chromosome stability in irradiated NSPC cultures, but not in irradiated MEF cultures.**

### **A. Proliferation rate in NSPC and MEF cultures**

Population doublings curves of NSPC and MEF cultures, as well as their *Xlf*-deficient counterparts.

### **B. Basal chromosome instability in NSPC and MEF metaphases**

Bar graph representing chromatid breaks and chromosome breaks per metaphase in cultures of NSPC and MEF. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 400 to 500 metaphases.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by Kruskal-Wallis test.

### **C. Radiation-induced apoptosis at 24h PI**

Bar graph representing the percentage of radiation-induced apoptotic cells with activated caspase 3/7 (from 873 to 7667 cells were analyzed per condition). Each data point represents mean  $\pm$  SEM (n=6). \*\* $p < 0.01$  by Mann-Whitney test. Data are representative of 2 independent experiments.

### **D. Chromosome instability in NSPC and MEF metaphases at 24h PI**

Bar graph representing chromosome breaks, chromatid breaks and dicentrics per metaphase in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF at 24h PI. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

### **E. Distribution of chromosome aberrations levels**

Stacked bar graph showing the percentage of metaphases with various levels of chromosome aberrations at 24h PI. 50 metaphases were analyzed in each condition.

### **F. Cell checkpoints activation in NSPC and MEF cultures at 24h PI**

Metaphase index as percentage of control in NSPC and MEF cultures at 24h PI. At least 1000 cells were analyzed per condition.

**Figure 2: NSPC exhibit a higher DNA repair capacity than MEF from late S to G2 phase, which is partially associated to XLF activity.**

### **A. Radiation-induced apoptosis at 3h PI**

Bar graph representing the percentage of 1Gy-induced apoptotic cells with activated caspase 3/7. (from 1261 to 11169 cells were analyzed per condition). Each data point represents mean  $\pm$  SEM (n=6).  $p > 0.05$  by Mann-Whitney test.

### **B. Chromosome instability in NSPC and MEF metaphases at 3h PI**

Bar graph representing chromatid breaks and chromosome breaks per metaphase in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF at 3h PI. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

### **C. Distribution of chromosome aberrations per metaphase**

Stacked bar graph demonstrating the percentage of metaphases with various level of chromosome aberrations at 3h PI. 50 metaphases were analyzed in each condition.

### **D. Cell checkpoints activation in NSPC and MEF cultures at 3h PI**



Metaphase index as percentage of control in NSPC and MEF cultures at 3h PI. At least 1000 cells were analyzed per condition.

#### **E. Radial figures in NSPC and MEF cultures at 3h PI**

Bar graph representing radial figures per metaphase in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF at 3h PI. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \*\*\**p*<0.001 by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

### **Figure 3: Similar level of <sup>3</sup>H-T incorporation induced less chromosome aberrations in NSPC than in MEF.**

#### **A. <sup>3</sup>H-T incorporation model**

Schematic representation of several rounds of <sup>3</sup>H-T incorporation into chromosomes as supposed by the semi-conservative DNA replication pattern.

#### **B. Amount of incorporated <sup>3</sup>H-T into chromosomes**

Boxplot representing the numbers of silver grains per metaphase in *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF, 24h and 72h after <sup>3</sup>H-T contamination as revealed by cellular autoradiography. Each boxplot represents 90<sup>th</sup> percentile of the data set and the line through the box represents the median (n = 50 metaphases analysed per condition). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

#### **C. Cell checkpoints activation in NSPC and MEF cultures**

Metaphase index as percentage of control in NSPC and MEF cultures, 24h and 72h after <sup>3</sup>H-T contamination. At least 1000 cells were analyzed per condition.

#### **D. <sup>3</sup>H-T-induced apoptosis**

Bar graph representing the percentage of <sup>3</sup>H-T-induced apoptotic cells with activated caspase 3/7 (from 774 to 3370 cells were analyzed per condition). Each data point represents mean  $\pm$  SEM (n=6). \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 by Mann–Whitney test.

#### **E. Distribution of chromosome aberrations levels**

Stacked bar graph showing the percentage of metaphases with various level of chromosome aberrations. 50 metaphases were analyzed in each condition.

#### **F. Chromosome instability in NSPC and MEF metaphases**

Bar graph representing chromatid breaks and chromosome breaks per metaphase in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF, 24h and 72h after <sup>3</sup>H-T contamination. NSPC cultured with 0.74 KBq/ml vs MEF cultured with 0.37 KBq/ml leading to similar levels of <sup>3</sup>H-T incorporation in the two types of cells. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \**p*<0.05,

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

**Figure 4: Prior incorporation of <sup>3</sup>H-T reduced chromosome aberrations in irradiated NSPC but not in irradiated MEF.**

**A. Experimental scheme**

NSPC and MEF were cultured with <sup>3</sup>H-T at 0.74 KBq/mL and 0.37 KBq/ml respectively during 48h and then 1Gy-irradiated. Cells were analyzed at 3h PI.

**B, C. Chromosome aberrations at 3h PI in <sup>3</sup>H-T contaminated and non-contaminated MEF (B) and NSPC (C)**

Bar graph representing chromatid breaks and chromosome breaks per metaphase. Stacked bar graph representing the percentage of metaphases with various level of chromosome aberrations in culture of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF (B) and NSPC (C) at 3h PI. Each data point represents the mean ± S.E.M of 50 metaphases. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

**D. Radiation-induced apoptosis at 3h PI**

Bar graph representing the percentage of induced apoptotic cells with activated caspase 3/7 at 3h PI. Each data point represent mean ± SEM (n=6). p>0.05 by Mann-Whitney test.

**E. Cell checkpoints activation in NSPC and MEF cultures at 3h PI**

Metaphase index as percentage of control in NSPC and MEF cultures at 3h PI.

**Figure 5: Better maintenance of chromosome stability in NSPC as compared to MEF after long-term culture with <sup>3</sup>H-T.**

**A. Experimental scheme**

NSPC and MEF were cultured during 7 days with <sup>3</sup>H-T at 0.74 KBq/mL and 0.37 KBq/mL respectively. Medium and <sup>3</sup>H-T contamination were renewed at days 2, 4 and 6. Cells were analysed at days 1, 3, 5 and 7.

**B. Amount of incorporated <sup>3</sup>H-T into chromosomes**

Boxplot representing the numbers of silver grains per metaphase in WT and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF. Each boxplot represents 90th percentile of the data set and the line through the box represents the median (n = 50 metaphases analysed per condition). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Kruskal-Wallis test.

**C. <sup>3</sup>H-T-induced apoptosis**

Percentage of  $^3\text{H-T}$ -induced apoptotic cells with activated caspase 3/7 (from 852 to 11170 cells were analyzed per condition). Each data point represent mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05, \*\*p<0.01 by Mann–Whitney test.

#### **D. Cell checkpoints activation in NSPC and MEF cultures**

Metaphase index as percentage of control in NSPC and MEF cultures.

#### **E, F, G. Chromosome instability in MEF metaphases**

Bar graph representing chromatid breaks (**E**), chromosome breaks (**F**) and dicentrics (**G**) per metaphase in culture of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> MEF. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Kruskal-Wallis test.

#### **H, I, J. Chromosome instability in NSPC metaphases**

Bar graph representing chromatid breaks (**H**), chromosome breaks (**I**) and dicentrics (**J**) per metaphase in culture of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Kruskal-Wallis test.

#### **K, L, M. Translocations level in NSPC and MEF culture after 7 days of culture with $^3\text{H-T}$**

(**K**) Example of M-FISH karyogram from *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC cultured with  $^3\text{H-T}$  during 7 days. White arrow indicates a translocation between the chromosome 2 and 11. (**L**) Bar graph representing translocations rate per metaphase in culture of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 30 metaphases. \*p<0.05, by Kruskal-Wallis test. (**M**) Stacked bar graph demonstrating the percentage of metaphases with various level of translocations.

#### **Figure 6: Long term culture with $^3\text{H-T}$ lead to progressive loss of chromosome stability in MEF and better preservation of genetic integrity in NSPC.**

3D bar graph showing the distribution of chromatid- and chromosome-type aberrations per metaphase in NSPC and MEF cultured with  $^3\text{H-T}$  during 7 days.

**Table 1:** chromatid breaks (CTB), chromosome breaks (CSB) and dicentrics per metaphase in culture of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and MEF cultured with  $^3\text{H-T}$  for 24h and 72h. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases, statistical analysis by Kruskal-Wallis test.

#### **Figure supp. 1: No increase of chromatid breaks from 24h to 72h in both NSPC and MEF, whatever their *Xlf* status.**

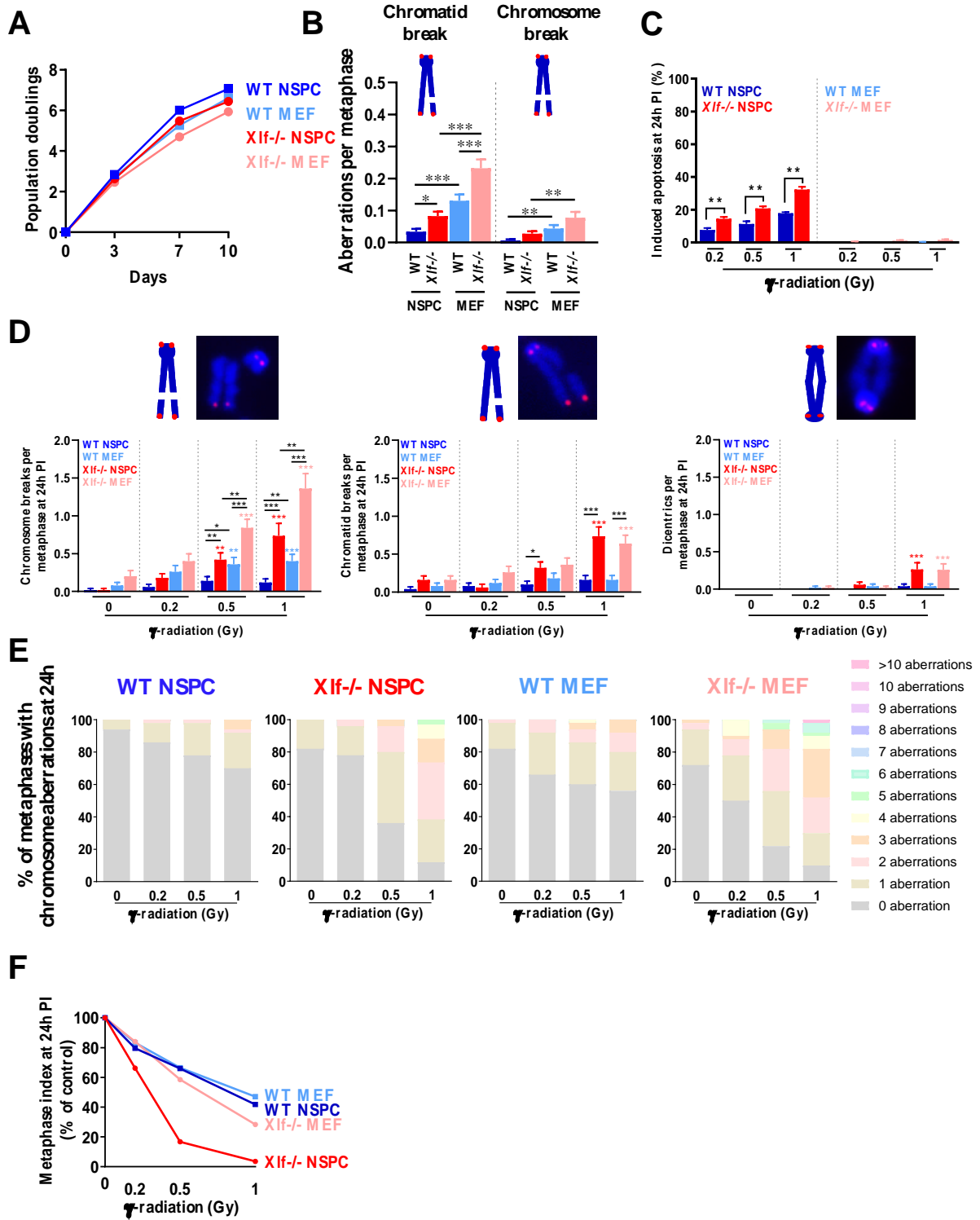
Bar graph representing chromatid breaks per metaphase in cultures of *wt* and *Xlf*<sup>-/-</sup> NSPC and

MEF, 24h and 72h after  $^3\text{H-T}$  contamination. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M of 50 metaphases.  $p > 0.05$  by Kruskal-Wallis test. Data are representative of 2 independent experiments.

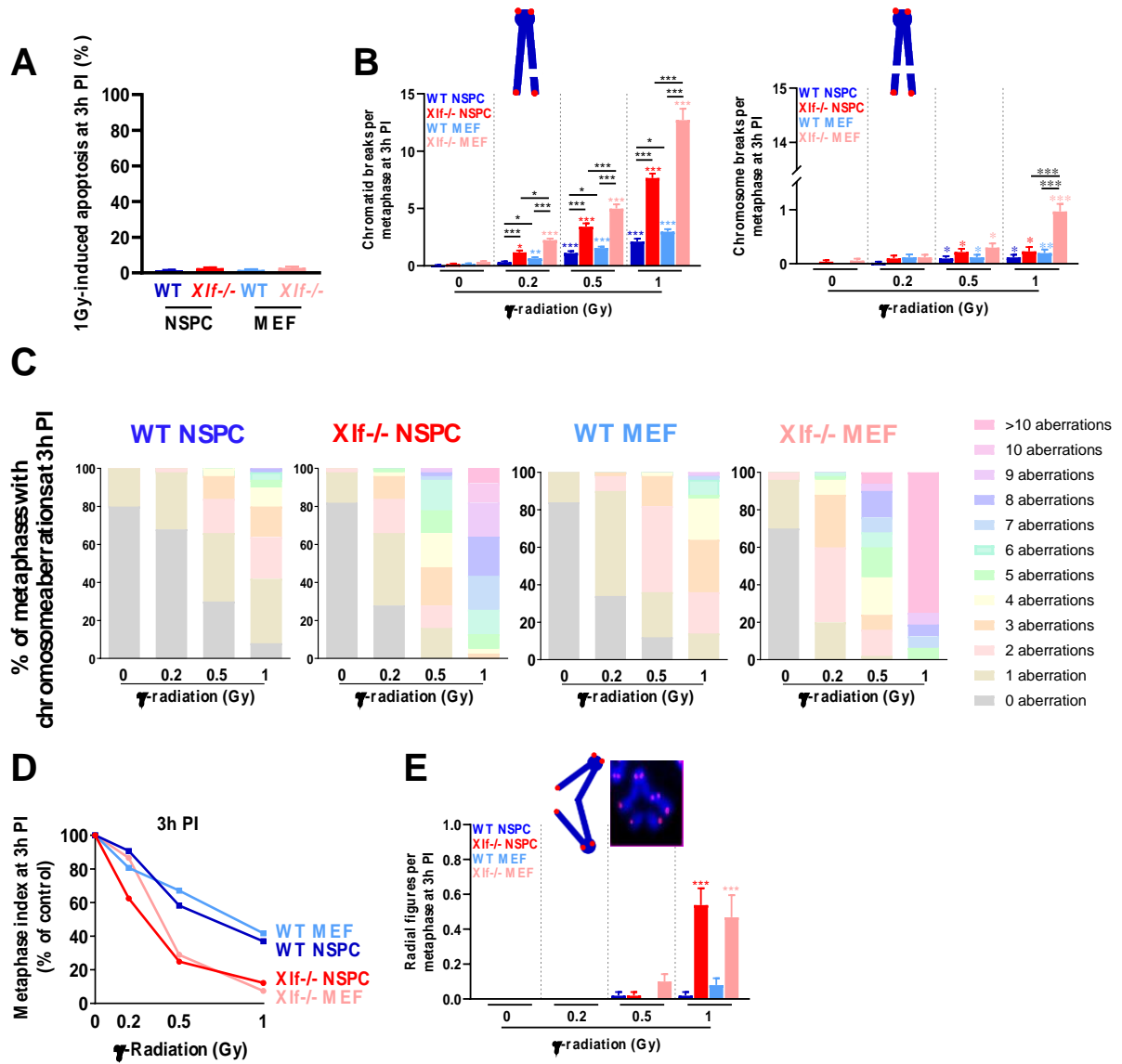
**Figure Supp. 2: Evolution of basal chromosome aberrations distribution in NSPC and MEF cultures.**

3D bar graph showing the distribution of chromatid- and chromosome-type aberrations per metaphase in NSPC and MEF cultured during 7 days.

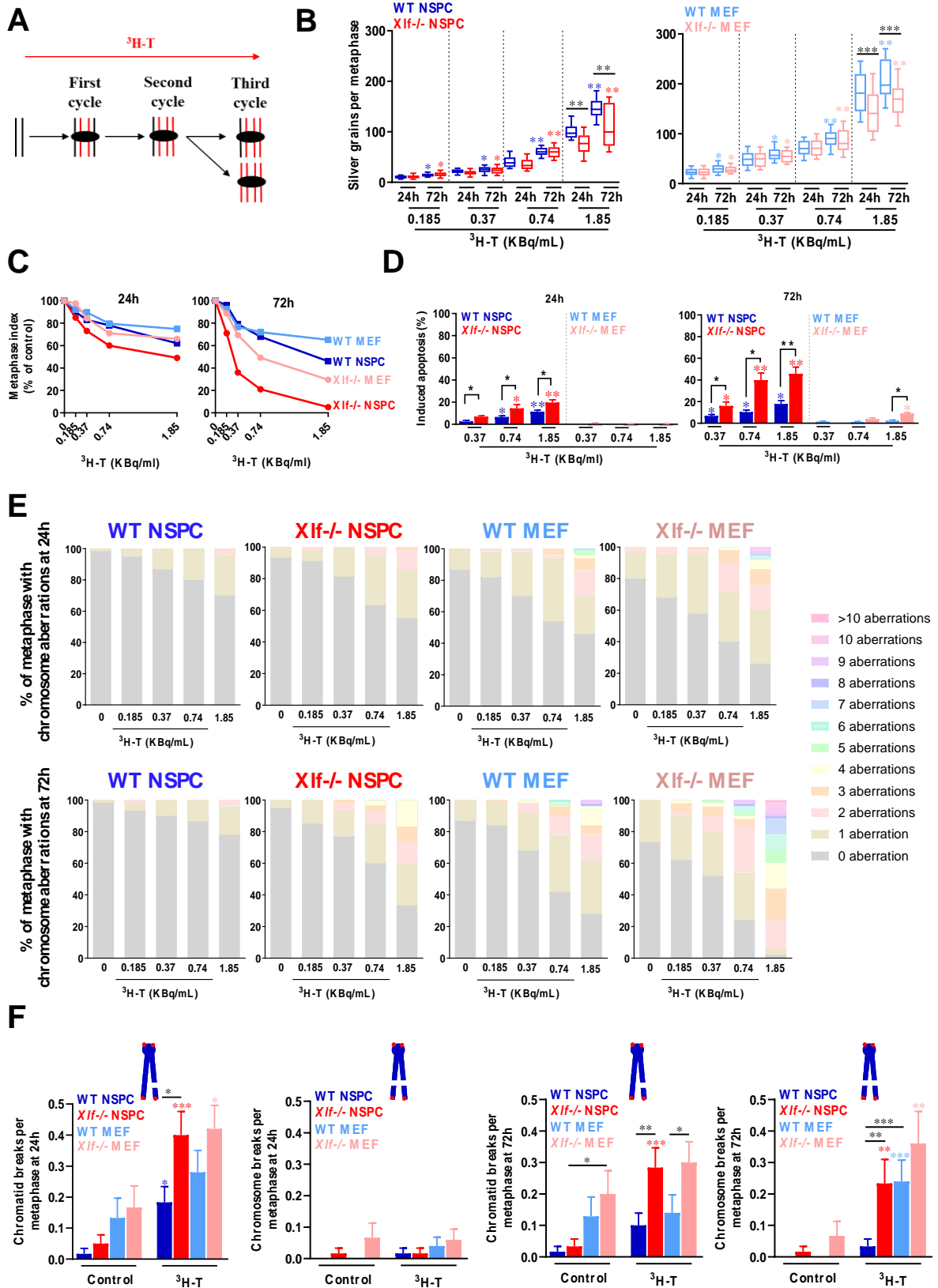
**Figure 1**



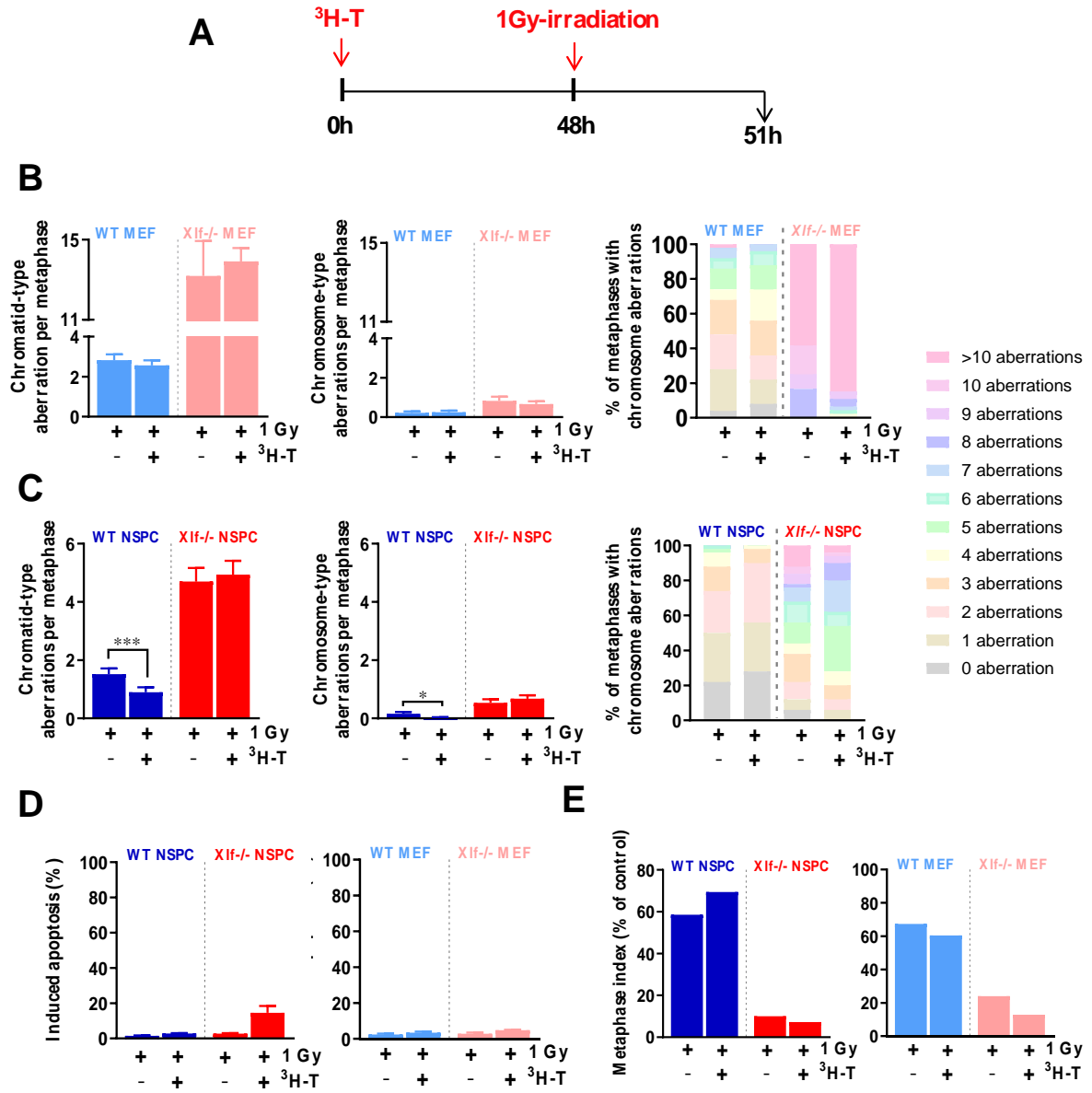
**Figure 2**



**Figure 3**

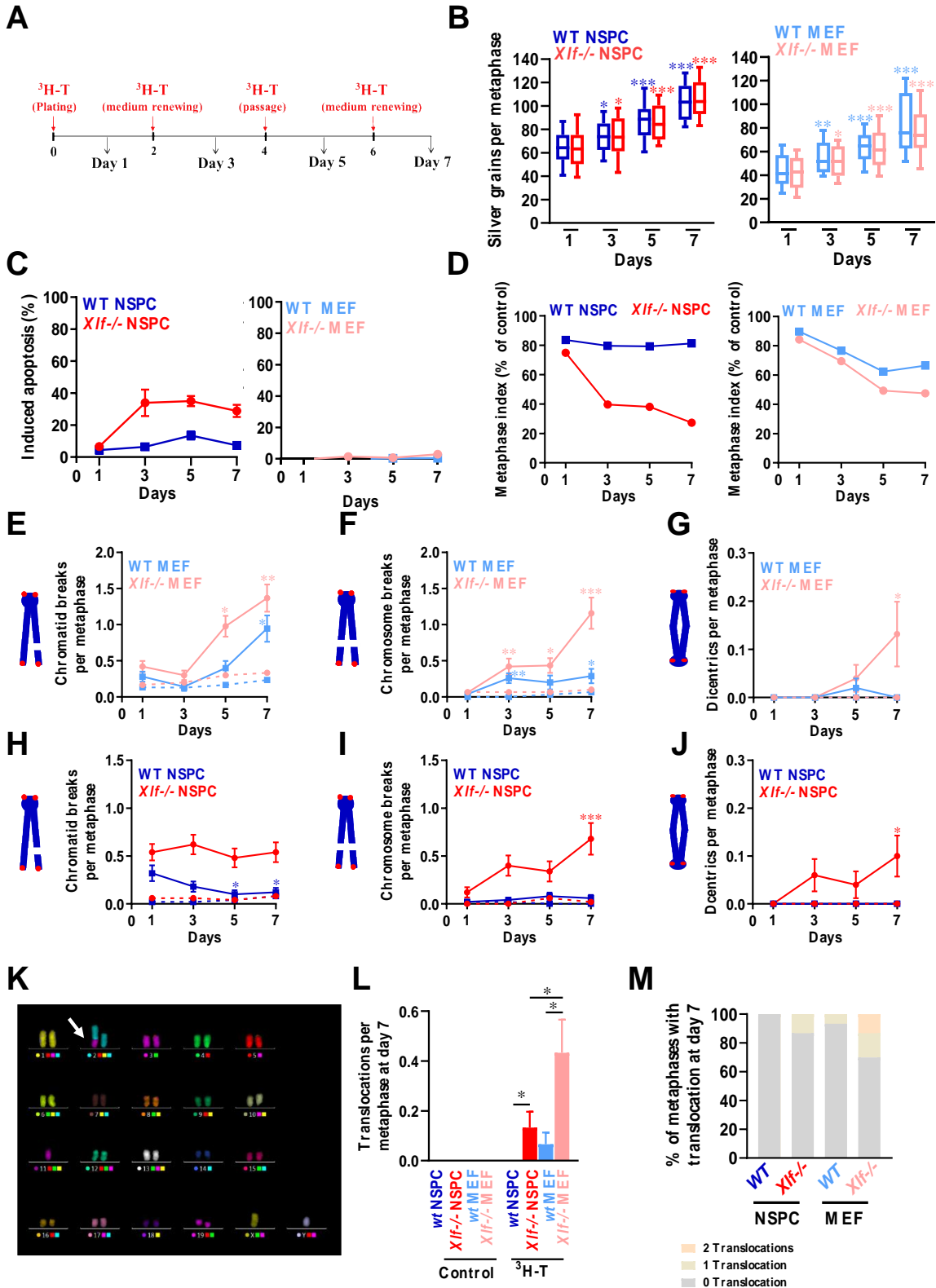


**Figure 4**

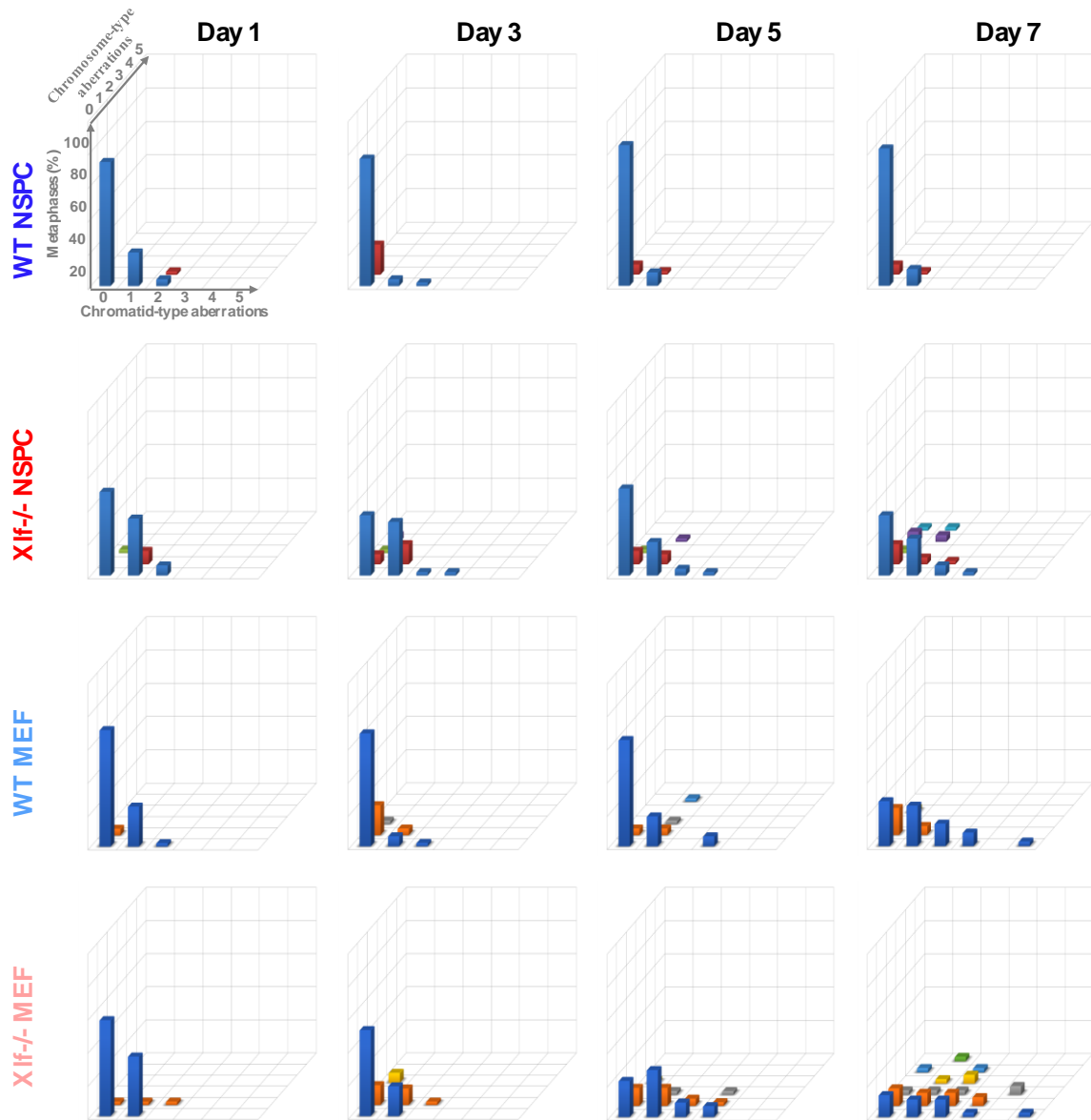




**Figure 5**



**Figure 6**



**Table 1**

			<sup>3</sup> H-T (KBq/mL)					
			0	0.185	0.37	0.74	1.85	
NSPC	24h	wt	CTB	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.13 ± 0.05	0.18 ± 0.05 ( <sup>#</sup> p = 0.02)	0.28 ± 0.07 ( <sup>#</sup> p < 0.001)
			CSB	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.06 ± 0.03
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		Xlf-/-	CTB	0.05 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.40 ± 0.08 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.01)	0.55 ± 0.10 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.02)
			CSB	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	72h	wt	CTB	0.02 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.16 ± 0.05 ( <sup>#</sup> p = 0.03)
			CSB	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02
		Xlf-/-	CTB	0.03 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.28 ± 0.06 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.006)	0.73 ± 0.19 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p < 0.001)
			CSB	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.23 ± 0.08 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.002)	0.43 ± 0.10 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p < 0.001)
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.07 ± 0.05 ( <sup>#</sup> p = 0.004)
MEF	24h	wt	CTB	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.28 ± 0.07	0.56 ± 0.11 ( <sup>#</sup> p = 0.009)	1.02 ± 0.19 ( <sup>#</sup> p < 0.001)
			CSB	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.04
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		Xlf-/-	CTB	0.17 ± 0.07	0.30 ± 0.08	0.42 ± 0.08	0.94 ± 0.15 ( <sup>#</sup> p < 0.001)	1.66 ± 0.28 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.02)
			CSB	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.05
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	72h	wt	CTB	0.13 ± 0.06	0.06 ± 0.03	0.14 ± 0.06	0.40 ± 0.07 ( <sup>#</sup> p = 0.02)	0.64 ± 0.12 ( <sup>#</sup> p = 0.002)
			CSB	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.30 ± 0.08 ( <sup>#</sup> p = 0.02)	0.32 ± 0.07 ( <sup>#</sup> p = 0.006)
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.04
		Xlf-/-	CTB	0.20 ± 0.07	0.24 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.66 ± 0.14 ( <sup>#</sup> p = 0.03)	1.46 ± 0.21 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p < 0.001)
			CSB	0.07 ± 0.05	0.16 ± 0.07	0.36 ± 0.10	0.72 ± 0.12 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p = 0.002)	1.18 ± 0.16 ( <sup>#</sup> p < 0.001, <sup>∇</sup> p < 0.001)
			Dicentrics	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.05	0.34 ± 0.08 ( <sup>#</sup> p < 0.001)

<sup>#</sup>p value from non-contaminated control, <sup>∇</sup>p value from wt control by Kruskal-Wallis test

Figure supp. 1

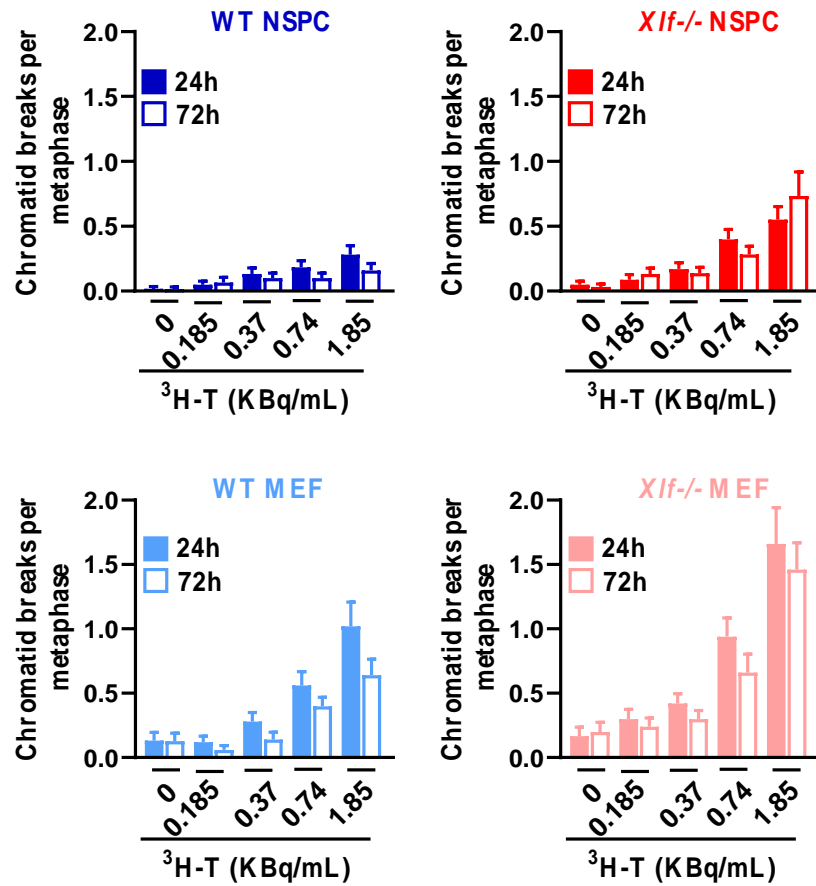
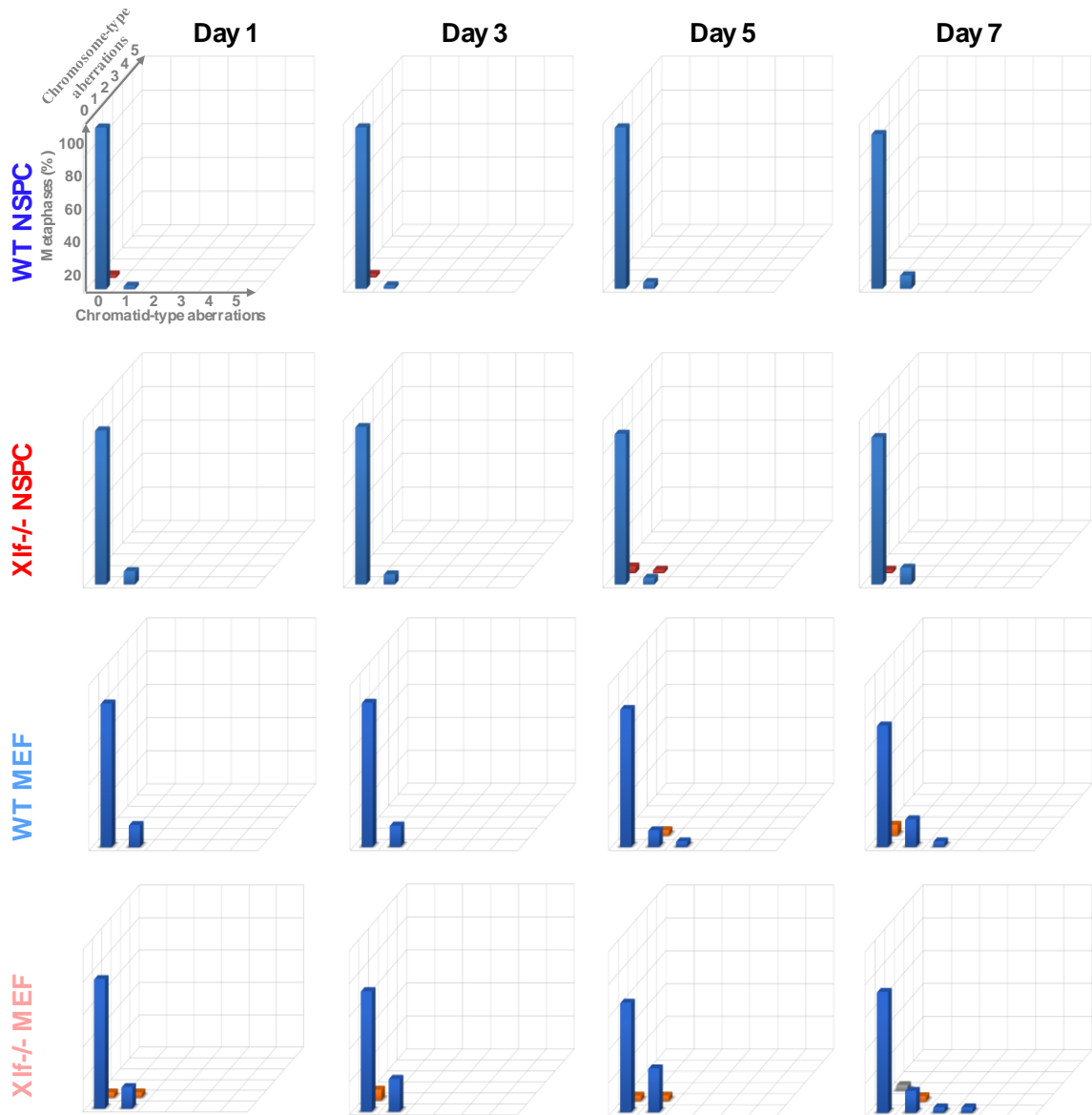


Figure supp. 2



### **3.2.3 Discussion article 2 : Comparaison de l'instabilité chromosomique des CSPN et des MEF *in vitro*, en réponse à un stress radiatif aigu ou chronique**

#### **Les CSPN maintiennent plus efficacement leur stabilité chromosomique que les MEF après un stress radiatif aigu ou chronique**

De par leur rôle essentiel dans le développement et leur capacité d'autorenouveau et de différenciation, les cellules souches nécessitent un maintien strict de leur stabilité génétique (Rocha et coll., 2013). La réponse des cellules souches aux dommages à l'ADN a été largement étudiée, notamment après exposition à un stress génotoxique comme les radiations ionisantes. Ces études ont permis de mettre en évidence une réponse robuste aux dommages à l'ADN au niveau de différents types de cellules souches (Wyles et coll., 2014 ; vital et coll., 2017). Les conclusions qui ont émergées de ces études impliquent une meilleure réparation de l'ADN au niveau des cellules souches. De plus, quand les dommages ne sont pas réparés, les cellules souches évitent leur amplification et leur transmission en déclenchant soit une apoptose ou une perte de pluripotence par une différenciation prématurée (Cho et coll., 2013 ; Lin et coll., 2005 ; Wyles et coll., 2014 ; vitale et coll., 2017). Il a été démontré que les cellules souches embryonnaires (CSE) réparent différentes formes de dommages à l'ADN de façon plus efficace que les cellules différenciées grâce à une expression augmentée des composants de la machinerie de réparation de l'ADN (Maynard et coll., 2008 ; Fan et coll., 2011). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) montrent également une augmentation de leur capacité de réparation de l'ADN en passant d'un état de quiescence vers un état activé (Beerman et coll., 2014).

Ici, nous avons montré que les CSPN présentent moins d'aberrations chromosomiques que les MEF après un stress génotoxique aigu ou chronique. En l'absence d'apoptose, cela indique que les CSPN réparent les dommages à l'ADN radio-induits de façon plus efficace que les MEF. Nos résultats sont accord avec une étude récente qui a démontré une réparation plus rapide des CDB radio-induits dans les CSPN que dans les MEF, qui serait due à une plus forte activité NHEJ, comme indiqué par une activité DNA-PKcs plus élevée dans les CSPN que dans les MEF (Kashiwagi et coll., 2018).

En revanche, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le stress génotoxique a induit moins d'aberrations chromosomiques dans les CSPN que dans les MEF, cela pourrait notamment être expliqué par un faible taux de ROS radio-induit dans les CSPN. En effet, il a été précédemment décrit que les CSH limitent le stress oxydatif par activation des voies ATM et FoxO (Ito et coll., 2004 ; Tothova et coll., 2007). De même, les CSE présentent une plus grande résistance aux dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif et les RI que les fibroblastes (Saretzki et coll., 2004). Il serait donc intéressant de quantifier les ROS radio-induits dans les CSPN et les MEF afin de comparer leur sensibilité au stress oxydatif.

Le maintien de la stabilité génétique dans les cellules souches passe également par le déclenchement de l'apoptose, qui permet l'élimination des cellules les plus endommagées. En effet, en réponse à une irradiation, une forte augmentation de l'apoptose a déjà été décrite dans les CSE (Filion et coll., 2009 ; Momcilovic et coll., 2010), les CSH (Cho et coll., 2013) et les CSPN (Nowak et coll., 2006 ; Acharya et coll., 2010 ; Rousseau et coll., 2012). En accord avec ces données, nous avons montré une augmentation de l'apoptose radio-induite dans les CSPN, contrairement au MEF. Cela indique que le seuil de tolérance aux dommages à l'ADN est plus bas dans les CSPN que dans les MEF et confirme le rôle de l'apoptose dans l'élimination des CSPN instables.

D'autre part, une exposition aux radiations ionisantes entrave l'autorenouveau des CSPN et entraîne leur différenciation (Schneider et coll., 2013). Cela permettrait d'empêcher l'amplification des cellules souches endommagées. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact des deux stress génotoxiques, aigu et chronique sur le potentiel de différenciation des CSPN.

La voie HR qui utilise comme matrice un brin d'ADN homologue intact est considérée comme une voie de réparation des CDB plus fidèle que le mécanisme NHEJ. HR est préférentiellement utilisée par les CSPN et les cellules souches embryonnaires (Orii et coll., 2006). Il serait donc intéressant de reproduire la même étude en utilisant des cellules provenant de souris déficientes pour un facteur impliqué dans le mécanisme HR, par exemple la protéine Rad54.

## **L'incorporation de la $^3\text{H-T}$ induit une réponse adaptative dépendante d'Xlf dans les CSPN**

Il est maintenant admis que les effets des faibles doses d'irradiation sont différents de ceux décrits par extrapolation des effets induits par les fortes doses d'irradiation (Vaiserman et coll., 2018, Ji et coll., 2019). L'une des caractéristiques des faibles doses d'irradiation est leur capacité à protéger les cellules contre les effets délétères d'une exposition ultérieure à une forte dose d'irradiation par un processus appelé réponse adaptative (Olivieri et coll., 1984 ; Wolf, 1998 ; Tapio et Jacob, 2007).

Le développement de la réponse adaptative est largement documenté et a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs types cellulaires, comme les lymphocytes, les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules tumorales (Zhao et coll., 2015 ; Olivieri et coll., 1984 ; Gajendiran et coll., 2001 ; Stoilov et coll., 2007, Schwarz et coll., 2008, Nenoï et coll., 2015). Le développement de la réponse adaptative a été démontré par l'évaluation de plusieurs paramètres biologiques, notamment la prolifération/mort cellulaire, l'instabilité chromosomique, le stress oxydatif et l'expression des protéines de signalisation et de réparation de l'ADN (Devic et coll., 2018). Parallèlement, de nombreux auteurs ont signalé une hétérogénéité dans le développement de la réponse adaptative, qui pourrait être en partie liée à la radiosensibilité génétiquement déterminée (Zhao et coll., 2015 ; Bosi et Olivieri, 1989; Vijayalaxmi et coll., 1989).

Nos résultats montrent que l'instabilité chromosomique induite par la  $^3\text{H-T}$  n'a pas augmenté avec le temps, comme le supposait son incorporation croissante dans l'ADN, ce qui laisse penser que les CSPN et les MEF ont développé une réponse adaptative. Il a été déjà décrit que la  $^3\text{H-T}$  induit une réponse adaptative dans les lymphocytes humains, qui une fois cultivés avec la  $^3\text{H-T}$  présentent moins de cassures chromatidiennes induites par une irradiation X ultérieure (Olivieri et coll., 1984). En corrélation, nous avons montré qu'une incorporation préalable de  $^3\text{H-T}$  dans l'ADN a réduit l'instabilité chromosomique induite par l'irradiation  $\gamma$  dans les CSPN mais pas dans les MEF. De plus, nous avons montré qu'en 7 jours d'incorporation de  $^3\text{H-T}$ , le taux de d'aberrations chromosomiques dans les CSPN diminuait progressivement, contrairement aux MEF qui présentaient sur le long terme une accumulation de cellules fortement endommagées. Par conséquent, nous suggérons que la contamination par la  $^3\text{H-T}$  déclenche une réponse adaptative plus efficace dans CSPN que dans MEF. Cette différence peut être expliquée par les capacités supérieures des CSPN à réparer les CDB par rapport au MEF. En effet, il a été démontré que le déclenchement de la réponse adaptative serait



lié à une augmentation des capacités de réparation de l'ADN, conférée par l'exposition préalable à une faible dose d'irradiation (Ikushima et coll., 1996 ; Klammer et coll., 2010 ; Bodgi et Foray, 2016 ; Devic et coll., 2018 ; Berthel et coll., 2019). Afin de mieux caractériser le développement de la réponse adaptative, il serait intéressant d'effectuer une analyse transcriptomique et protéomique, ce qui pourrait ainsi expliquer la différence entre les CSPN et les MEF. Récemment, une étude de réponse adaptative sur des cellules mononucléées du sang périphérique humaine au repos (G0-G1) a montré une augmentation significative de l'expression des protéines impliquées dans NHEJ ; Ku70/Ku80, XRCC4, DNA-PKcs et la ligase IV après une irradiation à 2 Gy entre les cellules pré-exposées à une faible dose de 0.1 Gy et celles qui n'ont pas été pré-exposées. En revanche, l'expression d'Artémis et d'XLF n'était pas significativement augmentée, ce qui suggère que XLF n'est pas indispensable au développement de la réponse adaptative dans les lymphocytes (Shelke et Das, 2015). A l'inverse, nous avons montré que la déficience d'XLF a supprimé l'effet protecteur de la  $^3\text{H-T}$  contre l'irradiation- $\gamma$  dans les CSPN. De plus, la réponse adaptative développée dans CSPN en réponse à la contamination prolongée par  $^3\text{H-T}$  est partiellement abolie par la déficience d'XLF. Ainsi, nos résultats démontrent clairement l'implication fonctionnelle d'XLF dans la réponse adaptative induite par la  $^3\text{H-T}$  dans les CSPN, contrairement à ce qui a été décrit précédemment dans les cellules mononucléées du sang périphérique humain au repos (Shelke et Das, 2015). Cette différence pourrait s'expliquer par la différence du type cellulaire et/ou leur état prolifératif.

Il convient également de souligner que certains auteurs considèrent l'apoptose comme un élément de la réponse adaptative dans la mesure où elle permet d'éliminer les cellules instables et de réduire le risque de cancer (Cregan et coll., 1999, Chen et Sakai, 2004). Nous avons montré une légère augmentation de l'apoptose dans les CSPN qui ont développé une réponse adaptative à une contamination chronique par la  $^3\text{H-T}$ . La caractérisation de l'instabilité chromosomique des CSPN dont l'apoptose est inhibée par inactivation de la protéine P53 ou par l'utilisation d'un inhibiteur chimique des caspases, tel que le Z-VAD-FMK, permettrait de révéler la contribution de l'apoptose dans la réponse adaptative.

De façon intéressante, nous avons montré que contrairement au CSPN, les MEF n'entrent pas en apoptose en réponse aux deux stress radiatifs. En effet, l'apoptose est une voie de mort cellulaire très spécifique qui dépend essentiellement de la protéine P53 et du type

cellulaire (Devic et coll., 2016). L'élimination des cellules endommagées pourrait également avoir lieu selon un mécanisme différent de l'apoptose comme la catastrophe mitotique ou l'entrée en sénescence prématurée. L'étude de l'activation de ces deux mécanismes dans les CSPN et les MEF en réponse au stress radiatif devrait également expliquer les différences de réponses entre les CSPN et les MEF.

## **4. DISCUSSION GENERALE**

Le cerveau en développement est extrêmement sensible à l'induction de dommages à l'ADN, ce qui se traduit par le développement de plusieurs pathologie neurodéveloppementales (McKinnon et coll., 2017). Cependant, des études récentes suggèrent également la survenue d'une instabilité génétique contrôlée dans les CSPN avec un potentiel rôle dans la physiologie cérébrale (Wei et coll., 2016 et 2018 ; Alt et coll., 2018). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de dévoiler les mécanismes régissant le contrôle et le maintien de la stabilité génétique des CSPN au cours du développement, ce qui pourrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies neuropsychiatriques. Le but principal de ma thèse était donc d'étudier la stabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire et après exposition à un stress radiatif aigu ou chronique *in vitro*.

### **Stabilité chromosomique dans les CSPN embryonnaires**

Nous avons montré une instabilité chromosomique dans les CSPN isolés du cerveau embryonnaire, constituée essentiellement de cassures chromatidiennes. Ce qui montrent une induction de dommages à l'ADN après réplication en S et G2. En parallèle, les CSPN cyclants *in vitro* montrent une meilleure préservation de l'instabilité chromosomique par rapport au MEF après un stress radiatif. Cela pourrait être expliqué par une habitude des systèmes de réparation de l'ADN conférée par la réparation des dommages à l'ADN endogènes. Les CSPN semblent disposer de meilleures capacités de réparation de l'ADN leur permettant de prendre en charge un grand nombre de dommages à l'ADN induits de façon aiguë ou chronique. Cela est en accord avec une récente étude qui a montré une cinétique de réparation plus rapide et une plus forte expression de DNA-PKcs dans les CSPN que dans les MEF (Kashiwagi et coll., 2018).

La maintenance de la stabilité génétique des CSPN ne se limite pas à une meilleure réparation des dommages à l'ADN, mais implique également une sensibilité accrue à l'apoptose radio-induite, déjà décrite *in vivo* dans le cerveau embryonnaire après irradiation (Semont et coll., 2004 ; Nowak et coll., 2006 ; Acharya et coll., 2010). Nos résultats démontrent également une plus forte sensibilité à l'apoptose dans les CSPN que dans les MEF. L'apoptose promeut la stabilité chromosomique en éliminant les cellules les plus instables dans les cultures de CSPN.

La réponse aux dommages à l'ADN des CSPN leur confère également la capacité de résister à un stress chronique par le développement d'une réponse adaptative, que nous avons mis en évidence *in vitro* en cultivant les cellules avec de la thymidine tritiée. La réponse adaptative s'appuie sur une augmentation des capacités de réparation de l'ADN, conférée par l'exposition à une faible dose d'irradiation (Shelke et coll., 2015, Devic et coll., 2018), et agit conjointement avec l'apoptose pour maintenir un pool de cellules intactes. Vérifier l'induction d'une réponse adaptative *in vivo* dans le cerveau en développement permettrait de mieux comprendre la capacité des CSPN à maintenir leur stabilité génétique et à assurer un développement normal du cerveau. Une étude a suggéré un mécanisme de réponse adaptative, impliquant une augmentation du transfert de la protéine ATM du cytoplasme vers le noyau (ATM nucleo-shuttling) (Bodgi et coll., 2016). L'immunomarquage de la protéine ATM phosphorylée permettrait de montrer si l'incorporation de <sup>3</sup>H-T et l'activation de la réponse adaptative dans les CSPN implique aussi la relocalisation d'ATM et ainsi une meilleure et/ou plus rapide reconnaissance des CDB. Cette relocalisation d'ATM pourrait ne pas voir lieu et/ou selon une cinétique plus lente dans les MEF, ce qui pourrait expliquer l'absence et/ou la faible efficacité de leur réponse adaptative.

L'exposition à une irradiation *in utero* a été associée à un changement de destin des CSPN au cours du développement, en entraînant une neurogenèse prématurée (Schneider et coll., 2013), ce qui empêche l'amplification des cellules souches endommagées. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier le potentiel de différenciation des CSPN après exposition à un stress chronique, afin de révéler s'ils ont gardé leur potentiel de cellules souches.

Nos résultats indiquent que la plupart des CSPN cyclants sont exempts d'aberrations chromosomiques même après 7 jours d'exposition à la <sup>3</sup>H-T. La technique de « Single cell RNA Seq » permettra d'identifier une éventuelle sélection de cellules ayant un profil d'expression particulier, notamment après une période plus longue (au-delà de 7 jours) de contamination. Cela permettra en particulier de définir le risque de transformation tumorale des cellules souches neurales exposées à un stress chronique.

De plus, un modèle de ségrégation asymétrique des brins d'ADN a été proposé pour permettre aux cellules souches d'éviter l'accumulation de lésions d'ADN dues aux erreurs de réplication dans le brin neosynthétisé, en maintenant préférentiellement le brin « matrice » dans

les cellules souches (Potten et coll., 2002). L'étude d'un tel mécanisme dans les CSPN en réponse à un stress chronique ( $^3\text{H-T}$ ) permettrait de montrer si les dommages à l'ADN sont asymétriquement répartis dans les cellules filles, ce qui pourrait induire la différenciation de la cellule fille la plus endommagée tout en préservant la cellule souche.

Dans leur ensemble, ces résultats démontrent le lien existant entre la maintenance de la stabilité génétique et les fonctions essentielles des CSPN au cours du développement. En tant que cellules différenciées et ayant un potentiel prolifératif restreint, les MEF seraient plus permissives à l'instabilité génétique que les CSPN qui s'autorenouvellent pour assurer le maintien du pool de cellules souches et qui se différencient pour générer des cellules spécialisées.

### **La déficience d'XLF conduit à une perte partielle de l'activité NHEJ, responsable d'altérations neurocognitives et d'une radiosensibilité**

Les modèles de souris déficientes pour les facteurs du mécanisme NHEJ présentent des phénotypes caractérisés par des dysfonctionnements de sévérité très variée. Par exemple, une déficience de XRCC4, ligase IV, Ku ou DNA-PKCs est associée à une altération de la neurogenèse et une mort neuronale (Gao et coll., 1998 ; Gu et coll., 1999). Cependant, seule la déficience de XRCC4 ou de la ligase IV conduit à une létalité embryonnaire (Gao et coll., 1998). Quant aux souris déficientes pour XLF, elles sont viables et présentent une croissance normale avec une légère altération du système immunitaire (Li et coll., 2008). La variabilité de ces phénotypes suggère que l'importance des facteurs en question pour la voie NHEJ est également très variable.

Nous avons montré dans l'article 1, une augmentation de l'apoptose dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. Toutefois cette apoptose reste très inférieure à celle associée à la déficience de XRCC4 ou de la Ligase IV (Gao et coll., 1998). De plus, nos résultats de l'article 2 démontrent que malgré une très forte augmentation de l'instabilité chromosomique dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup>, 3h après l'irradiation- $\gamma$ , la plupart des cellules cyclantes à 24h de l'irradiation ont réparé la majorité des cassures radio-induites. Il convient également de noter que les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> sont moins instables que les MEF *Xlf*<sup>-/-</sup>. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que :

- la déficience d'XLF ne provoque qu'une perte partielle de l'activité NHEJ,

- l'activité NHEJ résiduelle permet aux cellules *Xlf*<sup>-/-</sup> de réparer les CDB spontanées et radio-induites,
- et que l'activité NHEJ résiduelle est plus élevée dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> que dans les MEF *Xlf*<sup>-/-</sup>.

Nos résultats ainsi que le phénotype légèrement altéré des patients et des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> montrent que la perte d'XLF n'abolit pas complètement la réparation par NHEJ et suggèrent l'intervention d'un ou plusieurs autres facteurs pour compenser son absence.

L'un de ces mécanismes comprend l'axe de réparation des CDB *via* ATM - H2AX - 53BP1. En effet, il a été montré que la déficience combinée de l'un de ces facteurs avec celle d'XLF provoque de graves défauts de la recombinaison V(D)J et du développement lymphocytaire, même si la perte de l'une de ces protéines n'est individuellement pas préjudiciable à ce processus (Zha et coll., 2011 ; Liu et coll., 2012 ; Oksenyuk et coll., 2012). Plus récemment, une voie de compensation de la déficience d'XLF par la protéine PAXX a été identifiée (Balmus et coll., 2016). PAXX est un paralogue de XRCC4 et d'XLF, nouvellement identifié qui interagit avec Ku et permet de stabiliser les facteurs NHEJ sur la chromatine et favorise la réparation de l'ADN par NHEJ (Ochi et coll., 2015). Les souris *Paxx*<sup>-/-</sup> sont viables avec un développement normal. Cependant, les souris doublement déficientes pour XLF et PAXX présentent une létalité embryonnaire due à une forte instabilité génétique et une apoptose neuronale massive (Balmus et coll., 2016). Cela suggère donc une redondance fonctionnelle entre XLF et PAXX. Ainsi, une évaluation de l'expression des protéines impliquées dans la voie NHEJ et plus particulièrement PAXX permettrait d'identifier les voies permettant de compenser la perte d'XLF dans les CSPN et les MEF, ce qui pourrait également expliquer le phénotype légèrement altéré des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>.

D'autre part, la déficience d'un ou plusieurs composants de NHEJ est associée à un niveau élevé de translocations. Cela est lié à la mise en place d'un mécanisme de jonction d'extrémités peu fidèle, dénommé NHEJ alternatif (Alt-NHEJ) (Boboila et coll., 2010 ; Simsek et Jasin 2010). Nos résultats (article 2) indiquent la formation de plusieurs formes d'aberrations chromosomiques dans les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> et MEF *Xlf*<sup>-/-</sup> témoignant d'une réparation infidèle des CDB : notamment les dicentriques et les radiaux après irradiation- $\gamma$  et les translocations après plusieurs cycles d'incorporation de la <sup>3</sup>H-T. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de l'activation de la voie de réparation par Alt-NHEJ dans les CSPN et MEF *Xlf*<sup>-/-</sup>.

Enfin, nos résultats ont montré que l'incorporation de  $^3\text{H-T}$  induit une réponse adaptative dans les CSPN mais pas dans les MEF. Les effets de la  $^3\text{H-T}$  démontrent bien que la réponse aux dommages de l'ADN diffère de manière très significative entre les CSPN et les MEF. L'incorporation de  $^3\text{H-T}$  représente donc un outil de choix pour l'étude du stress radiatif chronique et la caractérisation des mécanismes activés.

Notre étude réalisée *in vitro* a clairement mis en évidence la radio-sensibilité des cellules déficientes pour *Xlf*, aussi bien dans les CSPN que dans les MEF. Parallèlement, notre étude *in vivo* a dévoilé que les CSPN *Xlf*<sup>-/-</sup> était plus radiosensibles que les CSPN *wt* et ce dès la très faible dose de 10 mGy. L'ensemble de ces résultats dévoilent clairement qu'une faible défaillance du système de réparation peut induire une radio-sensibilité non négligeable qui devra être prise en compte comme un facteur de radio-sensibilité individuelle au cours du développement.



## **5. CONCLUSION**

Au cours de mon projet de thèse, je me suis intéressé à l'étude de la maintenance de la stabilité génétique des CSPN dans le cerveau en développement et après une exposition à un stress radiatif aigu ou chronique *in vitro*.

Dans un premier temps, nous avons réussi à développer un protocole permettant l'obtention de métaphases de CSPN directement après dissociation du cortex en développement, sans culture cellulaire préalable. Cela permet de se rapprocher des conditions physiologiques. C'est ainsi, que nous avons mis en évidence une instabilité chromosomique dans les CSPN embryonnaires, qui est plus marquée au cours des premiers stades du développement. Ces résultats viennent à l'appui de récentes études qui ont révélé la formation de plusieurs clusters de CDB au sein des CSPN (Wei et coll., 2016 et 2018). Les auteurs de ces études suggèrent un mécanisme de recombinaison entre ces clusters de CDB, similaire à celui du V(D)J, et qui serait responsable de la génération de la diversité neuronale (Alt et coll., 2018).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai également contribué à l'étude des atteintes neurologiques associées à la déficience d'XLF, un membre du complexe de ligature lors du mécanisme NHEJ. Les souris transgéniques déficientes pour XLF ont été déjà caractérisées (Li et coll., 2008), cependant, les conséquences neurologiques de la perte d'XLF restent largement méconnues. Dans ce projet, nous avons mis en évidence des atteintes neurocognitives chez les souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. Pour la première fois, nous avons montré une augmentation de l'instabilité chromosomique des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup>. Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent deux hypothèses pour expliquer les atteintes neurologiques des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> : d'une part, une légère augmentation de l'apoptose au sein des progéniteurs neuraux au début de la neurogenèse qui s'étend par la suite vers les neurones post-mitotiques en fin de neurogenèse. D'autre part, un autre mécanisme plus important implique un changement de destin des CSPN vers une neurogenèse précoce, conduisant en fin de compte à moins de neurones. Ainsi, les souris déficientes pour XLF représentent un nouveau modèle d'altérations neurocomportementales dues à la déficience de réparation de l'ADN.

Il est maintenant admis qu'il existe chez l'homme des polymorphismes importants des gènes de réparation de l'ADN, ce qui détermine leur radiosensibilité et leur prédisposition au développement de cancer. Notre étude a clairement identifié la différenciation prématurée

comme un mécanisme majeur à l'origine des troubles neurocomportementaux associés à un déficit de réparation de l'ADN.

Je me suis intéressé par la suite à l'étude du maintien de la stabilité chromosomique des CSPN cultivés *in vitro* et exposés à un stress génotoxique aigu (irradiation  $\gamma$ ) ou chronique (incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN).

D'une façon générale, les grandes capacités d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules souches sont associées à une réponse robuste aux dommages à l'ADN, leur permettant de maintenir leur intégrité génétique et éviter la transmission des lésions d'ADN à leur cellules fille, plus efficacement que les autres cellules non-souches (Wyles et coll., 2014 ; Vitale et coll., 2017). Ici, nous avons démontré que les CSPN préservent leur stabilité chromosomique après exposition à un stress génotoxique aigu ou chronique de façon plus efficace que les MEF, qui sont des cellules proliférantes mais non-souches. Nos résultats suggèrent que le maintien de la stabilité chromosomique dans les CSPN implique à la fois une meilleure réparation des CDB, mais également une sensibilité à l'apoptose radio-induite qui permet d'éliminer les cellules les plus endommagées.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence le développement d'une réponse adaptative à un stress génotoxique chronique induit par une incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des CSPN et des MEF. En revanche, la réponse adaptative semble être plus efficace dans les CSPN que dans les MEF, compte tenu de leur capacité de réparation de l'ADN plus élevée. Ainsi, nous montrons que la réponse adaptative agit conjointement avec l'apoptose et les arrêts du cycle cellulaire afin de maintenir la stabilité chromosomique des CSPN confrontées à un stress génotoxique chronique.

Quant à l'implication d'XLF dans la réponse aux deux stress radiatifs, nous avons démontré un effet significatif de la perte d'XLF sur la stabilité chromosomique, uniquement quand les cellules sont confrontées à un niveau élevé de CDB. L'ensemble de nos résultats suggèrent que la déficience d'XLF conduit à une perte partielle de l'activité NHEJ, qui à l'aide d'une voie de compensation, très peu connue pour l'instant, arrive à réparer les CDB endogènes ou induites par un stress génotoxique.

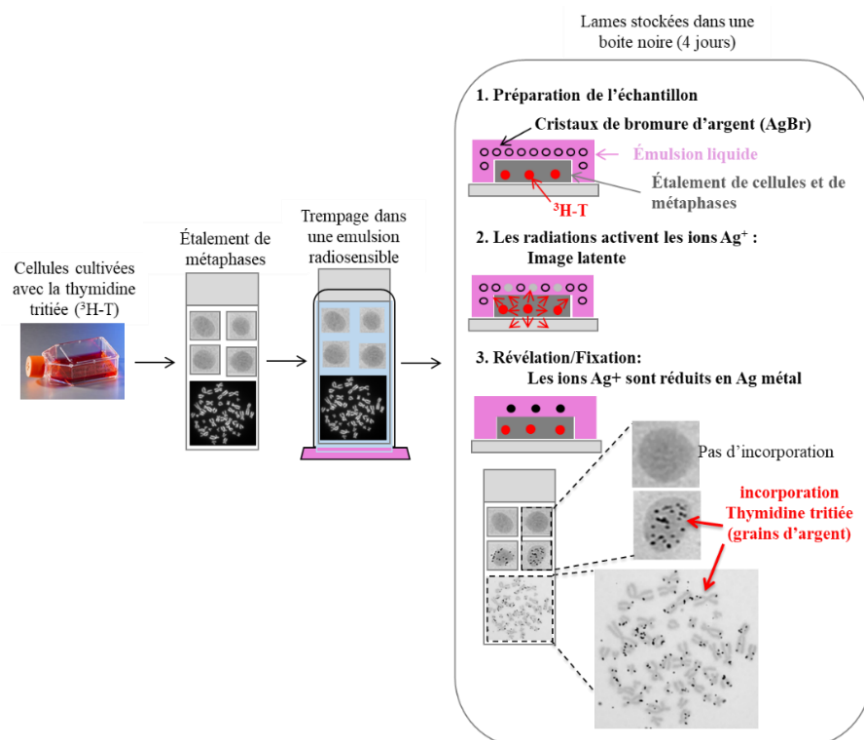
Au final, nos résultats montrent une régulation très fine de la stabilité génétique au sein des CSPN embryonnaires. En effet, en dépit d'une instabilité chromosomique qui survient au début de la neurogenèse avec un éventuel rôle dans la diversité neuronale, les CSPN manifestent un maintien strict de la stabilité génomique face à un stress génotoxique aigu ou chronique. Notre étude comparative avec les MEF a démontré la supériorité des CSPN à préserver leur intégrité chromosomique, en s'appuyant à la fois sur une meilleure réparation des dommages à l'ADN et une apoptose, qui permet d'éliminer les cellules très instables. Cela permet d'éviter la transmission de dommages aux cellules filles et d'empêcher toute transformation néoplasique qui peut conduire à un développement tumoral. Un aspect qui reste très peu documenté dans la littérature est le lien entre les fonctions des différents types cellulaires et leurs niveaux de tolérance aux dommages à l'ADN. Il serait donc évident que des types cellulaires différenciés comme les fibroblastes soient capables de tolérer un niveau élevé de dommages à l'ADN de par leur exposition directe à plusieurs agents génotoxiques (par exemple les fibroblastes de la peau) et leur courte durée de vie. En revanche, les cellules souches prolifèrent et se différencient activement pour générer les tissus de l'organisme et maintenir l'homéostasie à l'âge adulte, ce qui nécessite donc un maintien strict de leur intégrité génétique.

## **6. ANNEXE**

### **Optimisation de la méthode d'autoradiographie et mise au point d'un protocole pour la caractérisation des plaques de tungstène tritié**

L'autoradiographie est une technique qui permet la détection et la localisation de molécules marquées par un élément radioactif dans un tissu à des niveaux cellulaires et sub-cellulaires. Elle permet ainsi de déterminer la bio-distribution d'une substance radioactive dans un organisme et/ou un organe, la localisation de l'interaction ligand-récepteur, l'interaction entre une molécule et sa cible ou des processus métaboliques. Durant ma thèse, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la détection intracellulaire de la thymidine tritiée dans les CSPN et les MEF.

L'autoradiographie est fondée sur l'utilisation de films ou d'émulsions photographiques radiosensibles. Dans ce dernier cas, l'émulsion qui est composée d'une dispersion de cristaux d'halogénure d'argent (bromure d'argent) dans de la gélatine est directement mise au contact de l'échantillon. Pendant la phase d'exposition, les particules émises lors de la décroissance radioactive interagissent avec les cristaux d'halogénure d'argent et activent les ions  $Ag^+$ . Pendant la phase de révélation de l'émulsion, ces ions  $Ag^+$  sont réduits en Ag métal ce qui aboutit à la formation de grains d'argent, détectables et quantifiables en microscopie optique. (Figure 23).



**Figure 23.: Schématisation des étapes clés du protocole d'autoradiographie cellulaire.**

Plusieurs facteurs tels que l'isotope utilisé ou le type d'émulsion influencent l'efficacité de l'autoradiographie. Les émulsions argentiques actuellement disponibles permettent une

détection spécifique de la localisation du tritium mais avec une résolution et une sensibilité ne permettant pas l'étude des faibles doses de radioactivité. Notre objectif était donc d'optimiser l'autoradiographie en développant de nouvelles émulsions argentiques, plus résolutive et plus radiosensibles.

Afin d'améliorer la résolution de la méthode d'autoradiographie, nous avons cherché à réduire la taille des cristaux d'halogénure d'argent (40 à 100 nm) par rapport à ceux présents dans l'émulsion commerciale (400 nm). Pour cela, nous avons travaillé en collaboration avec Yves GENTET, spécialiste de la production d'émulsions argentiques pour l'holographie (Ultimate Holography®). La diminution de la taille des cristaux d'halogénure d'argent impose des temps d'exposition plus longs du fait de la perte de sensibilité des émulsions. Pour contrer cette perte de sensibilité, nous nous sommes appuyés sur le travail du Professeur Jacqueline Belloni qui est associée à ce projet. Directrice de recherche émérite et Médaille d'argent du CNRS, Jacqueline Belloni a montré que l'adjonction d'ions formiates ( $\text{HCO}_2^-$ ) dans l'émulsion argentique permettait d'augmenter sa sensibilité d'un facteur très important, probablement compris entre 10 et 100 (Belloni 1999). En effet, cela devait permettre de diminuer la taille des grains et donc d'augmenter la résolution spatiale de la mesure, tout en maintenant un temps d'exposition court. Cette augmentation de sensibilité est essentielle afin de pouvoir étudier les effets des faibles doses de tritium.

## **6.1 Résultats et progression des travaux**

Pour optimiser l'autoradiographie cellulaire, Yves Gentet a produit de nouvelles émulsions argentiques avec des cristaux de bromure d'argent (AgBr) de taille réduite (40 nm et 100 nm), ainsi qu'une émulsion à 100 nm, dopée aux ions formiates.

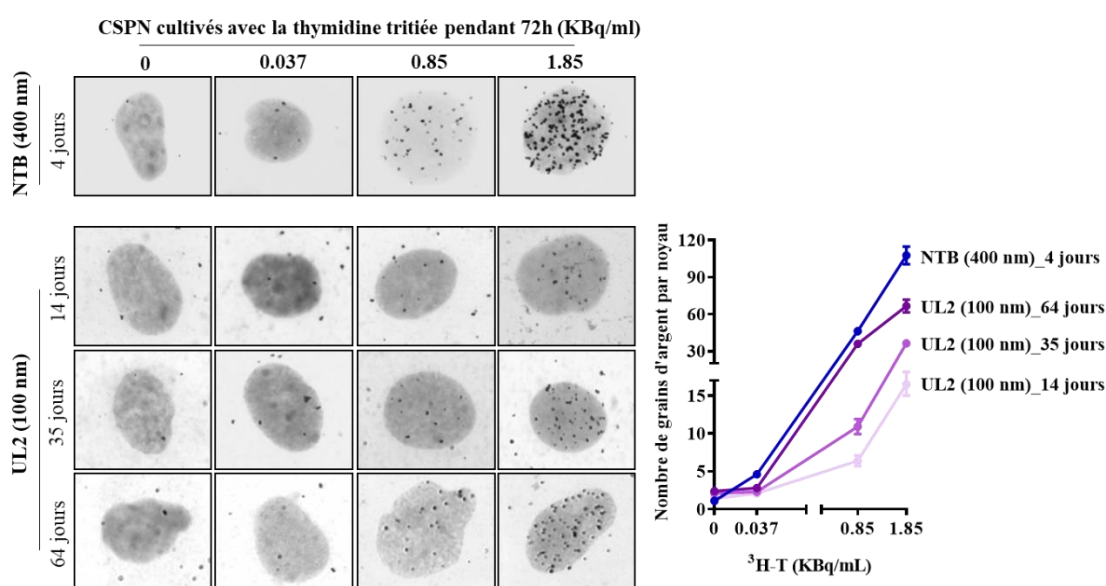
Les différentes émulsions ont été testées sur des cultures primaires de CSPN humains (collaboration avec l'Hôpital Bécclère) qui ont été contaminé par la thymidine tritiée (0 ; 0,037 ; 0,85 et 1,85 KBq/mL) pendant 72H. Afin de définir les conditions optimales d'utilisation de ces émulsions, nous avons fait varier plusieurs paramètres comme le temps d'exposition de l'émulsion, la température et le temps de révélation.

Jusqu'à présent les émulsions argentiques fournies par Yves GENTET n'ont pas permis d'optimiser, ni la résolution, ni la sensibilité de l'autoradiographie (Tableau 7).

Emulsions	Résultats
<b>UL 1 (40 nm)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Absence de grains d'argent spécifiques, même après 35 jours d'exposition.</li> </ul>
<b>UL 2 (100 nm)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Détection de grains d'argent spécifiques (après 14, 35 et 64 jours d'exposition,</li> <li>Moins sensible que l'émulsion commerciale NTB (400 nm) même après 64 jours d'exposition,</li> <li>Léger bruit de fond,</li> <li>Perte de stabilité de l'émulsion lors des tests suivants.</li> </ul>
<b>UL 3 (100 nm + ions formiate)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Absence de grains d'argent spécifiques,</li> <li>Très fort bruit de fond.</li> </ul>

**Tableau 7 : Récapitulatif des résultats d'autoradiographie cellulaire réalisée avec les émulsions argentiques produites par la société Ultimate Holography.**

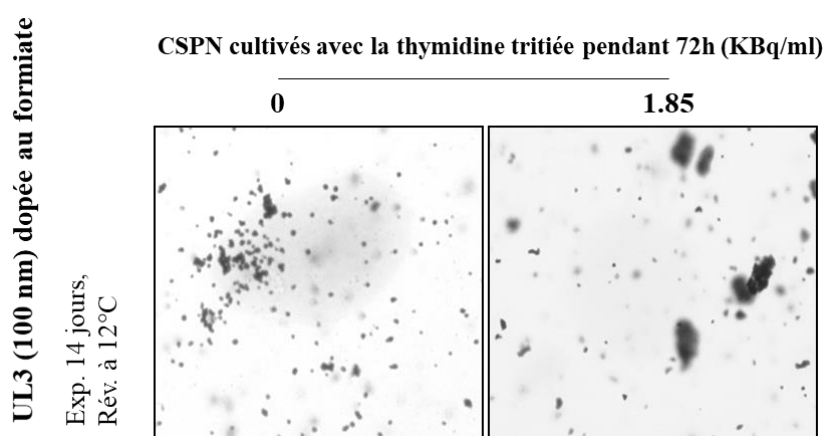
Seule l'émulsion UL2 contenant des cristaux d'AgBr à 100 nm a permis une détection spécifique de grains d'argent. En revanche, sa sensibilité était beaucoup plus faible que celle de l'émulsion commerciale NTB (400 nm). En effet, le nombre de grains d'argent révélés avec l'émulsion à 100 nm, exposée pendant 64 jours ( $66,6 \pm 5,2$  pour 1,85 KBq/mL) est plus faible que le nombre de grains d'argent révélés avec l'émulsion commerciale NTB (400 nm) exposée seulement pendant 4 jours ( $107,7 \pm 7,2$  pour 1,85 KBq/mL) (Figure 24).



**Figure 24 : Détection spécifique de grains d'argent avec l'émulsion UL 2 (100 nm) qui reste nettement moins sensible que l'émulsion commerciale NTB (400 nm).**



La perte de sensibilité de l'émulsion UL 2 (100 nm) serait due à la réduction de la taille des cristaux d'AgBr par rapport à ceux de l'émulsion commerciale NTB (400 nm). L'ajout des ions formiates devait améliorer la sensibilité de l'émulsion UL2. Cependant, les résultats obtenus avec l'émulsion UL3 contenant des cristaux d'AgBr à 100 nm, dopés aux ions formiates montrent un très fort bruit de fond, sans détection de grains d'argent spécifique (Figure 25).



**Figure 25 : Absence de détection spécifique de grains d'argent avec l'émulsion UL 3 (100 nm) dopée aux ions formiates, qui montre un fort bruit de fond.**

## 6.2 Développement d'un protocole d'autoradiographie pour la caractérisation des plaques de tungstène tritié

Le projet ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor) vise à démontrer la faisabilité scientifique et technologique de l'utilisation de la réaction de fusion nucléaire à des fins énergétiques. Le tungstène a été choisi pour recouvrir la paroi du réacteur qui sera en contact avec le plasma de fusion alimenté par du deutérium et du tritium. Il est donc essentiel d'étudier l'interaction du tritium avec la surface du tungstène et son éventuel piégeage dans les matériaux constitutifs du tokamak ITER. La localisation (boucles de dislocation, lacunes ou joints des grains) et la physique de ce piégeage sont encore mal connus. Les études actuellement développées (analyse par faisceau d'ions) pour comprendre ce phénomène sont très coûteuses et leur sensibilité permet difficilement de conclure. La détection du tritium par autoradiographie

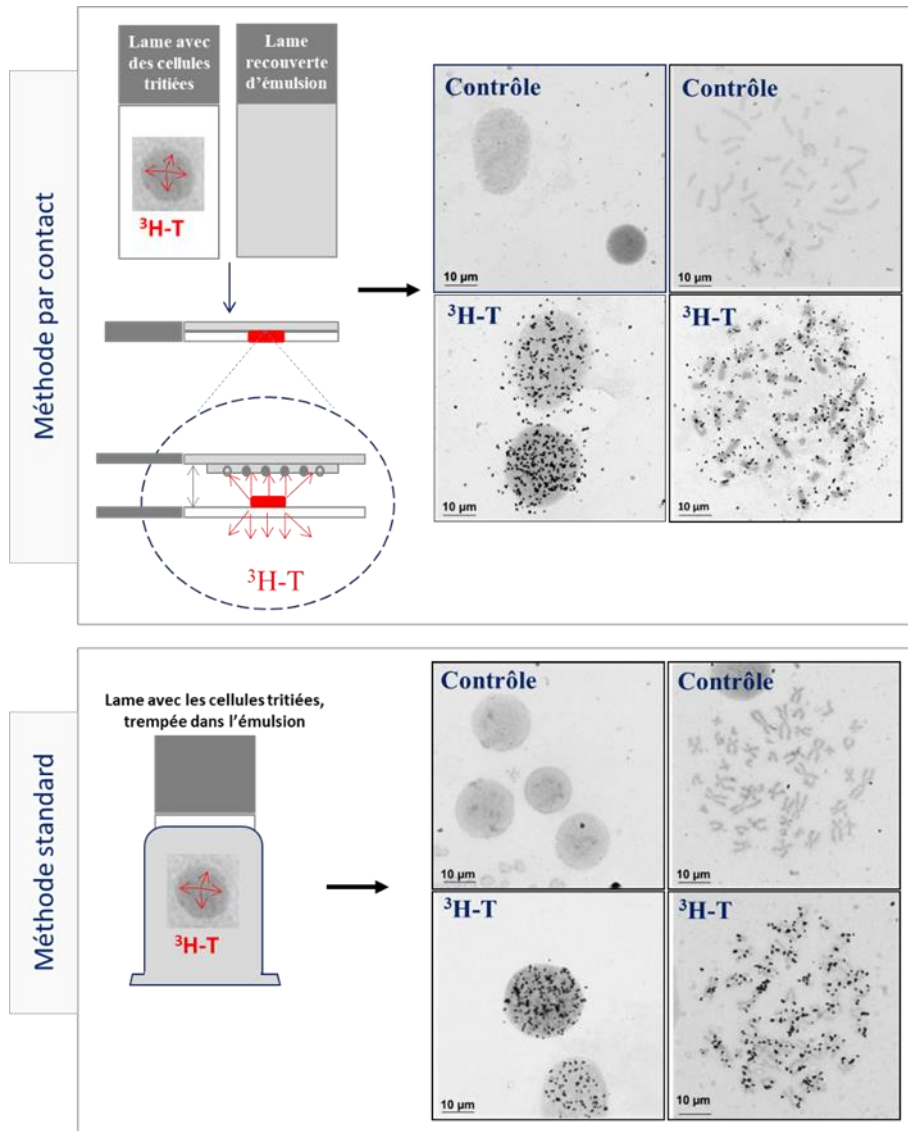
est moins couteuse et permet si elle est résolutive en taille d'accéder à des informations pertinentes sur le piégeage du tritium à la surface d'échantillons métalliques.

Pendant mon travail de thèse, nous avons donc travaillé sur la mise au point d'un protocole d'autoradiographie permettant la localisation du tritium dans des matériaux modèles, des mono et poly-cristaux de tungstène tritié. Comme les plaques de tungstène ne sont pas transparentes, le protocole standard d'autoradiographie consistant à déposer une couche d'émulsion sur l'échantillon tritié n'est pas compatible avec son observation ultérieure en microscopie optique. Pour contourner ce problème, nous avons développé une autoradiographie fondée sur le contact entre l'échantillon tritié et une lame préalablement recouverte d'émulsion radiosensible.

Pendant la phase de mise au point du protocole, des lames recouvertes de noyaux et de chromosomes métaphasiques de CSPN humains cultivés en présence de thymidine tritiée ont servi à simuler la plaque de tungstène tritié. Nous avons ajusté le temps de séchage de l'émulsion ainsi que la procédure de mise en contact afin de parvenir à une détection spécifique de grains d'argent tout en maintenant une bonne résolution (Figure 26).

La mise en contact de l'échantillon tritié avec la lame recouverte d'émulsion radiosensible implique une perte de résolution spatiale due à l'existence d'un petit espace entre la source radioactive et les cristaux d'AgBr contenus dans l'émulsion. Afin de remédier à ce problème, nous avons réduit le temps de séchage de l'émulsion (20 min au lieu de 2h) ce qui devait permettre un meilleur contact entre l'émulsion et la surface de la lame tritiée. Nous avons également utilisé une cassette d'autoradiographie pour forcer ce contact entre les deux lames. Les émissions radioactives de l'échantillon activent les cristaux d'AgBr de l'émulsion étalée sur la lame de verre, donnant lieu après révélation à une distribution de grains d'argent image de la distribution du tritium sur l'échantillon tritié.

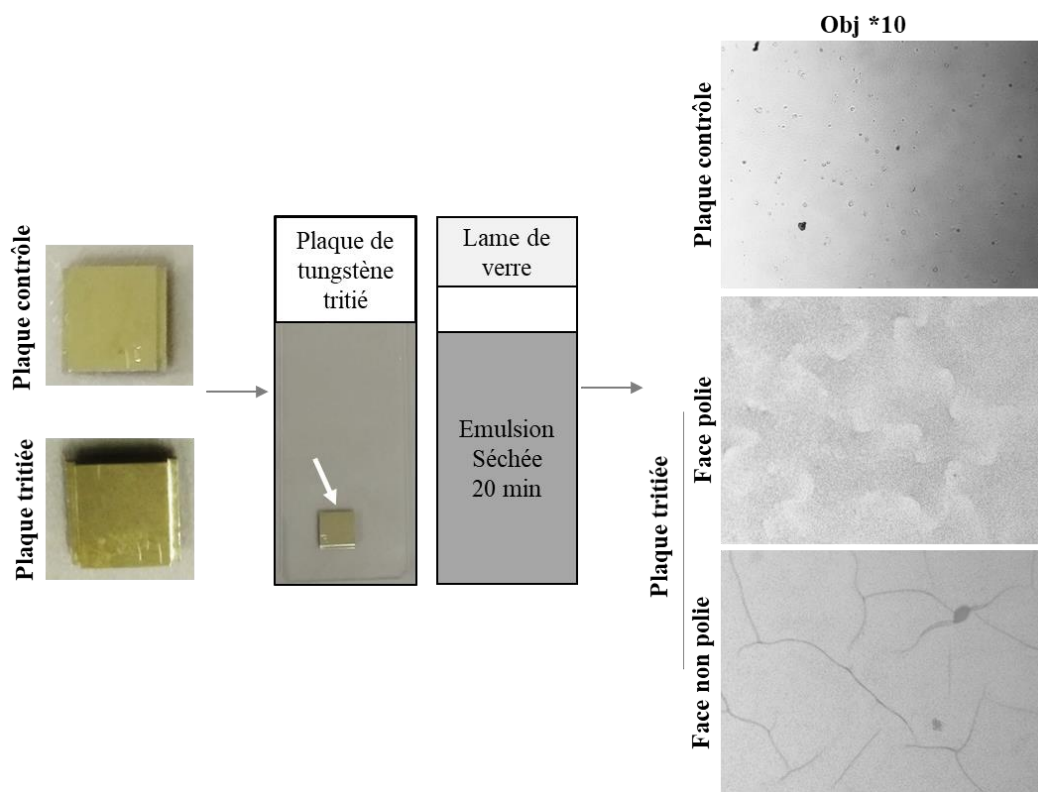
Ainsi, nous sommes parvenus à une détection spécifique de grains d'argent avec une résolution très proche de celle obtenue avec le protocole d'autoradiographie standard, sans augmentation significative du bruit de fond.



**Figure 26 : Comparaison des deux méthodes d'autoradiographie cellulaire, par contact et standard.**

Suite à la mise en place du protocole d'autoradiographie par contact, nous avons entamé les premières autoradiographies sur des plaques de tungstène recuit dont une surface a été polie après l'étape de tritiation (Figure 27). L'autoradiographie réalisée par contact avec la plaque de tungstène contrôle n'a pas mis en évidence de grains d'argent. En revanche, nos premiers résultats d'autoradiographie par contact avec la plaque de tungstène tritié et polie montrent des régions plus au moins denses en grains d'argent. Après contact avec la face non polie de la plaque de tungstène tritié, l'autoradiographie révèle la présence de sillons très denses en grains d'argent. Ces résultats préliminaires

suggèrent une distribution hétérogène du tritium à la surface de la plaque de tungstène qui pourrait être plus importante au niveau de la périphérie des cristaux de tungstène.



**Figure 27 : Résultats préliminaires d'autoradiographie par contact entre une lame recouverte d'émulsion NTB (400 nm) et une plaque de tungstène tritié.**

D'autres tests seront nécessaires afin d'optimiser encore le protocole d'autoradiographie par contact avec les plaques de tungstène tritié et ainsi confirmer nos résultats préliminaires. Néanmoins, l'autoradiographie par contact développée pendant ma thèse pourra être appliquée à des échantillons biologiques car elle présente l'avantage de ne pas le détruire, ce qui est un des inconvénients de l'autoradiographie classique. Ce protocole d'autoradiographie par contact permettra également de réaliser plusieurs autoradiographies sur un même échantillon, permettant d'ajuster certains paramètres comme le temps d'exposition de l'émulsion et les conditions de révélation.

## **7. BIBLIOGRAPHIE**

- Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol.* 15 déc 1996;180(2):664-79.
- Abugable AA, Morris JLM, Palminha NM, Zaksauskaite R, Ray S, El-Khamisy SF. DNA repair and neurological disease: From molecular understanding to the development of diagnostics and model organisms. *DNA Repair (Amst).* sept 2019;81:102669.
- Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, et al. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med.* 15 déc 2010;49(12):1846-55.
- Adachi N, Ishino T, Ishii Y, Takeda S, Koyama H. DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 9 oct 2001;98(21):12109-13.
- Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* 2017;591(24):3978-92.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell.* 27 janv 2006;124(2):301-13.
- Akopiants K, Zhou R-Z, Mohapatra S, Valerie K, Lees-Miller SP, Lee K-J, et al. Requirement for XLF/Cernunnos in alignment-based gap filling by DNA polymerases lambda and mu for nonhomologous end joining in human whole-cell extracts. *Nucleic Acids Res.* juill 2009;37(12):4055-62.
- Alt FW, Schwer B. DNA double-strand breaks as drivers of neural genomic change, function, and disease. *DNA Repair (Amst).* 2018;71:158-63.
- Altmann T, Gennery AR. DNA ligase IV syndrome; a review. *Orphanet J Rare Dis.* 07 2016;11(1):137.
- Alvarez-Buylla A, Kriegstein A. Chapter 34 - Neural Stem Cells Among Glia. In: Rubenstein JLR, Rakic P, éditeurs. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS [Internet].* Oxford: Academic Press; 2013 [cité 2 oct 2019]. p. 685-705.  
Disponible sur:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123972651000794>
- Andres SN, Modesti M, Tsai CJ, Chu G, Junop MS. Crystal structure of human XLF: a twist in nonhomologous DNA end-joining. *Mol Cell.* 28 déc 2007;28(6):1093-101.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 13 avr 2001;276(15):11615-23.
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, et al. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun.* 11 janv 2011;2:154.
- Arai Y, Taverna E. Neural Progenitor Cell Polarity and Cortical Development. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:384.
- Arnoult N, Correia A, Ma J, Merlo A, Garcia-Gomez S, Maric M, et al. Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature.* 20 2017;549(7673):548-52.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer.* juin 2002;2(6):420-30.
- Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol.* avr 2014;21(4):366-74.
- Balmus G, Barros AC, Wijnhoven PWG, Lescale C, Hasse HL, Boroviak K, et al. Synthetic lethality between PAXX and XLF in mammalian development. *Genes Dev.* 1 oct 2016;30(19):2152-7.

- Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T. Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol.* 17 déc 1998;8(25):1395-8.
- Barzilai A, Biton S, Shiloh Y. The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst).* 1 juill 2008;7(7):1010-27.
- Beattie R, Hippenmeyer S. Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Lett.* déc 2017;591(24):3993-4008.
- Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol.* déc 2006;209(3):883-93.
- Bédard A, Parent A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res.* 19 juill 2004;151(1-2):159-68.
- Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell.* 3 juill 2014;15(1):37-50.
- Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, Schumacher B. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat Cell Biol.* mars 2014;16(3):201-7.
- Berthel E, Foray N, Ferlazzo ML. The Nucleoshuttling of the ATM Protein: A Unified Model to Describe the Individual Response to High- and Low-Dose of Radiation? *Cancers (Basel).* 28 juin 2019;11(7).
- Blanpain C, Simons BD. Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2013;14(8):489-502.
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development.* avr 1996;122(4):1165-74.
- Boboila C, Yan C, Wesemann DR, Jankovic M, Wang JH, Manis J, et al. Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J Exp Med.* 15 févr 2010;207(2):417-27.
- Bodgi L, Foray N. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model. *Int J Radiat Biol.* 2016;92(3):117-31.
- Bolus NE. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *J Nucl Med Technol.* déc 2017;45(4):259-64.
- Borrell V, Reillo I. Emerging roles of neural stem cells in cerebral cortex development and evolution. *Dev Neurobiol.* juill 2012;72(7):955-71.
- Bosi A, Olivieri G. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat Res.* mars 1989;211(1):13-7.
- Brandsma I, Fleuren EDG, Williamson CT, Lord CJ. Directing the use of DDR kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* déc 2017;26(12):1341-55.
- Bridge JA. Advantages and limitations of cytogenetic, molecular cytogenetic, and molecular diagnostic testing in mesenchymal neoplasms. *J Orthop Sci.* mai 2008;13(3):273-82.
- Brown EJ, Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* 15 févr 2000;14(4):397-402.
- Bryant PE. Origin of Chromosome Aberrations: Mechanisms. In: Obe G, Vijayalaxmi, éditeurs. *Chromosomal Alterations [Internet].* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cité 2 oct 2019]. p. 177-99. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-71414-9\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-71414-9_11)
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche M-C, Sanal O, et al. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell.* 27 janv 2006;124(2):287-99.

- Buis J, Wu Y, Deng Y, Leddon J, Westfield G, Eckersdorff M, et al. Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell*. 3 oct 2008;135(1):85-96.
- Burma S, Chen BPC, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair*. 8 sept 2006;5(9):1042-8.
- Buss RR, Gould TW, Ma J, Vinsant S, Prevette D, Winseck A, et al. Neuromuscular development in the absence of programmed cell death: phenotypic alteration of motoneurons and muscle. *J Neurosci*. 27 déc 2006;26(52):13413-27.
- Buss RR, Oppenheim RW. Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int*. déc 2004;79(4):191-7.
- Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci*. 13 juill 2005;25(28):6533-8.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*. 18 sept 1998;94(6):727-37.
- Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl* (2011). sept 2011;1(3):63-7.
- Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(8):495-506.
- Chen Z, Sakai K. Enhancement of radiation-induced apoptosis by preirradiation with low-dose X-rays in human leukemia MOLT-4 cells. *J Radiat Res*. juin 2004;45(2):239-43.
- Cho JS, Kook SH, Robinson AR, Niedernhofer LJ, Lee B-C. Cell autonomous and nonautonomous mechanisms drive hematopoietic stem/progenitor cell loss in the absence of DNA repair. *Stem Cells*. mars 2013;31(3):511-25.
- Chun HH, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)*. sept 2004;3(8-9):1187-96.
- Ciccio A, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 22 oct 2010;40(2):179-204.
- Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2008;9(8):616-27.
- Cleaver JE, Thomas GH, Burki HJ. Biological damage from intranuclear tritium: DNA strand breaks and their repair. *Science*. 15 sept 1972;177(4053):996-8.
- Clouaire T, Legube G. DNA double strand break repair pathway choice: a chromatin based decision? *Nucleus*. 2015;6(2):107-13.
- Coronado D, Godet M, Bourillot P-Y, Taponnier Y, Bernat A, Petit M, et al. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res*. janv 2013;10(1):118-31.
- Costes A, Lambert SAE. Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules*. 27 déc 2012;3(1):39-71.
- Cregan SP, Brown DL, Mitchel RE. Apoptosis and the adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*. sept 1999;75(9):1087-94.
- Dai Y, Kysela B, Hanakahi LA, Manolis K, Riballo E, Stumm M, et al. Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 4 mars 2003;100(5):2462-7.
- Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*. juin 2013;2(3):130-43.
- De Juan Romero C, Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*. août 2015;63(8):1303-19.



- de Magalhães JP, Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev.* 2018;170:2-9.
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 17 juin 2002;21(12):3192-200.
- Dekkers MPJ, Nikolettou V, Barde Y-A. Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *J Cell Biol.* 11 nov 2013;203(3):385-93.
- Delacôte F, Han M, Stamato TD, Jasin M, Lopez BS. An xrc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1 août 2002;30(15):3454-63.
- Della-Maria J, Zhou Y, Tsai M-S, Kuhnlein J, Carney JP, Paull TT, et al. Human Mre11/Human Rad50/Nbs1 and DNA Ligase III $\alpha$ /XRCC1 Protein Complexes Act Together in an Alternative Nonhomologous End Joining Pathway. *J Biol Chem.* 30 sept 2011;286(39):33845-53.
- Deriano L, Roth DB. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu Rev Genet.* 2013;47:433-55.
- Devi PU, Baskar R, Hande MP. Effect of exposure to low-dose gamma radiation during late organogenesis in the mouse fetus. *Radiat Res.* avr 1994;138(1):133-8.
- Devic C, Ferlazzo ML, Foray N. Influence of Individual Radiosensitivity on the Adaptive Response Phenomenon: Toward a Mechanistic Explanation Based on the Nucleo-Shuttling of ATM Protein. *Dose Response [Internet].* 6 août 2018 [cité 17 oct 2019];16(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6081762/>
- Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma.* déc 2009;118(6):683-92.
- Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst).* sept 2004;3(8-9):1207-17.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26 sept 1995;92(20):9363-7.
- Dodson H, Wheatley SP, Morrison CG. Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle.* 1 févr 2007;6(3):364-70.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 11 juin 1999;97(6):703-16.
- Drouet J, Frit P, Delteil C, de Villartay J-P, Salles B, Calsou P. Interplay between Ku, Artemis, and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit at DNA ends. *J Biol Chem.* 22 sept 2006;281(38):27784-93.
- Dueva R, Iliakis G. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational Cancer Research.* 19 mai 2013;2(3):163-177-177.
- Dunn K, Yoshimaru H, Otake M, Annegers JF, Schull WJ. Prenatal exposure to ionizing radiation and subsequent development of seizures. *Am J Epidemiol.* janv 1990;131(1):114-23.
- Durante M, Bedford JS, Chen DJ, Conrad S, Cornforth MN, Natarajan AT, et al. From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutat Res.* 30 août 2013;756(1-2):5-13.
- Durante M, Formenti SC. Radiation-Induced Chromosomal Aberrations and Immunotherapy: Micronuclei, Cytosolic DNA, and Interferon-Production Pathway. *Front Oncol.* 2018;8:192.
- Eggler AL, Inman RB, Cox MM. The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J Biol Chem.* 18 oct 2002;277(42):39280-8.

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* juin 2007;35(4):495-516.
- Elson A, Wang Y, Daugherty CJ, Morton CC, Zhou F, Campos-Torres J, et al. Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 12 nov 1996;93(23):13084-9.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, et al. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 5 janv 2005;25(1):247-51.
- Ernst A, Frisé J. Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLoS Biol* [Internet]. 26 janv 2015 [cité 2 oct 2019];13(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306487/>
- Etienne O, Roque T, Haton C, Boussin FD. Variation of radiation-sensitivity of neural stem and progenitor cell populations within the developing mouse brain. *Int J Radiat Biol.* oct 2012;88(10):694-702.
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature.* 12 avr 2001;410(6830):842-7.
- Fan J, Robert C, Jang Y-Y, Liu H, Sharkis S, Baylin SB, et al. Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. *Mutat Res.* 1 août 2011;713(1-2):8-17.
- Feng L, Chen J. The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat Struct Mol Biol.* 22 janv 2012;19(2):201-6.
- Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *PNAS.* 6 juin 2000;97(12):6630-3.
- Filion TM, Qiao M, Ghule PN, Mandeville M, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J Cell Physiol.* sept 2009;220(3):586-92.
- Finlay BL, Darlington RB. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science.* 16 juin 1995;268(5217):1578-84.
- Fiorelli R, Azim K, Fischer B, Raineteau O. Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development.* 15 juin 2015;142(12):2109-20.
- Fletcher JI, Meusburger S, Hawkins CJ, Riglar DT, Lee EF, Fairlie WD, et al. Apoptosis is triggered when prosurvival Bcl-2 proteins cannot restrain Bax. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25 nov 2008;105(47):18081-7.
- Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development.* juin 2014;141(11):2182-94.
- Foray N, Bourguignon M, Hamada N. Individual response to ionizing radiation. *Mutat Res.* déc 2016;770(Pt B):369-86.
- Frappart P-O, McKinnon PJ. Mouse models of DNA double-strand break repair and neurological disease. *DNA Repair (Amst).* 1 juill 2008;7(7):1051-60.
- Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell.* 14 juin 2012;10(6):698-708.
- Fukuda A, Fukuda H, Swanpalmer J, Hertzman S, Lannering B, Marky I, et al. Age-dependent sensitivity of the developing brain to irradiation is correlated with the number and vulnerability of progenitor cells. *J Neurochem.* févr 2005;92(3):569-84.
- Gajendiran N, Tanaka K, Kumaravel TS, Kamada N. Neutron-induced Adaptive Response Studied in Go Human Lymphocytes Using the Comet Assay. *J Radiat Res.* 1 mars 2001;42(1):91-101.

- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*. 18 janv 2006;26(3):1045-56.
- Gao W-M, Lu H-M, Dong J-C, Zhang W, Zhou X-Y, Jenkins LW, et al. Postnatal growth, neurobehavioral and neurophysiologic changes of prenatal low-dose beta-radiation from tritiated water in mice. *Neurotoxicol Teratol*. avr 2002;24(2):247-54.
- Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, et al. A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*. 23 déc 1998;95(7):891-902.
- Gatz SA, Ju L, Gruber R, Hoffmann E, Carr AM, Wang Z-Q, et al. Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. *J Neurosci*. 6 juill 2011;31(27):10088-100.
- Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW. Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem Pharmacol*. 15 oct 2008;76(8):947-57.
- Ghosh HS. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *J Exp Neurosci*. 2019;13:1179069519856876.
- Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 janv 2011;3(1):a000745.
- Gogondeau D, Siudeja K, Gambarotto D, Penner C, Bardin AJ, Basto R. Aneuploidy causes premature differentiation of neural and intestinal stem cells. *Nat Commun*. 17 nov 2015;6(1):1-15.
- Goodarzi AA, Jeggo PA. Chapter One - The Repair and Signaling Responses to DNA Double-Strand Breaks. In: Friedmann T, Dunlap JC, Goodwin SF, éditeurs. *Advances in Genetics* [Internet]. Academic Press; 2013 [cité 29 sept 2019]. p. 1-45. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124076761000019>
- Goodarzi AA, Yu Y, Riballo E, Douglas P, Walker SA, Ye R, et al. DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J*. 23 août 2006;25(16):3880-9.
- Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*. mars 2012;13(3):189-203.
- Götz M, Hartfuss E, Malatesta P. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull*. avr 2002;57(6):777-88.
- Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. oct 2005;6(10):777-88.
- Götz M, Nakafuku M, Petrik D. Neurogenesis in the Developing and Adult Brain—Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. juill 2016 [cité 17 oct 2019];8(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4930921/>
- Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, et al. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*. 31 juill 1997;388(6641):492-5.
- Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR. DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell*. oct 1998;2(4):477-84.
- Gu Y, Sekiguchi J, Gao Y, Dikkes P, Frank K, Ferguson D, et al. Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14 mars 2000;97(6):2668-73.

- Hammel M, Yu Y, Mahaney BL, Cai B, Ye R, Phipps BM, et al. Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol Chem*. 8 janv 2010;285(2):1414-23.
- Hansen DV, Lui JH, Parker PRL, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 25 mars 2010;464(7288):554-61.
- Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 14 déc 2007;28(5):739-45.
- Harrison CJ, Secker-Walker LM. The importance of cytogenetics and associated molecular techniques in the management of patients with leukaemia. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1998;10(4):255-61.
- Hartel C, Nasonova E, Fuss MC, Nikoghosyan AV, Debus J, Ritter S. Persistence of radiation-induced aberrations in patients after radiotherapy with C-ions and IMRT. *Clin Transl Radiat Oncol*. nov 2018;13:57-63.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2 mars 2004;101(9):3196-201.
- Haydar TF, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P. The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex*. sept 1999;9(6):621-6.
- Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
- Heyer W-D, Li X, Rolfsmeier M, Zhang X-P. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res*. 2006;34(15):4115-25.
- Hofmann ER, Milstein S, Hengartner MO. DNA-damage-induced checkpoint pathways in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2000;65:467-73.
- Hoshino K, Kameyama Y, Inouye M. Split-dose effect of X-irradiation on the induction of cell death in the fetal mouse brain. *J Radiat Res*. mars 1991;32(1):23-7.
- Hoshino K, Kameyama Y. Developmental-stage-dependent radiosensitivity of neural cells in the ventricular zone of telencephalon in mouse and rat fetuses. *Teratology*. mars 1988;37(3):257-62.
- Hsu HL, Yannone SM, Chen DJ. Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA Repair (Amst)*. 28 mars 2002;1(3):225-35.
- Ianzini F, Bertoldo A, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Lack of p53 function promotes radiation-induced mitotic catastrophe in mouse embryonic fibroblast cells. *Cancer Cell Int*. 26 avr 2006;6:11.
- Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res*. 4 nov 1996;358(2):193-8.
- Iles N, Rulten S, El-Khamisy SF, Caldecott KW. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. *Mol Cell Biol*. mai 2007;27(10):3793-803.
- Insinga A, Cicalese A, Pelicci PG. DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells Mol Dis*. avr 2014;52(4):147-51.
- Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*. 21 oct 2004;431(7011):1011-7.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 21 oct 2004;431(7011):997-1002.
- Iyama T, Wilson DM. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. août 2013;12(8):620-36.

- Iyer DR, Rhind N. The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes (Basel)*. 17 févr 2017;8(2).
- Jackson SP, Jeggo PA. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci*. oct 1995;20(10):412-5.
- Jeggo P, Löbrich M. Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006;122(1-4):124-7.
- Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem*. 6 oct 2000;275(40):31199-203.
- Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*. 3 juill 2000;19(13):3398-407.
- Kabotyanski EB, Gomelsky L, Han JO, Stamato TD, Roth DB. Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res*. 1 déc 1998;26(23):5333-42.
- Kaddour A, Colicchio B, Buron D, El Maalouf E, Laplagne E, Borie C, et al. Transmission of Induced Chromosomal Aberrations through Successive Mitotic Divisions in Human Lymphocytes after In Vitro and In Vivo Radiation. *Sci Rep*. 12 2017;7(1):3291.
- Kakarougkas A, Jeggo PA. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol*. mars 2014;87(1035):20130685.
- Kalkan R. The Use of Molecular Cytogenetic Techniques for the Identification of Chromosomal Abnormalities. *Chromosomal Abnormalities - A Hallmark Manifestation of Genomic Instability [Internet]*. 30 août 2017 [cité 17 oct 2019]; Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/chromosomal-abnormalities-a-hallmark-manifestation-of-genomic-instability/the-use-of-molecular-cytogenetic-techniques-for-the-identification-of-chromosomal-abnormalities>
- Kanno S, Kuzuoka H, Sasao S, Hong Z, Lan L, Nakajima S, et al. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J*. 18 avr 2007;26(8):2094-103.
- Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell*. 27 juill 2012;47(2):320-9.
- Karanjawala ZE, Grawunder U, Hsieh CL, Lieber MR. The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. *Curr Biol*. 16 déc 1999;9(24):1501-4.
- Karlsson-Rosenthal C, Millar JBA. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol*. juin 2006;16(6):285-92.
- Kashiwagi H, Shiraiishi K, Sakaguchi K, Nakahama T, Kodama S. Repair kinetics of DNA double-strand breaks and incidence of apoptosis in mouse neural stem/progenitor cells and their differentiated neurons exposed to ionizing radiation. *J Radiat Res*. 1 mai 2018;59(3):261-71.
- Katyal S, McKinnon PJ. DNA strand breaks, neurodegeneration and aging in the brain. *Mech Ageing Dev*. août 2008;129(7-8):483-91.
- Kavanagh JN, Redmond KM, Schettino G, Prise KM. DNA double strand break repair: a radiation perspective. *Antioxid Redox Signal*. 20 juin 2013;18(18):2458-72.
- Kim H, Tu H-C, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 13 nov 2009;36(3):487-99.
- Kimler BF, Norton S. Behavioral changes and structural defects in rats irradiated in utero. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. nov 1988;15(5):1171-7.
- Kirsch-Volders M, Tallon I, Tanzarella C, Sgura A, Hermine T, Parry EM, et al. Mitotic non-disjunction as a mechanism for in vitro aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. *Mutagenesis*. juill 1996;11(4):307-13.

- Klammer H, Zhang L-H, Kadhim M, Iliakis G. Dependence of adaptive response and its bystander transmission on the genetic background of tested cells. *Int J Radiat Biol.* oct 2012;88(10):720-6.
- Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, et al. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.* 1 oct 2004;23(19):3874-85.
- Koike M, Shiomi T, Koike A. Dimerization and nuclear localization of ku proteins. *J Biol Chem.* 6 avr 2001;276(14):11167-73.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84.
- Kriegstein AR, Götz M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* juill 2003;43(1):37-43.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 7 août 1998;94(3):325-37.
- Kurosawa A, Adachi N. Functions and regulation of Artemis: a goddess in the maintenance of genome integrity. *J Radiat Res.* 2010;51(5):503-9.
- Kusumoto R, Dawut L, Marchetti C, Wan Lee J, Vindigni A, Ramsden D, et al. Werner protein cooperates with the XRCC4-DNA ligase IV complex in end-processing. *Biochemistry.* 15 juill 2008;47(28):7548-56.
- Lan ML, Acharya MM, Tran KK, Bahari-Kashani J, Patel NH, Strnadel J, et al. Characterizing the Radioresponse of Pluripotent and Multipotent Human Stem Cells. *PLoS One* [Internet]. 14 déc 2012 [cité 17 oct 2019];7(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522689/>
- Lavin MF, Kozlov S. ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle.* 15 avr 2007;6(8):931-42.
- Lazzaro F, Giannattasio M, Puddu F, Granata M, Pelliccioli A, Plevani P, et al. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst).* 2 sept 2009;8(9):1055-67.
- Lee Y, Chong MJ, McKinnon PJ. Ataxia telangiectasia mutated-dependent apoptosis after genotoxic stress in the developing nervous system is determined by cellular differentiation status. *J Neurosci.* 1 sept 2001;21(17):6687-93.
- LeMotte PK, Little JB. DNA damage induced in human diploid cells by decay of incorporated radionuclides. *Cancer Res.* avr 1984;44(4):1337-42.
- Li G, Alt FW, Cheng H-L, Brush JW, Goff PH, Murphy MM, et al. Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. *Mol Cell.* 5 sept 2008;31(5):631-40.
- Li M, You L, Xue J, Lu Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front Pharmacol.* 2018;9:522.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 14 nov 1997;91(4):479-89.
- Liang L, Deng L, Nguyen SC, Zhao X, Maulion CD, Shao C, et al. Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* juin 2008;36(10):3297-310.
- Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M. Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev.* févr 1997;7(1):99-104.

- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181-211.
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, et al. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol.* févr 2005;7(2):165-71.
- Liu X, Jiang W, Dubois RL, Yamamoto K, Wolner Z, Zha S. Overlapping functions between XLF repair protein and 53BP1 DNA damage response factor in end joining and lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6 mars 2012;109(10):3903-8.
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle.* 15 févr 2010;9(4):662-9.
- Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, Rube CE. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e38165.
- Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:4.
- Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J.* 1 févr 2009;417(3):639-50.
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuâsen RG, Welcker M, Bartek J, et al. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science.* 26 mai 2000;288(5470):1425-9.
- Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.* janv 2008;331(1):165-78.
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* déc 2000;127(24):5253-63.
- Mandal PK, Blanpain C, Rossi DJ. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(3):198-202.
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst).* 1 oct 2008;7(10):1765-71.
- Mari P-O, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Modesti M, et al. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5 déc 2006;103(49):18597-602.
- Marthiens V, Rujano MA, Pennetier C, Tessier S, Paul-Gilloteaux P, Basto R. Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol.* juill 2013;15(7):731-40.
- Martynoga B, Drechsel D, Guillemot F. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 oct 2012;4(10).
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.* nov 2006;88(11):1515-31.
- Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu S-T, Da Cruz AB, et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells.* sept 2008;26(9):2266-74.
- Mc Gee MM. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:146282.
- McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, et al. Mosaic copy number variation in human neurons. *Science.* 1 nov 2013;342(6158):632-7.
- McConnell MJ, Moran JV, Abyzov A, Akbarian S, Bae T, Cortes-Ciriano I, et al. Intersection of diverse neuronal genomes and neuropsychiatric disease: The Brain Somatic Mosaicism Network. *Science.* 28 avr 2017;356(6336).

- McKinnon PJ. DNA Repair Deficiency and Neurological Disease. *Nat Rev Neurosci.* févr 2009;10(2):100-12.
- McKinnon PJ. Genome integrity and disease prevention in the nervous system. *Genes Dev.* 15 2017;31(12):1180-94.
- McKinnon PJ. Maintaining genome stability in the nervous system. *Nat Neurosci.* nov 2013;16(11):1523-9.
- Meek K, Dang V, Lees-Miller SP. DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol.* 2008;99:33-58.
- Mehta A, Haber JE. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7 août 2014;6(9):a016428.
- Menon V, Povirk LF. XLF/Cernunnos: An important but puzzling participant in the nonhomologous end joining DNA repair pathway. *DNA Repair (Amst).* 2017;58:29-37.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 11 sept 2008;3(3):265-78.
- Mirzoeva OK, Petrini JH. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cell Biol.* janv 2001;21(1):281-8.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* juin 2007;8(6):427-37.
- Momcilovic O, Knobloch L, Fornasaglio J, Varum S, Easley C, Schatten G. DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 15 oct 2010;5(10):e13410.
- Moon AF, Garcia-Diaz M, Batra VK, Beard WA, Bebenek K, Kunkel TA, et al. The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair (Amst).* 1 déc 2007;6(12):1709-25.
- Morais CSD, Affonso PR a. M, Bitencourt JA, Wenceslau AA. Direct preparation protocol to obtain mitotic chromosomes from canine mammary tumors. *Genet Mol Res.* 29 déc 2015;14(4):19389-95.
- Morcom LR, Edwards TJ, Richards LJ. Chapter 14 - Cortical Architecture, Midline Guidance, and Tractography of 3D White Matter Tracts. In: Rockland KS, éditeur. *Axons and Brain Architecture* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2016 [cité 2 oct 2019]. p. 289-313. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128013939000141>
- Mueller GA, Moon AF, Derose EF, Havener JM, Ramsden DA, Pedersen LC, et al. A comparison of BRCT domains involved in nonhomologous end-joining: introducing the solution structure of the BRCT domain of polymerase lambda. *DNA Repair (Amst).* 2 août 2008;7(8):1340-51.
- Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2014;15(7):482-96.
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* mars 2001;7(3):683-94.
- Nenoi M, Wang B, Vares G. In vivo radioadaptive response: a review of studies relevant to radiation-induced cancer risk. *Hum Exp Toxicol.* mars 2015;34(3):272-83.
- Nick McElhinny SA, Ramsden DA. Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev.* août 2004;200:156-64.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci.* 15 avr 2002;22(8):3161-73.



- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* févr 2004;7(2):136-44.
- Nowak E, Etienne O, Millet P, Lages CS, Mathieu C, Mouthon M-A, et al. Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat Res.* févr 2006;165(2):155-64.
- Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol.* oct 2012;34(3):243-54.
- O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell.* déc 2001;8(6):1175-85.
- O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of the DNA damage response pathways in brain development and microcephaly: insight from human disorders. *DNA Repair (Amst).* 1 juill 2008;7(7):1039-50.
- Ochi T, Blackford AN, Coates J, Jhujh S, Mehmood S, Tamura N, et al. DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science.* 9 janv 2015;347(6218):185-8.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 12 mai 2000;288(5468):1053-8.
- Oksenysh V, Alt FW, Kumar V, Schwer B, Wesemann DR, Hansen E, et al. Functional redundancy between repair factor XLF and damage response mediator 53BP1 in V(D)J recombination and DNA repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 14 févr 2012;109(7):2455-60.
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science.* 10 févr 1984;223(4636):594-7.
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:453-501.
- Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon PJ. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 juin 2006;103(26):10017-22.
- Ostrem BEL, Lui JH, Gertz CC, Kriegstein AR. Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.* 7 août 2014;8(3):656-64.
- Otake M, Schull WJ. In utero exposure to A-bomb radiation and mental retardation; a reassessment. *Br J Radiol.* mai 1984;57(677):409-14.
- Otake M, Schull WJ. Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors. *Int J Radiat Biol.* août 1998;74(2):159-71.
- Pala FS, Moquet JE, Edwards AA, Lloyd DC. In vitro transmission of chromosomal aberrations through mitosis in human lymphocytes. *Mutat Res.* 1 mars 2001;474(1-2):139-46.
- Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2014;15(1):7-18.
- Paridaen JTML, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* avr 2014;15(4):351-64.
- Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci.* nov 2013;70(21):4009-21.
- Potten CS, Owen G, Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci.* 1 juin 2002;115(Pt 11):2381-8.
- Povirk LF, Zhou T, Zhou R, Cowan MJ, Yannone SM. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J Biol Chem.* 9 févr 2007;282(6):3547-58.

- Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* oct 2009;10(10):724-35.
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science.* 8 juill 1988;241(4862):170-6.
- Rasband MN. Glial Contributions to Neural Function and Disease. *Mol Cell Proteomics.* févr 2016;15(2):355-61.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 27 mars 1992;255(5052):1707-10.
- Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res.* févr 2009;37(2):482-92.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature.* 12 oct 2000;407(6805):777-83.
- Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B. Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 11 mai 2009;206(5):1047-56.
- Rocha CRR, Lerner LK, Okamoto OK, Marchetto MC, Menck CFM. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat Res.* mars 2013;752(1):25-35.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 6 mars 1998;273(10):5858-68.
- Roninson IB. Mitotic Catastrophe. In: Schwab M, éditeur. *Encyclopedia of Cancer* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cité 9 oct 2019]. p. 2345-7. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5\\_3779](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_3779)
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* sept 2006;12(9):440-50.
- Roque T, Haton C, Etienne O, Chicheportiche A, Rousseau L, Martin L, et al. Lack of a p21/waf1/cip -dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. *Stem Cells.* mars 2012;30(3):537-47.
- Roth KA, Kuan C, Haydar TF, D'Sa-Eipper C, Shindler KS, Zheng TS, et al. Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4 janv 2000;97(1):466-71.
- Rothkamm K, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29 avr 2003;100(9):5057-62.
- Rousseau L, Etienne O, Roque T, Desmaze C, Haton C, Mouthon M-A, et al. In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e37194.
- Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M. MRN and the race to the break. *Chromosoma.* avr 2010;119(2):115-35.
- Sage E, Shikazono N. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic Biol Med.* 2017;107:125-35.
- Saha S, Woodbine L, Haines J, Coster M, Rickett N, Barazzuol L, et al. Increased apoptosis and DNA double-strand breaks in the embryonic mouse brain in response to very low-dose X-rays but not 50 Hz magnetic fields. *J R Soc Interface.* 6 nov 2014;11(100):20140783.
- Sakayori N, Kimura R, Osumi N. Impact of lipid nutrition on neural stem/progenitor cells. *Stem Cells Int.* 2013;2013:973508.

- Saretzki G, Armstrong L, Leake A, Lako M, von Zglinicki T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells*. 2004;22(6):962-71.
- Savage JRK. An introduction to chromosomal aberrations. In 1999.
- Schneider L, Pellegatta S, Favaro R, Pisati F, Roncaglia P, Testa G, et al. DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Reports*. 2013;1(2):123-38.
- Schnerch D, Yalcintepe J, Schmidts A, Becker H, Follo M, Engelhardt M, et al. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*. 2012;2(5):508-28.
- Schull WJ, Otake M. Cognitive function and prenatal exposure to ionizing radiation. *Teratology*. avr 1999;59(4):222-6.
- Schwarz SB, Schaffer PM, Kulka U, Ertl-Wagner B, Hell R, Schaffer M. The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat Oncol*. 23 avr 2008;3:12.
- Semont A, Nowak EB, Silva Lages C, Mathieu C, Mouthon M-A, May E, et al. Involvement of p53 and Fas/CD95 in murine neural progenitor cell response to ionizing irradiation. *Oncogene*. 4 nov 2004;23(52):8497-508.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haesslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. août 2013;106-107:1-16.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 15 sept 2001;21(18):7153-60.
- Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. juill 2015;15(7):397-408.
- Shelke S, Das B. Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to  $\gamma$  radiation. *Mutagenesis*. mai 2015;30(3):365-79.
- Sherman MH, Bassing CH, Teitell MA. DNA damage response regulates cell differentiation. *Trends Cell Biol*. mai 2011;21(5):312-9.
- Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*. 16 mars 2011;30(6):1079-92.
- Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2013;14(4):197-210.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*. janv 2008;18(1):134-47.
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, Rossella F, Terzoli GL, Ferrari M, et al. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum Genet*. 1 juin 1983;63(4):349-57.
- Simsek D, Brunet E, Wong SY-W, Katyal S, Gao Y, McKinnon PJ, et al. DNA Ligase III Promotes Alternative Nonhomologous End-Joining during Chromosomal Translocation Formation. *PLoS Genet* [Internet]. 2 juin 2011 [cité 1 oct 2019];7(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107202/>
- Simsek D, Jasin M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol*. avr 2010;17(4):410-6.
- Singleton BK, Torres-Arzayus MI, Rottinghaus ST, Taccioli GE, Jeggo PA. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol Cell Biol*. mai 1999;19(5):3267-77.
- Sishc BJ, Davis AJ. The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *Cancers (Basel)*. 6 juill 2017;9(7).

- Soriano ME, Scorrano L. Traveling Bax and forth from mitochondria to control apoptosis. *Cell*. 1 avr 2011;145(1):15-7.
- Spagnolo L, Rivera-Calzada A, Pearl LH, Llorca O. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell*. 19 mai 2006;22(4):511-9.
- Stancik EK, Navarro-Quiroga I, Sellke R, Haydar TF. Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J Neurosci*. 19 mai 2010;30(20):7028-36.
- Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. déc 2010;20(4):327-48.
- Stoilov LM, Mullenders LHF, Darroudi F, Natarajan AT. Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis*. mars 2007;22(2):117-22.
- Stracker TH, Morales M, Couto SS, Hussein H, Petrini JHJ. The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature*. 10 mai 2007;447(7141):218-21.
- Sun T, Hevner RF. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat Rev Neurosci*. avr 2014;15(4):217-32.
- Sun XZ, Inouye M, Yamamura H, Fukui Y. Effects of prenatal treatment with tritiated water on the developing brain in mouse. *Int J Radiat Biol*. mars 1997;71(3):309-13.
- Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*. 2011;45:247-71.
- Taccioli GE, Amatucci AG, Beamish HJ, Gell D, Xiang XH, Torres Arzayus MI, et al. Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity*. sept 1998;9(3):355-66.
- Tapio S, Jacob V. Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys*. mars 2007;46(1):1-12.
- Taverna E, Huttner WB. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*. 23 sept 2010;67(6):906-14.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG. Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 1 févr 1997;17(3):1075-85.
- Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep*. févr 1988;8(1):3-26.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 26 janv 2007;128(2):325-39.
- Turnell AS, Grand RJ. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J Gen Virol*. oct 2012;93(Pt 10):2076-97.
- Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, et al. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*. 23 avr 2007;177(2):219-29.
- Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:396.
- Verheyde J, Benotmane MA. Unraveling the fundamental molecular mechanisms of morphological and cognitive defects in the irradiated brain. *Brain Res Rev*. févr 2007;53(2):312-20.
- Verreet T, Verslegers M, Quintens R, Baatout S, Benotmane MA. Current Evidence for Developmental, Structural, and Functional Brain Defects following Prenatal Radiation Exposure. *Neural Plast*. 2016;2016:1243527.

- Vijayalaxmi null, Leal BZ, Deahl TS, Meltz ML. Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocytes: consistent results from chromosome aberrations and micronuclei. *Mutat Res.* sept 1995;348(1):45-50.
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2011;12(6):385-92.
- Vitale I, Manic G, De Maria R, Kroemer G, Galluzzi L. DNA Damage in Stem Cells. *Mol Cell.* 4 mai 2017;66(3):306-19.
- Wang B, Takeda H, Gao WM, Zhou XY, Odaka T, Ohyama H, et al. Induction of apoptosis by beta radiation from tritium compounds in mouse embryonic brain cells. *Health Phys.* juill 1999;77(1):16-23.
- Wang H, Perrault AR, Takeda Y, Qin W, Wang H, Iliakis G. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* 15 sept 2003;31(18):5377-88.
- Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, Windhofer F, et al. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.* 15 mai 2005;65(10):4020-30.
- Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, et al. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* déc 2006;34(21):6170-82.
- Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W. Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol Cancer.* 13 févr 2009;8:8.
- Wang Y-G, Nnakwe C, Lane WS, Modesti M, Frank KM. Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 3 sept 2004;279(36):37282-90.
- Wei P-C, Chang AN, Kao J, Du Z, Meyers RM, Alt FW, et al. Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell.* 11 févr 2016;164(4):644-55.
- Wei P-C, Lee C-S, Du Z, Schwer B, Zhang Y, Kao J, et al. Three classes of recurrent DNA break clusters in brain progenitors identified by 3D proximity-based break joining assay. *PNAS.* 20 févr 2018;115(8):1919-24.
- Weissman IL, Gage FH. A Mechanism for Somatic Brain Mosaicism. *Cell.* 11 févr 2016;164(4):593-5.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 7 janv 2000;100(1):157-68.
- Wertelecki W. Malformations in a chornobyl-impacted region. *Pediatrics.* avr 2010;125(4):e836-843.
- West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2003;4(6):435-45.
- Wolff S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect.* févr 1998;106 Suppl 1:277-83.
- Wong FK, Marín O. Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 5 juill 2019;
- Woodbine L, Neal JA, Sasi N-K, Shimada M, Deem K, Coleman H, et al. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest.* juill 2013;123(7):2969-80.
- Wright WD, Heyer W-D. Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation. *Molecular Cell.* 6 févr 2014;53(3):420-32.
- Wyles SP, Brandt EB, Nelson TJ. Stem Cells: The Pursuit of Genomic Stability. *Int J Mol Sci.* 14 nov 2014;15(11):20948-67.

- Xiao S, Liu QZ, Wang RB, Zhang MY, Li P. An improved method of direct chromosome preparation from chorionic villus and high resolution banding technique. *Prenat Diagn.* août 1989;9(8):589-93.
- Xie A, Kwok A, Scully R. Role of mammalian Mre11 in classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Struct Mol Biol.* août 2009;16(8):814-8.
- Yamazaki JN, Schull WJ. Perinatal loss and neurological abnormalities among children of the atomic bomb. Nagasaki and Hiroshima revisited, 1949 to 1989. *JAMA.* 1 août 1990;264(5):605-9.
- Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 15 août 1997;16(16):5098-112.
- Yang B, Ren BX, Tang FR. Prenatal irradiation-induced brain neuropathology and cognitive impairment. *Brain Dev.* janv 2017;39(1):10-22.
- Yano K, Morotomi-Yano K, Lee K-J, Chen DJ. Functional significance of the interaction with Ku in DNA double-strand break recognition of XLF. *FEBS Lett.* 23 mars 2011;585(6):841-6.
- Yano K, Morotomi-Yano K, Wang S-Y, Uematsu N, Lee K-J, Asaithamby A, et al. Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.* janv 2008;9(1):91-6.
- Yeo W, Gautier J. Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev Biol.* 15 oct 2004;274(2):233-44.
- Zamenhof S, van Marthens E. The Effects of Pre- and Postnatal Exposure to Tritiated Water for Five Generations on Postnatal Brain Development. *Radiation Research.* 1981;85(2):292-301.
- Zha S, Alt FW, Cheng H-L, Brush JW, Li G. Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 mars 2007;104(11):4518-23.
- Zha S, Guo C, Boboila C, Oksenysh V, Cheng H-L, Zhang Y, et al. ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature.* 13 janv 2011;469(7329):250-4.
- Zhao Y, Zhong R, Sun L, Jia J, Ma S, Liu X. Ionizing Radiation-Induced Adaptive Response in Fibroblasts under Both Monolayer and 3-Dimensional Conditions. *PLoS One* [Internet]. 25 mars 2015 [cité 17 oct 2019];10(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373882/>
- Zhu C, Mills KD, Ferguson DO, Lee C, Manis J, Fleming J, et al. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell.* 28 juin 2002;109(7):811-21.
- Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A. Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol.* 23 janv 2001;11(2):105-9.
- Zou Y, Zhang N, Ellerby LM, Davalos AR, Zeng X, Campisi J, et al. Responses of Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Progeny to Ionizing Radiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 14 sept 2012;426(1):100-5.

**Titre :** Maintenance de la stabilité chromosomique des cellules souches neurales murines au cours du développement et après un stress génotoxique aigu ou chronique.

**Mots clés :** cellules souches et progéniteurs neuraux, fibroblastes embryonnaires murins, stabilité chromosomique, réponse adaptative, recombinaison d'extrémités non homologues, radiations

**Résumé :** Une exposition prénatale aux radiations ionisantes est associée au développement de pathologies neurodéveloppementales liées à l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules souches et progéniteurs neuraux (CSPN). Ainsi, la stabilité génétique des CSPN est cruciale pour le développement et l'homéostasie du cerveau. Cependant, des altérations génomiques au niveau des CSPN au cours du développement pourraient promouvoir la diversité neuronale.

XLF est un composant de la voie de réparation d'ADN par NHEJ (pour Non-Homologous End-Joining). Nous avons montré une augmentation de l'instabilité des CSPN dans le cerveau embryonnaire des souris *Xlf*<sup>-/-</sup> qui pourrait perturber la neurogenèse au cours du développement, et ainsi être responsable d'altérations comportementales identifiées chez ces souris à l'âge adulte.

A l'aide d'approches cytogénétiques, nous avons comparé la stabilité chromosomique des CSPN et des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) exposés à un stress génotoxique aigu (irradiation  $\gamma$ ) ou chronique (incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN). Nos résultats démontrent que les CSPN maintiennent leur intégrité génétique de façon plus efficace que les MEF. En effet, les CSPN semblent avoir de meilleures capacités de réparation des dommages à l'ADN que les MEF, ce qui leur permet de développer une réponse adaptative à un stress génotoxique chronique. Cette réponse adaptative implique XLF et agit conjointement avec les points de contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose pour préserver la stabilité du génome et éliminer les cellules endommagées. L'ensemble de nos résultats apporte la démonstration d'une réponse robuste aux dommages de l'ADN dans les CSPN et souligne l'importance de XLF lors du développement du cerveau.

**Title:** Maintenance of chromosomal stability of murine neural stem cells during development and after acute or chronic genotoxic stress.

**Keywords:** neural stem and progenitor cells, mouse embryonic fibroblasts, chromosome stability, adaptive response, non-homologous end-joining, radiation.

**Abstract:** Prenatal exposure to ionizing radiation has been associated with many neurodevelopmental disorders due to the DNA damage induced in neural stem and progenitor cells (NSPC). Thus, genetic stability of NSPC is crucial for brain development and homeostasis. Nevertheless, genomic alterations occurring during development in NSPC may have a potential impact on the physiological neuronal diversity. XLF is a component of the NHEJ (Non-Homologous End-Joining) repair pathway.

Here, we show that NSPC from *Xlf*<sup>-/-</sup> embryos exhibit increased chromosome instability, leading to premature neurogenesis and consequently neurobehavioral disorders.

Using cytogenetic approaches, we compared the chromosome stability of mouse embryonic NSPC and fibroblasts (MEF) exposed to acute ( $\gamma$ -irradiation) or chronic (incorporation of tritiated thymidine into DNA) genotoxic stress. Our results demonstrate the higher capacity of NSPC as compared to MEF to maintain their genomic integrity. We evidenced that NSPC have more efficient DNA repair activity than MEF, allowing them to develop an adaptive response to chronic genotoxic stress. This adaptive response involves XLF and acts together with apoptosis and cell cycle checkpoints to preserve the stability of the genome and to eliminate damaged cells. Altogether, our results provide new insights into the robust DNA damage response in NSPC and highlight the importance of Xlf during brain development.