



**HAL**  
open science

# Mutagenèse - Sources et détermination

Serge Gangloff

► **To cite this version:**

Serge Gangloff. Mutagenèse - Sources et détermination. Master. Génétique et Épigenétique Moléculaires, Institut Pasteur (Paris), France. 2021. pasteur-04068872

**HAL Id: pasteur-04068872**

**<https://pasteur.hal.science/pasteur-04068872>**

Submitted on 14 Apr 2023

**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.

# Génétique et Epigénétique Moléculaires

2021-2022

# Mutagenèse

Sources et Détermination

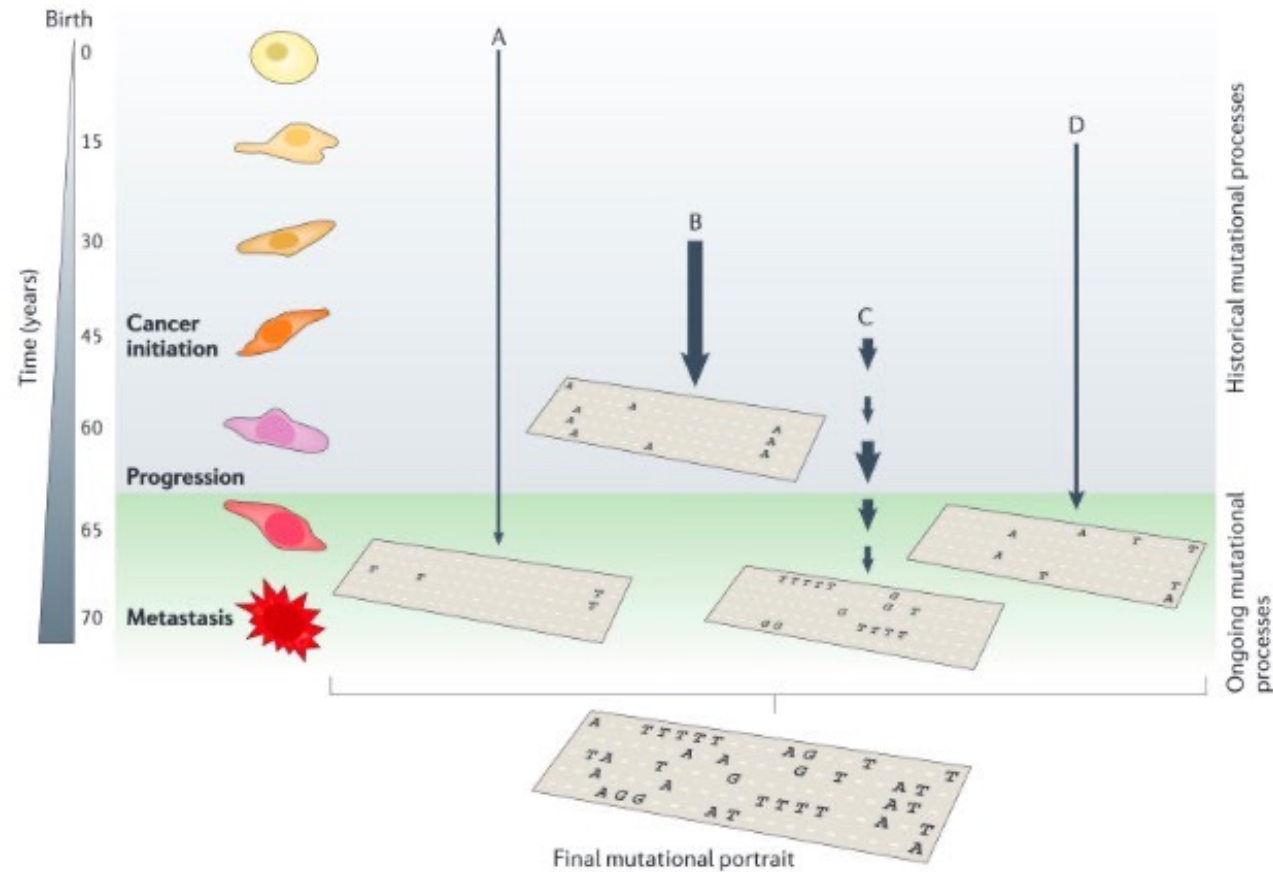
**Serge Gangloff - Dynamique du Génome - Institut Pasteur**

[serge.gangloff@pasteur.fr](mailto:serge.gangloff@pasteur.fr)

# **Part I : Qu'est-ce qu'une mutation génétique ?**

- **Les mutations sont des modifications du matériel génétique.**
- **Elles sont à l'origine des modifications évolutives.**
- **Les mutations germinales affectent les gamètes et sont transmissibles.**
- **Les mutations somatiques sont une cause importante de cancers.**

# Processus de mutation actifs au cours du développement du cancer



Le portrait mutationnel final est la somme de tous les différents processus mutationnels (A – D) qui ont été actifs pendant toute la vie

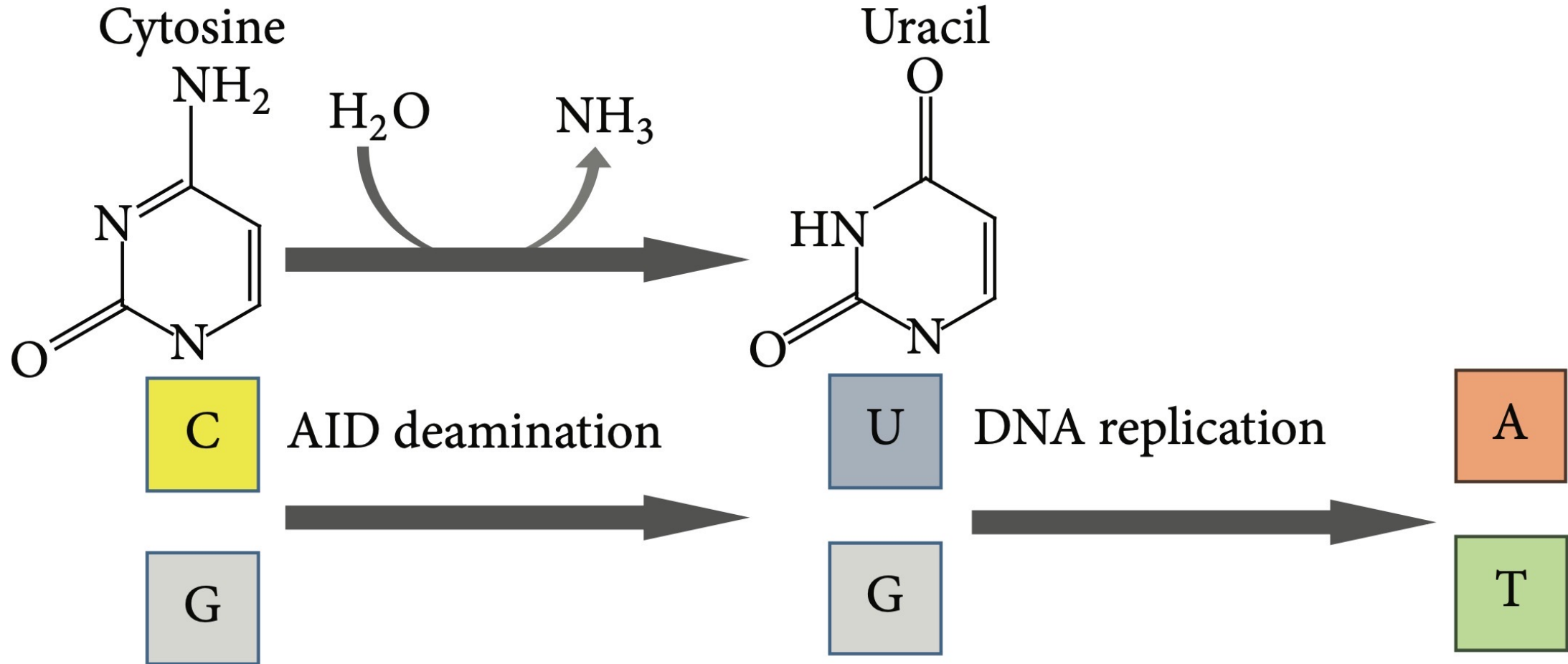
# Les mutations

- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs répliquatives
  - Altération des bases
  - Les points chauds (hotspot)
- **Induites qui résultent d'une interaction entre l'ADN et un agent mutagène**
  - Radiations UV ou ionisantes
  - Agents chimiques
  - Cytidine deamination (APOBEC - AID)
- **Épigénétiques**
  - Modifications réversible des marques chromatiniennes

# Les mutations

- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs répliquatives
  - Altération des bases
  - Les points chauds (hotspot)
- **Induites qui résultent d'une interaction entre l'ADN et un agent mutagène**
  - Radiations UV ou ionisantes
  - Agents chimiques
  - Cytidine deamination (APOBEC - AID)
- **Épigénétiques**
  - Modifications réversible des marques chromatiniennes

# Activation-Induced Deaminase (AID)



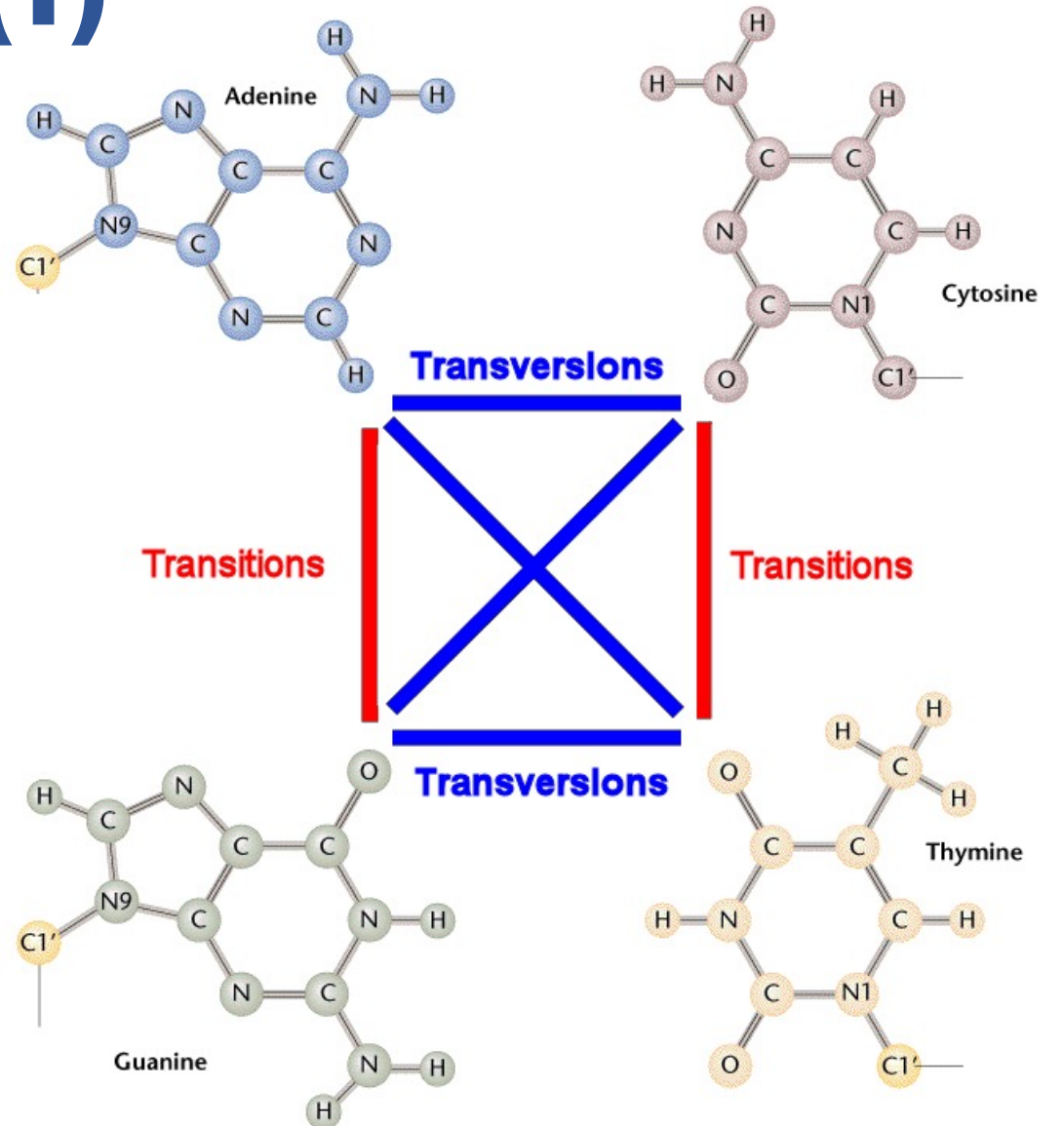
# Les mutations

- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs répliquatives
  - Altération des bases
  - Les points chauds (hotspot)
- **Induites qui résultent d'une interaction entre l'ADN et un agent mutagène**
  - Radiations UV ou ionisantes
  - Agents chimiques
  - Cytidine deamination (APOBEC - AID)
- **Épigénétiques**
  - Modifications réversible des marques chromatiniennes



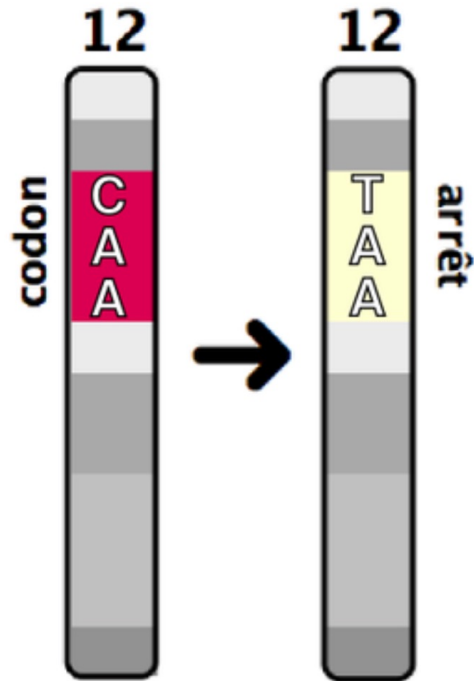
# Les types de mutation (1)

- Les substitutions de nucléotides

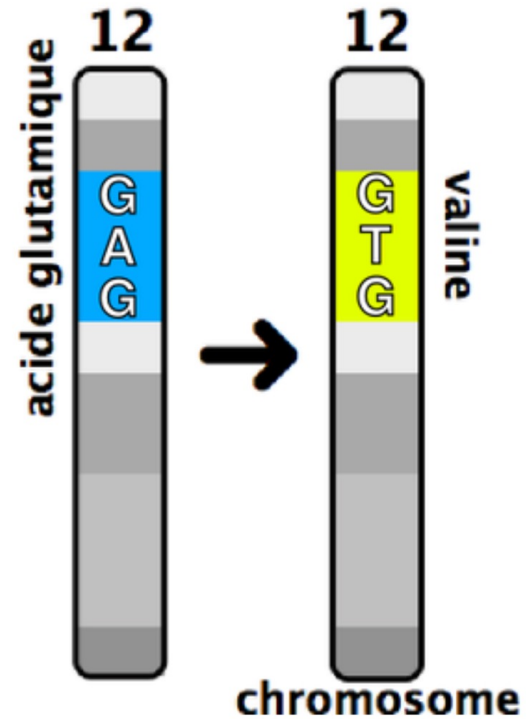


# Les types de mutation (2)

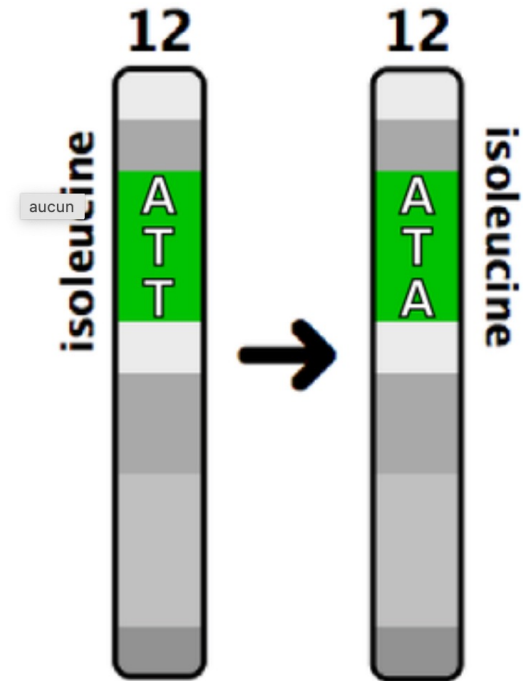
## Non-sens



## Faux-sens

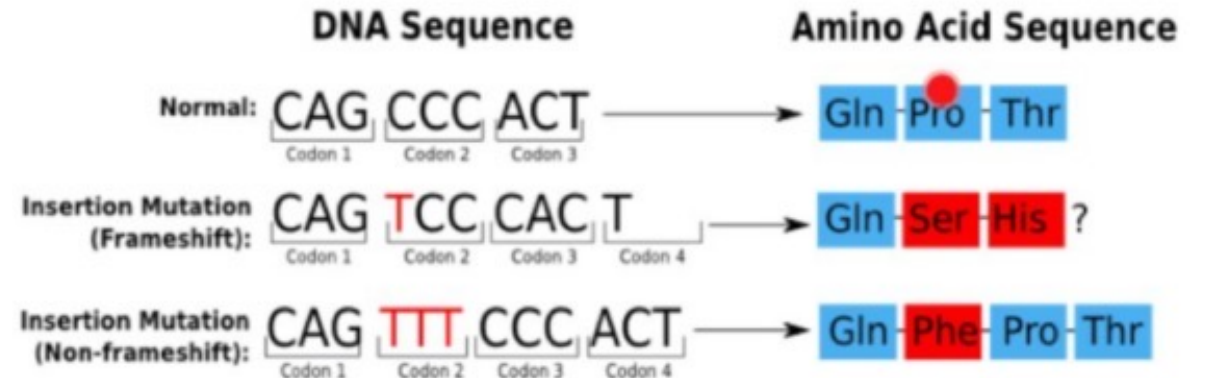
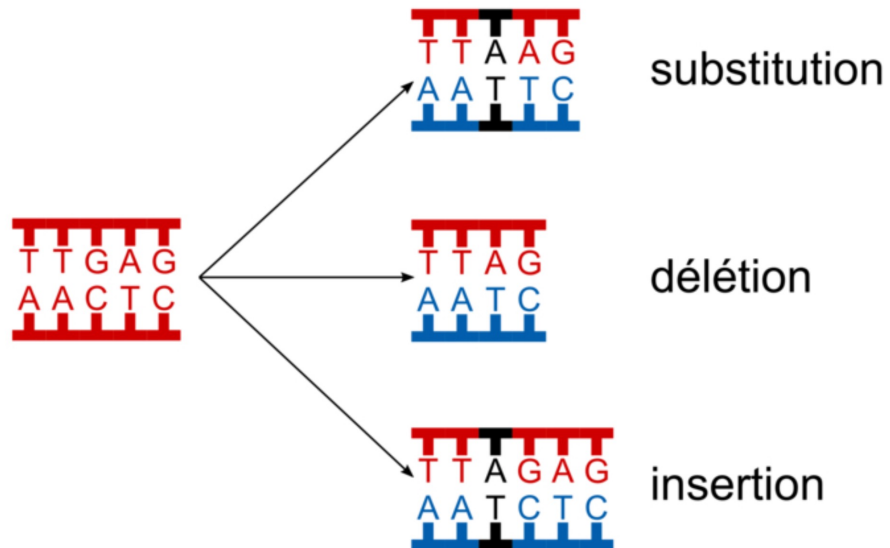


## Même-sens *Silencieux*



# Les types de mutation (3)

- Les modifications du cadre de lecture (Frameshift)

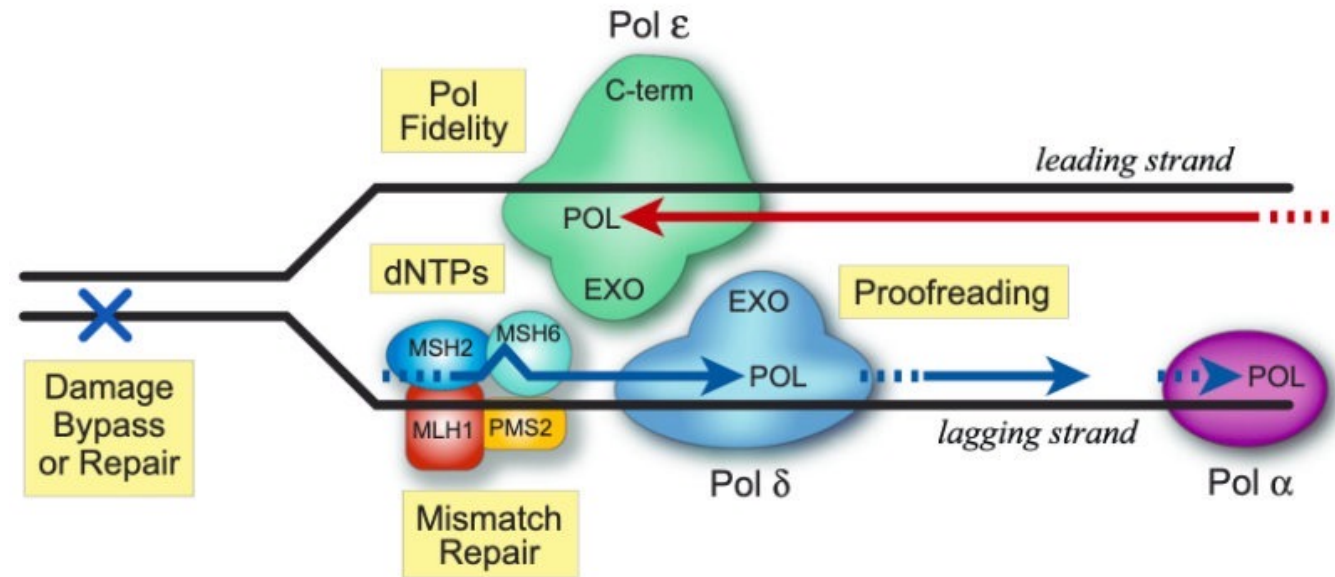
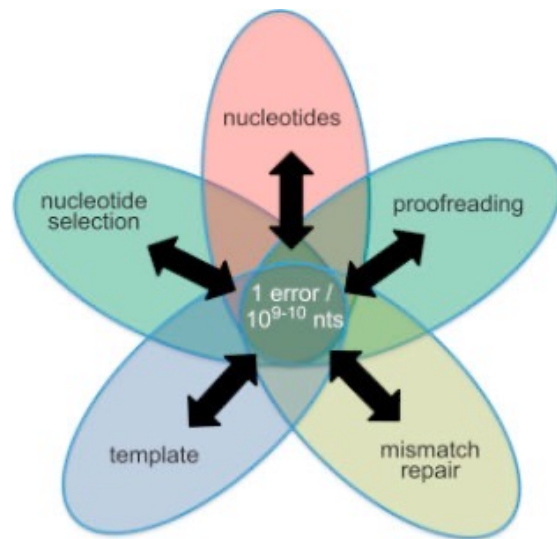


# **L'origine des mutations spontanées**

- **La fiabilité de la polymérase et les erreurs de réplication**
- **Des altérations affectant les bases**
- **Altérations structurales des bases**
- **Les points chauds de mutation**

# L'origine des mutations spontanées

## La fiabilité de la polymérase et les erreurs de réplication

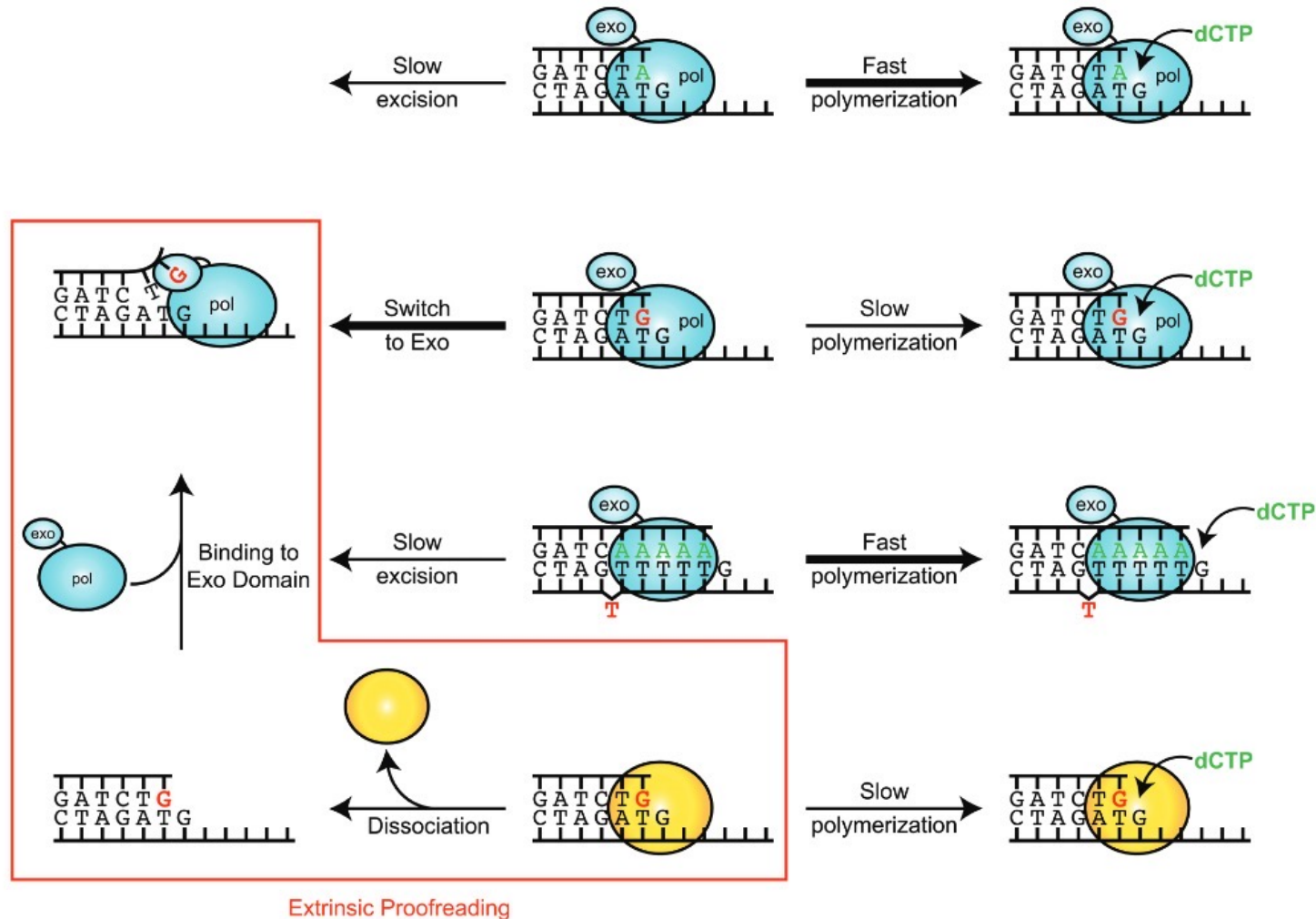


Ganai, R.A., and Johansson, E. (2016). Mol Cell 62, 745–755.

Preston, B.D., Albertson, T.M., and Herr, A.J. (2010). Semin Cancer Biol 20, 281–293.

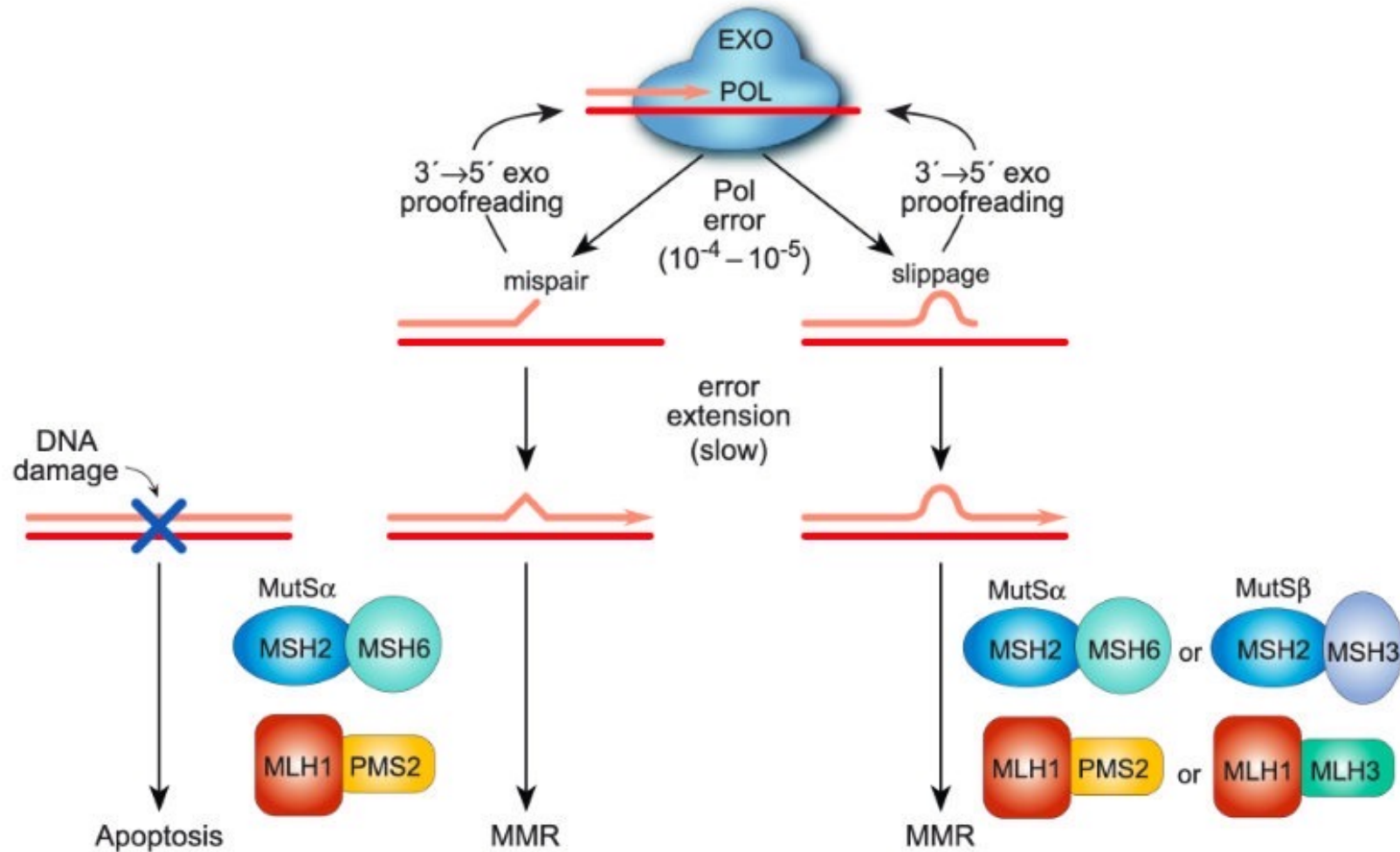
# L'origine des mutations spontanées

## La relecture (proofreading)



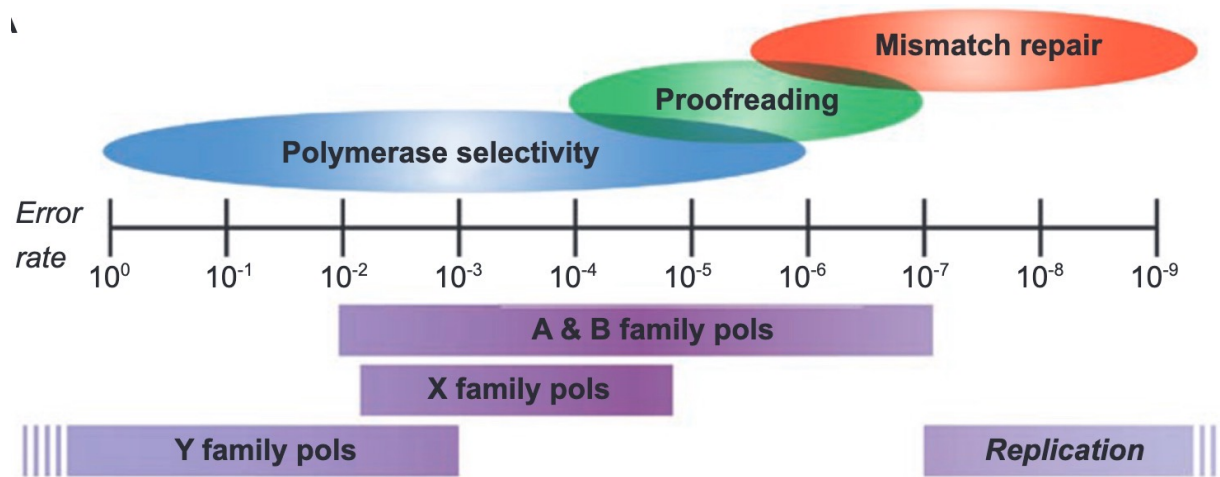
# L'origine des mutations spontanées

## La réparation des mésappariements (MMR)



# L'origine des mutations spontanées

## Taux d'erreur des ADN polymérase A et B



Kunkel, T.A. (2009). Cold Spring Harb Sym 74, 91–101.

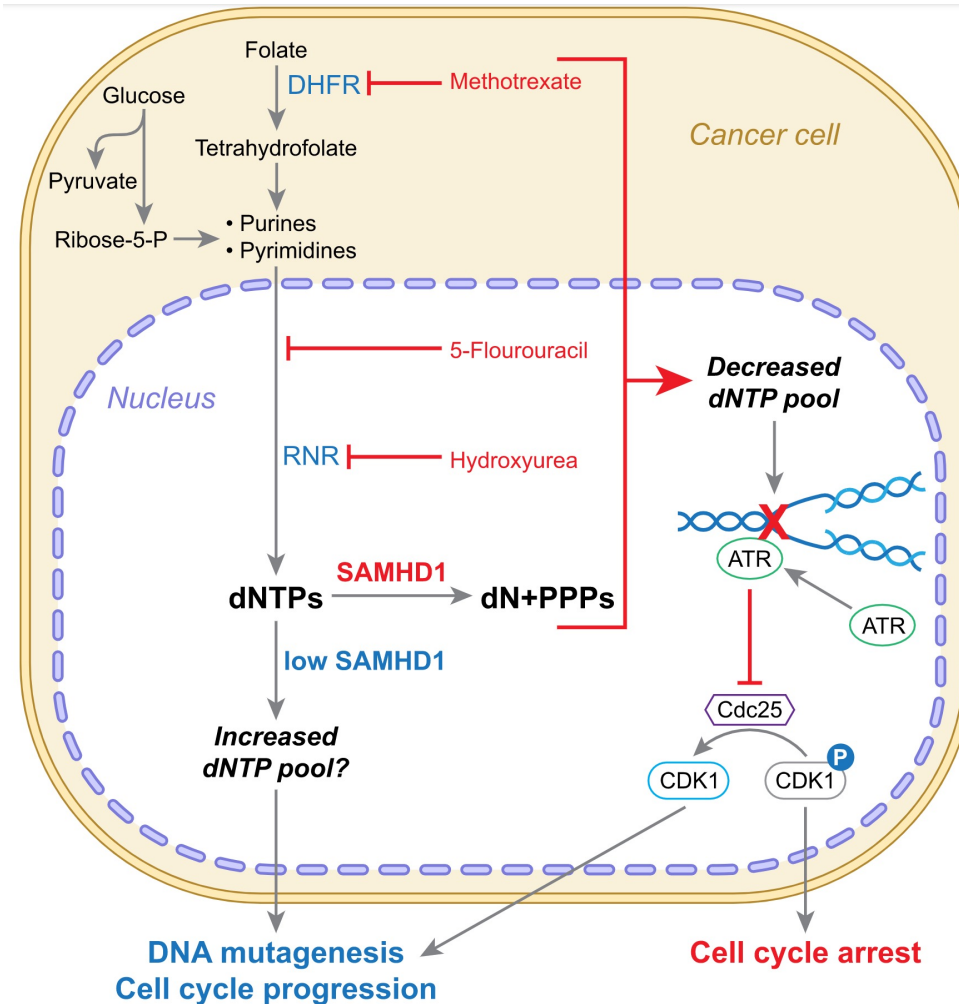
Origin <sup>1</sup>	Polymerase <sup>2</sup>	Family	Error rate ( $\times 10^{-5}$ )	
			Single base substitution	Single base indel
<i>Replicative polymerases</i>				
<i>Exonuclease deficient</i>				
Hs	$\gamma$	A	4.5	1.7
Sc	$\alpha$	B	9.6	3.1
Sc	$\delta$	B	1.3	5.7
Sc	$\epsilon$	B	24	5.6
<i>Exonuclease proficient</i>				
Hs	$\gamma$	A	1.0	$\leq 0.12$
Sc	$\delta$	B	$\leq 1.3$	1.3
Sc	$\epsilon$	B	$\leq 0.2$	$\leq 0.05$

McCulloch, S.D., and Kunkel, T.A. (2008). Cell Res 18, 148–161.



# L'origine des mutations spontanées

## Déséquilibre du pool de dNTPs

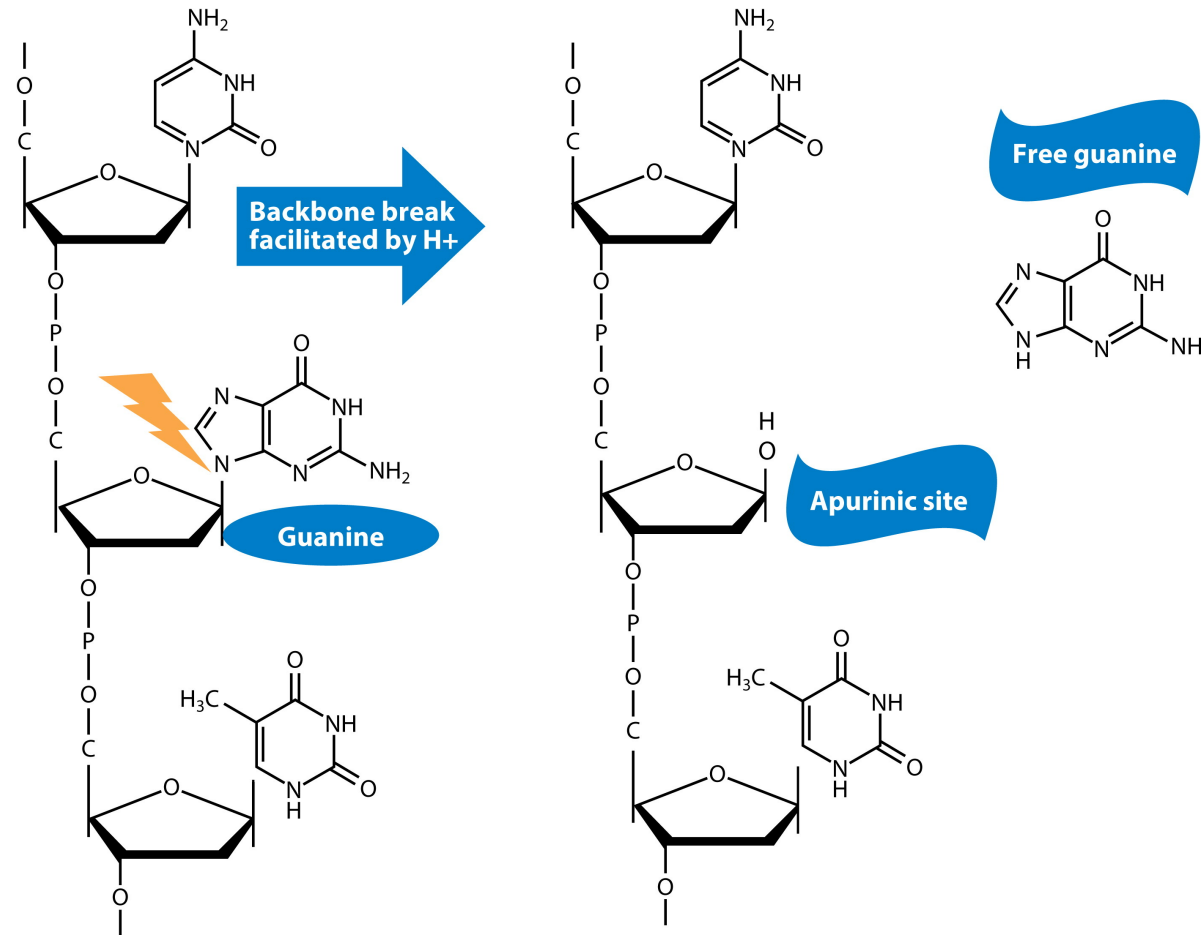


# Les altérations affectant les bases

- **Les dépurinations (hydrolyse)**
- **Les déaminations (hydrolyse)**
- **Les oxydations**
- **Les alkylations**
- **Les altérations structurales**

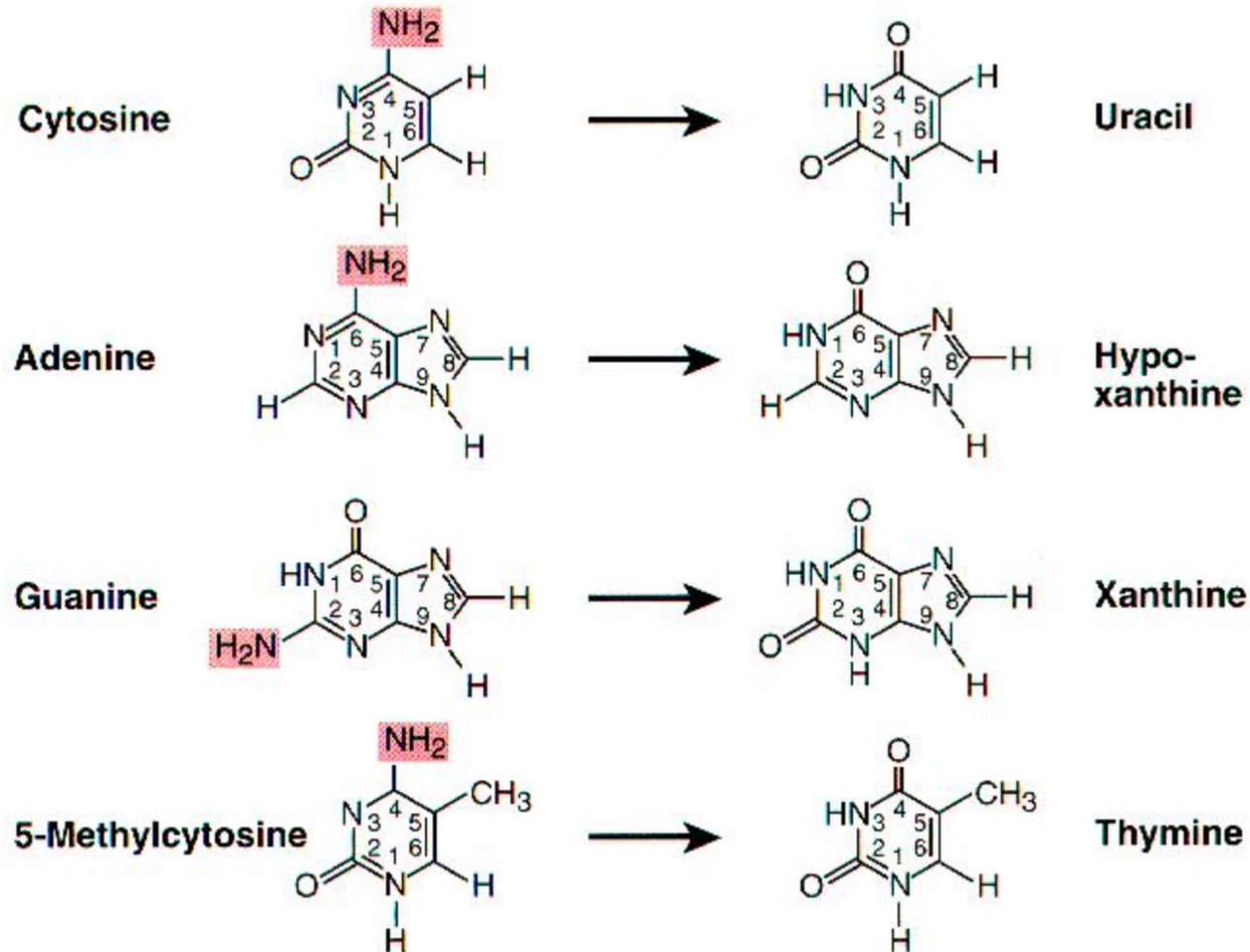
# Les altérations affectant les bases

## La dépurination (hydrolyse)



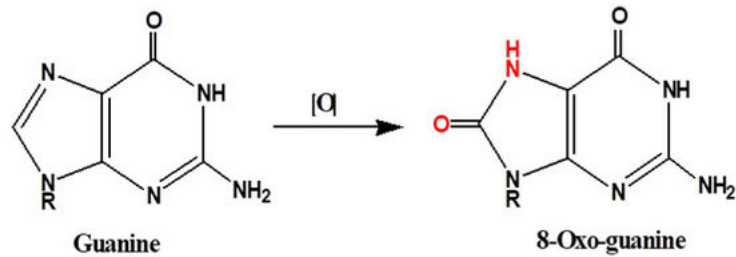
# Les altérations affectant les bases

## La déamination spontanée (hydrolyse)

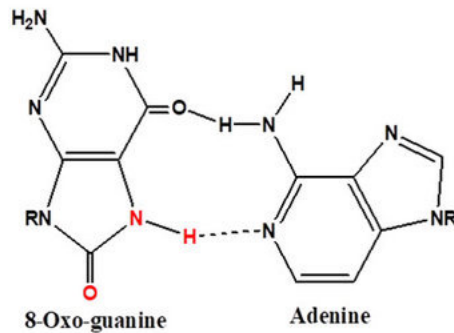


# Les altérations affectant les bases

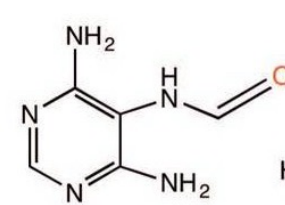
## L'oxydation



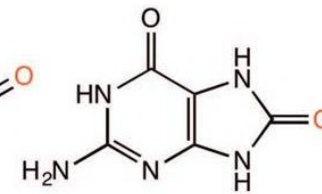
(a) Oxidation of Guanine by Oxygen in 8-oxo-guanine



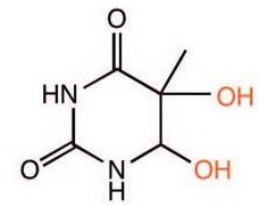
(b) Hoogsteen hydrogen bonding between 8-oxo-guanine and adenine nucleic acid bases.



Formamidopyrimidine



7,8 dihydro-8-oxoguanine

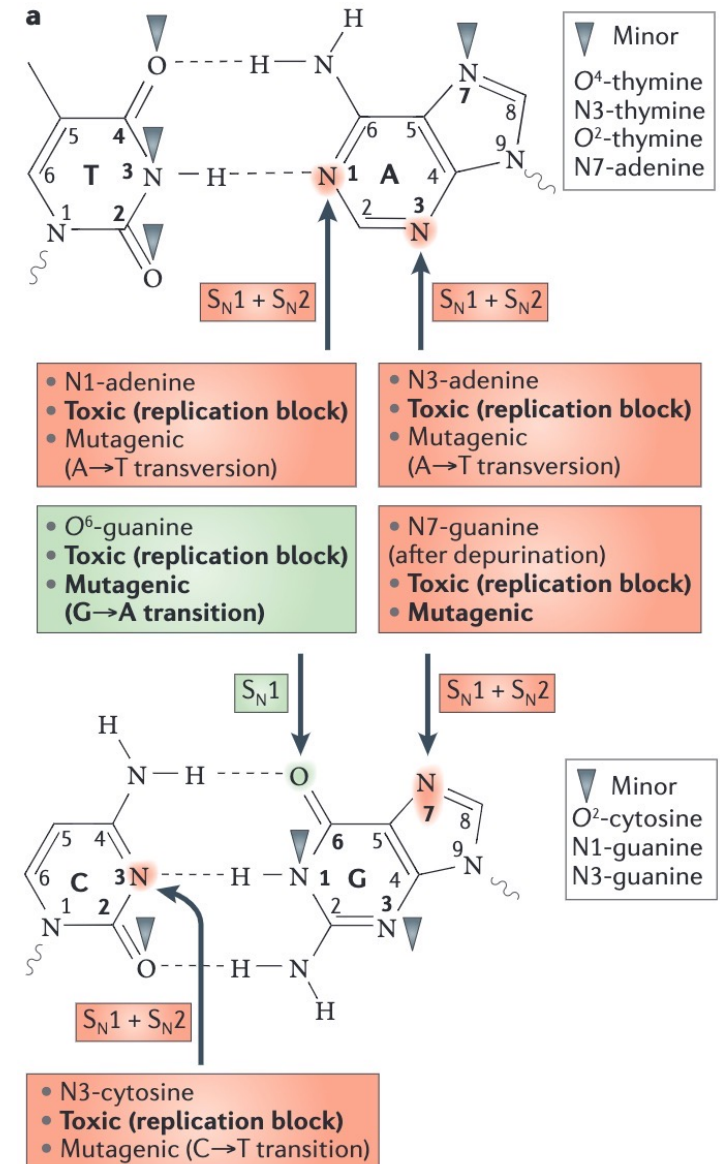


Thymine glycol

# Les altérations affectant les bases

## L'alkylation

- Les lésions alkylantes interfèrent avec l'efficacité et la précision de la réplication et de la transcription.
- Les agents alkylants réagissent avec les atomes d'azote et d'oxygène des bases pour former des liaisons covalentes.
- La N7-méthyl guanine (7meG) est la forme de méthylation prédominante (60 à 80% des lésions d'alkylation totales dans l'ADN).
- La N3-méthyladénine (3meA) représente 10 à 20% des adduits totaux de méthyle. Elle est cytotoxique, et peut bloquer la plupart des ADN polymérases, inhiber la synthèse de l'ADN et conduire à des transversions AT → TA.
- La position O<sub>6</sub> de la guanine est un site privilégié de méthylation (O<sub>6</sub>meG) qui peut facilement être associée à la thymine lors de la réplication et provoquer de nombreux effets biologiques mutagènes et cytotoxiques.

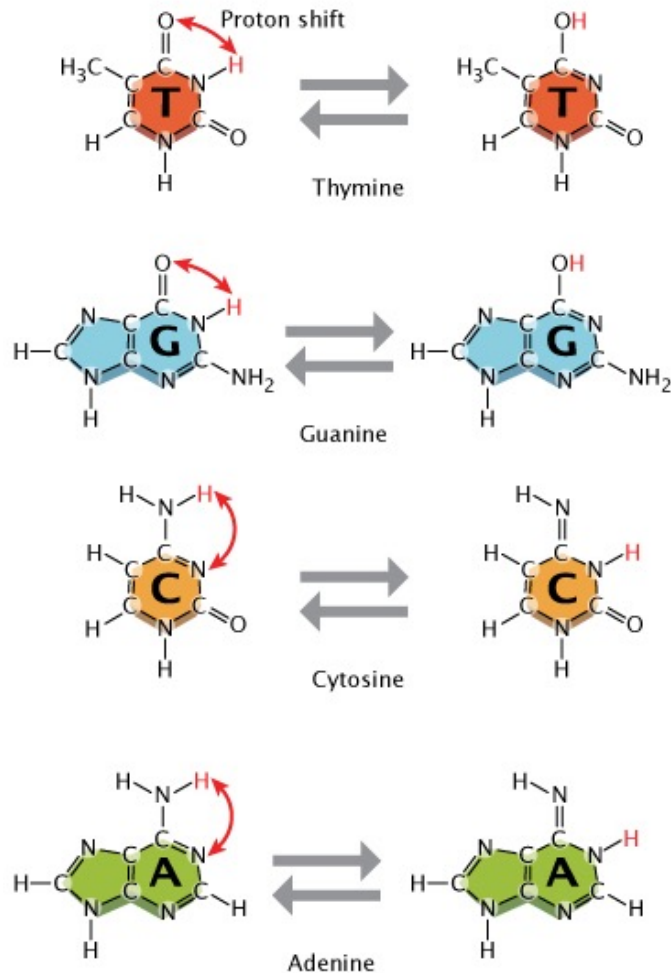


# Les altérations structurales des bases

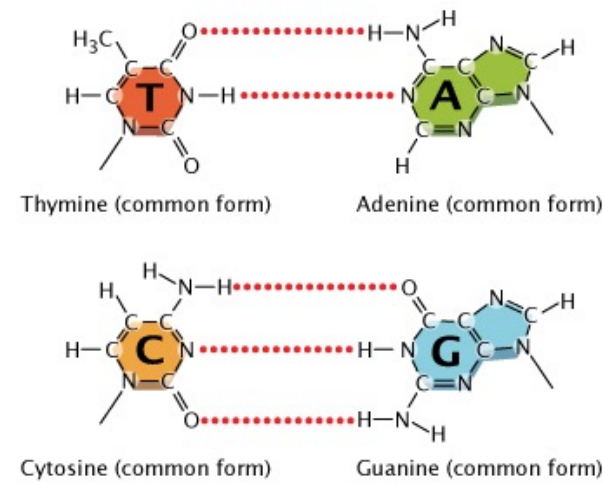
## Les tautomères

(a) Common forms

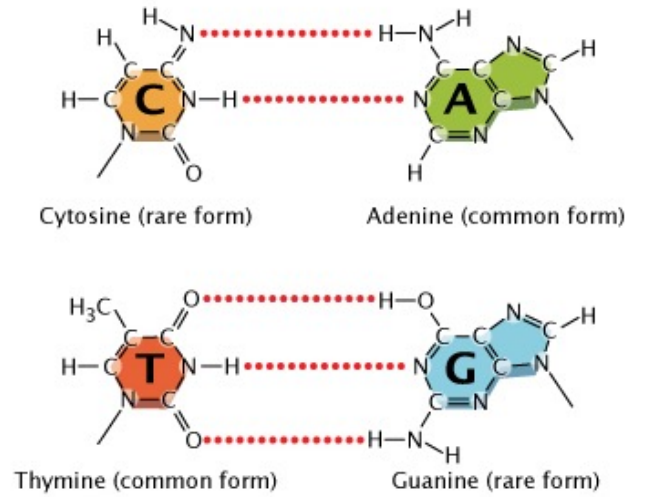
Rare forms



(b) Common base-pairing arrangements



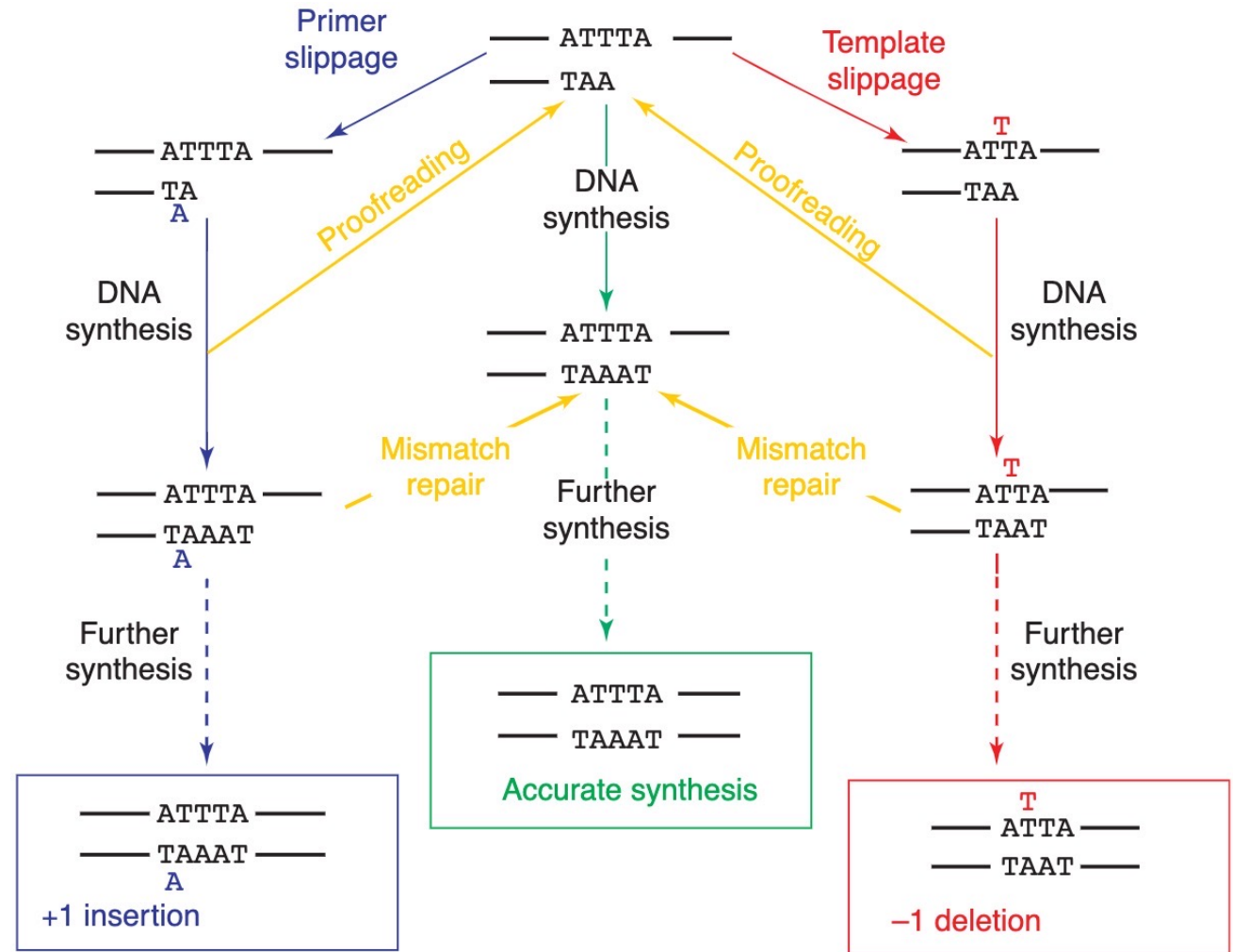
(c) Rare base-pairing arrangements



# Les points chauds de mutations

Ce sont des secteurs contenant des nucléotides répétés

Il peut s'agir d'un glissement entre le brin matrice et le brin en cours de synthèse. De tels secteurs constituent des « points chauds ». Selon que le nucléotide non apparié se trouve sur le brin matrice ou néosynthétisé, la réplication peut conduire à une délétion ou à une insertion si la relecture et le MMR n'ont pas fait correctement leur travail.



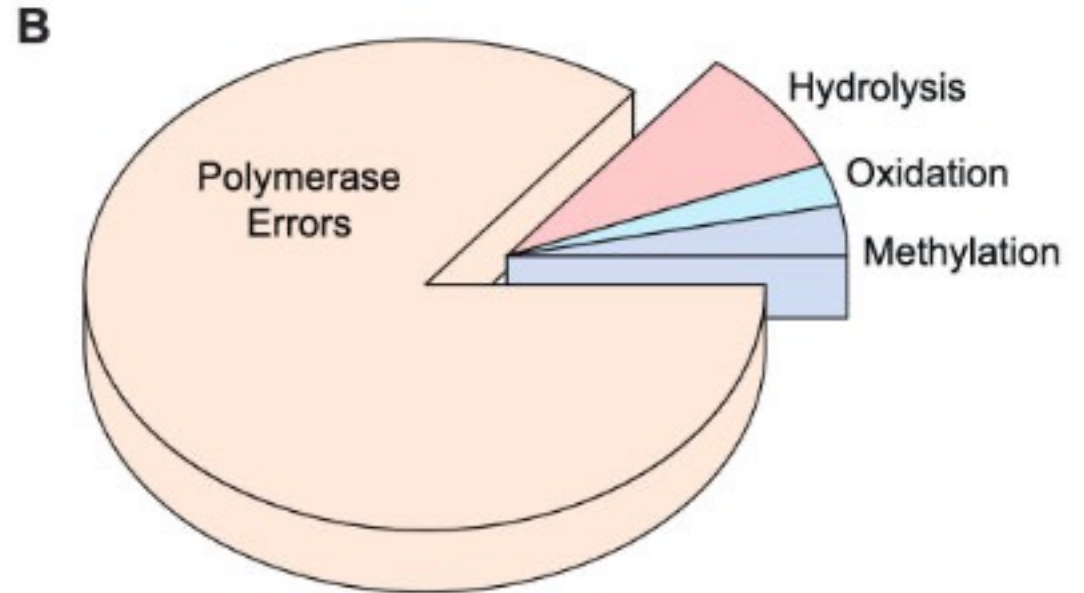


# Réparation des bases endommagées

## Nombre de lésions quotidiennes dans une cellule de mammifère

**A**

Type of Damage	events / cell / day
<b>Hydrolysis</b>	
depurination	9,000 - 10,000
depyrimidination	300 - 500
C deamination	50 - 500
5-MeC deamination	5 - 50
	<hr/>
	~10,000
<b>Oxidation</b>	
8-oxoG	500 - 1,000
ring-saturated pyrimidines	1,000
lipid peroxidation products	1,000
	<hr/>
	~3,000
<b>Methylation</b>	
7-MeG	3,000 - 4,000
3-MeA	600
0 <sup>6</sup> -MeG	10 - 50
	<hr/>
	~4,000
<b>Total</b>	<hr/>
	~20,000



# Réparation des bases endommagées

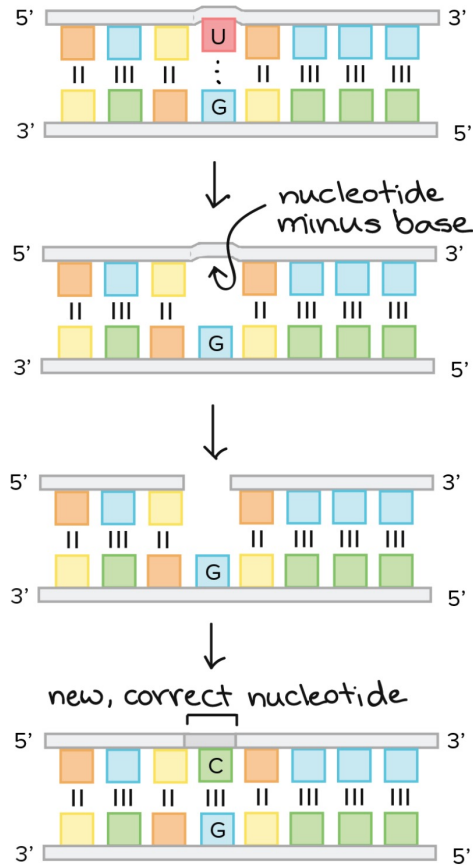
## Les ADN glycosylases de mammifères

Type of base lesion	Name	Physiological substrates	Mono (M)/ bi(B) functional	Mouse knockout (ko)/ knockdown (kd) phenotype	
Uracil in ssDNA dsDNA	UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU, ss and dsDNA	M	ko: viable, B-cell lymphomas, disturbed antibody diversification
	SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5-hmU, 5-FU, ss and dsDNA	M	kd: moderate increase in mutation frequency (C→T)
Pyrimidine derivatives in mismatches	MBD4	Methyl-binding domain glycosylase 4	T, U, 5-FU, εC, opposite G, dsDNA	M	ko: viable, elevated mutation frequency (C→T)
	TDG	Thymine DNA glycosylase	T, U, 5-FU, εC, 5-hmU, 5-fC, 5-caC; opposite G, dsDNA	M	ko: embryonic lethal, aberrant DNA methylation and imbalanced chromatin marks in CpG-rich promoters
Oxidative base damage	OGG1	8-OxoG DNA glycosylase 1	8-oxoG, FaPy, opposite C, dsDNA	B	ko: viable, accumulation of 8-oxoG, elevated mutation frequency (G→T)
	MYH	MutY homolog DNA glycosylase	A opposite 8-oxoG, C or G, 2-hA opposite G, dsDNA	M	ko: viable, see OGG1
Alkylated purines	MPG	Methylpurine glycosylase	3-meA, 7-meG, 3-meG, hypoxanthine, εA, ss and dsDNA	M	ko: viable, elevated levels of ethenoA and hypoxanthine
Oxidized, ring-fragmented or -saturated pyrimidines	NTHL1	Endonuclease III-like 1	Tg, FaPyG, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B	ko: viable
	NEIL1	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	Tg, FaPyG, FaPyA, 8-oxoG, 5-hU, 5-hC, ss and dsDNA	B	ko: metabolic syndrome, increased damage levels in mitochondrial DNA; kd: hypersensitive to γ radiation
	NEIL2	Endonuclease VIII-like glycosylase 2	As NTHL1 and NEIL1	B	Unknown
	NEIL3	Endonuclease VIII-like glycosylase 3	FaPyG, FaPyA, prefers ssDNA	B	ko: normal

U, uracil; , A, adenine; , T, thymine; , C, cytosine, G, guanine; , ss single stranded; , ds, double stranded; , 5-hm, 5-hydroxymethyl; , 5-FU, 5-fluorouracil; , ε, etheno; , 5-fC, 5-formylcytosine; , 5-caC, 5-carboxylcytosine; , 8-oxoG, 8-oxo-7,8-dihydroguanine; , Tg, thymine glycol; , FaPy, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine; , me, methyl; , h, hydroxyl

# Réparation des bases endommagées

## Les glycosylases et le BER

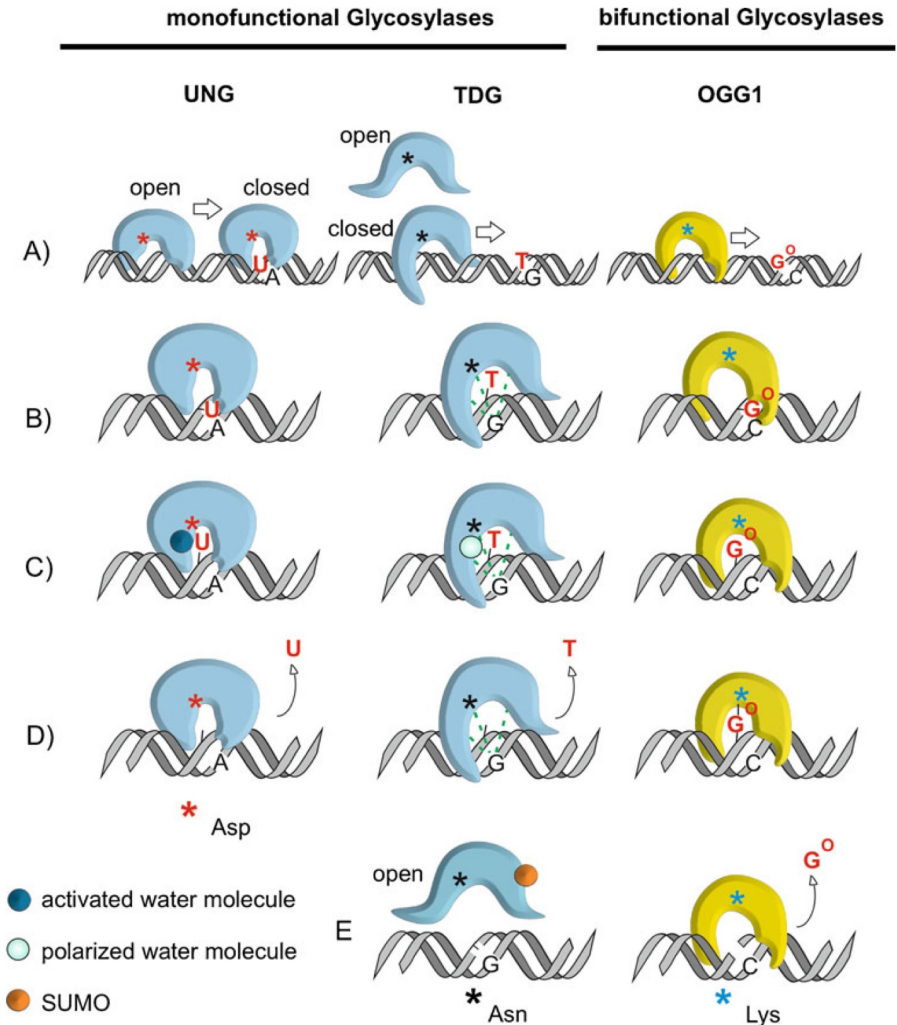


Deamination converts a cytosine base into a uracil.

The uracil is detected and removed, leaving a base-less nucleotide.

The base-less nucleotide is removed, leaving a small hole in the DNA backbone.

The hole is filled with the right base by a DNA polymerase, and the gap is sealed by a ligase.



# **Part II : Comment mesurer la mutagenèse ?**

## **Mesure qualitative**

- **Le test de fluctuation de Luria & Delbrück**

## **Estimations quantitatives**

- **La méthode de Lea & Coulson**
- **La méthode “Maximal Likelihood” de Ma, Sarkar et Sandri (MSS)**

## **Détermination directe**

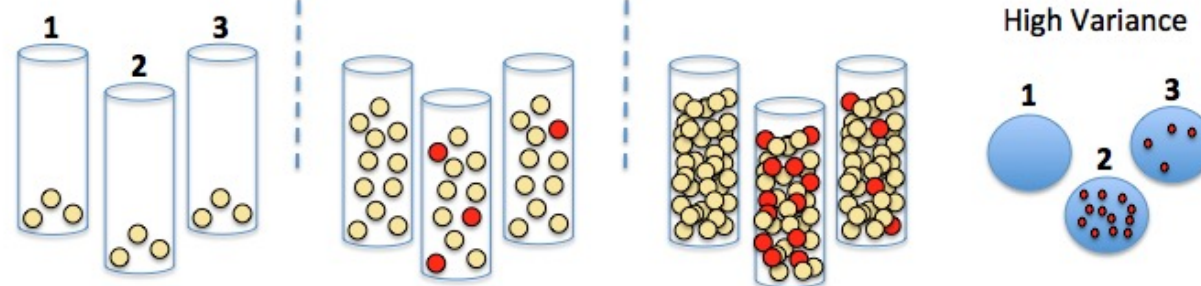
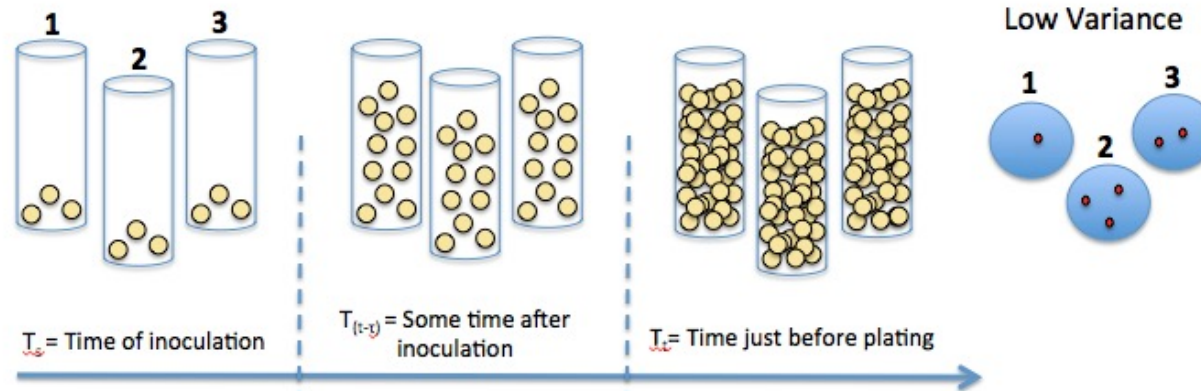
- **L’accumulation de mutations**

# **Les hypothèses de Luria et Delbrück (1943)**

- **Hypothèse de mutation préexistantes**
- **Hypothèse de mutation acquise.**

# Le test de fluctuation de Luria et Delbrück (1943)

## Acquired Immunity Hypothesis



## Mutation Hypothesis

# Conclusion du test de Luria–Delbrück

- Les cultures microbiennes s'adaptent rapidement aux agents létaux tels que les antibiotiques ou les virus en acquérant des mutations de résistance.
- L'expérience de Luria-Delbrück (1943) (également appelée test de fluctuation) démontre que chez les bactéries, les mutations génétiques surviennent en l'absence de sélection, plutôt qu'en réponse à la sélection.
- Par conséquent, la théorie de Darwin de la sélection naturelle agissant sur des mutations aléatoires s'applique aux bactéries ainsi qu'aux organismes plus complexes.
- Max Delbrück et Salvador Luria ont remporté en 1969 le prix Nobel de physiologie/médecine en partie pour ces travaux.

# **Le test de D. E. Lea & C. A. Coulson (1949)**

**Extension de la méthode de Luria & Delbrück en calculant la forme de la distribution du nombre de mutants dans des cultures parallèles basée sur la théorie des mutations spontanées, faisant du test de Luria & Delbrück un test quantitatif.**



# Terminologie

Terme	Définition
<b>m</b>	Nombre de mutations par culture
<b>r</b>	Nombre de mutants observés dans une culture
<b>r<sub>0</sub></b>	Nombre médian de mutants dans les cultures parallèles
<b>N<sub>0</sub></b>	Nombre initial de cellules dans une culture = l'inoculum
<b>N<sub>t</sub></b>	Nombre final de cellules dans une culture
<b>N</b>	Nombre de cellules
<b>μ</b>	Taux de mutation ; probabilité de mutation par cellule par division
<b>f</b>	Fraction de mutant ou fréquence = $r/N$
<b>V</b>	Volume de la culture
<b>C</b>	Nombre de cultures dans l'expérience

Pour une valeur du nombre de mutations  $1.5 \leq m \leq 15$  dans une culture ( $2.5 \leq r_0 \leq 60$ ), un graphique de la probabilité qu'une culture contienne un nombre de mutants  $r$  inférieur à  $r_0$  dans les cultures parallèles par rapport à  $r_0/m - \ln(m)$  a donné une courbe biaisée autour d'une **médiane de 1.24** donc  $r_0/m - \ln(m) - 1.24 = 0$ .

# Accumulation de Mutants

Generation = k	Cells = N	New mutants	Growth of pre-existing mutants	Total mutants = r	Mutant fraction = r/N	Change per generation = $\mu$
4	$N_t/16$	0		0	0	
3	$N_t/8$	1	1 → 2	1	$8/N_t$	$8/N_t$
2	$N_t/4$	2	2 → 4	4	$16/N_t$	$8/N_t$
1	$N_t/2$	4	4 → 8	12	$24/N_t$	$8/N_t$
0	$N_t$	8	8 → 8	32	$32/N_t$	$8/N_t$

Lorsqu'une population croît de façon exponentielle, l'apparition de nouveaux mutants et la prolifération de mutants préexistants se traduisent par **une augmentation constante de la fraction mutante à chaque génération**. Le taux de mutation correspond à cette augmentation et peut être déterminé en mesurant le changement de la fraction mutante au fil du temps.

# Le modèle de Lea-Coulson repose sur les hypothèses suivantes :

- L'inoculum ne doit pas contenir de mutants et doit être petit par rapport à  $N_t$
- Les cellules se développent de façon exponentielle
- La probabilité de mutation n'est pas influencée par les événements mutationnels précédents
- La probabilité de mutation est constante par durée de vie cellulaire
- Les taux de croissance des mutants et des non mutants sont les mêmes
- La proportion de mutants est toujours faible
- Les réversions sont négligeables
- La mort cellulaire est négligeable
- Tous les mutants sont détectés
- Aucun mutant n'apparaît après l'imposition de la sélection
- Le nombre de cellules produit dans chaque culture doit être identique.

# Les résultats d'un test

- On compte  $r$ , le nombre de mutants pour chaque culture et on détermine  $r_0$  la médiane de toutes les cultures parallèles (la valeur la plus probable du nombre de mutants par culture)
- On calcule  $m$ , qui permet d'estimer le taux de mutation  $\mu$  après une division de  $m$  par un nombre de cellules (donc de doublements). Contrairement à  $r$ ,  $m$  suit une loi de Poisson.
- Il y a différentes manières de calculer  $m$ .
- Dans Lea & Coulson, le calcul est basé sur l'observation que pour  $4 \leq m \leq 15$ , le graphe de la probabilité qu'une culture contienne un nombre de mutants  $\leq r_0$  en fonction de  $r_0/m - \ln(m)$  affiche une courbe biaisée pour une valeur de médiane de 1.24.
- Puisque nous savons que la variable dérivée est normalement distribuée autour de la médiane 0, il s'ensuit que :  $r_0/m - \ln(m) = 1.24$  à la médiane et -0.2 et 4.1 aux quartiles.
- Ceci permet d'estimer  $m$  par interpolation à partir des valeurs expérimentales de  $r_0$  à partir de la **table 3** de Lea & Coulson ( $1.4 \leq r_0 \leq 4400$ ).
- Fonctionne bien pour des valeurs de  $1.5 \leq m \leq 15$  ou  $2.5 \leq r \leq 6$

# La méthode “MSS Maximal Likelihood Estimator” (MSS-MLE)

Les méthodes du maximum de vraisemblance calculent à partir de la fonction de Lea-Coulson le **m** le plus probable qui donnerait la distribution observée de *r*.

En utilisant une estimation de **m** (par exemple, à partir de la médiane), *pr* est calculé pour chaque *r* possible de 0 à la valeur maximale obtenue.

La somme est évaluée, et les valeurs adjacentes de **m** sont ensuite utilisées pour répéter les calculs jusqu'à ce que l'équation s'approche de zéro.

$$p = e^{-m}; pr = \frac{m}{r} \sum_{i=0}^{r-1} pi / (r - i + 1)$$

L'algorithme est récursif, et les proportions de cultures avec 0, 1, 2, 3, etc. mutants sont :

$$p0 = e^{-m}; p1 = m * \frac{p0}{2}; p2 = \frac{m}{2} * \left( \frac{p0}{3} + \frac{p1}{2} \right); p3 = \frac{m}{3} * \left( \frac{p0}{4} + \frac{p1}{3} + \frac{p2}{2} \right); etc$$

La probabilité maximale est donnée par :

$$f(r|m) = \prod_{i=1}^c f(ri|m) \text{ où } f(r|m) = pr \text{ et } c = \text{nombre de cultures}$$

**MSS est la meilleure méthode disponible pour estimer m. Il utilise tous les résultats d'une expérience de fluctuation et est valable sur toute la plage de valeurs de m.**

# La bonne nouvelle...

- <http://genomics.brocku.ca/FALCOR/>

Hall, B.M., Ma, C.-X., Liang, P., and Singh, K.K. (2009). *Bioinformatics* 25, 1564–1565.

**FALCOR** Fluctuation Analysis Calculator Liang Lab & Singh Lab

## FALCOR

*Fluctuation Analysis Calculator*

"The program FALCOR is a web tool designed for use with Luria-Delbrück fluctuation analysis to calculate the mutation frequency and rate from various mutation assays in bacteria and yeast (e.g. resistance to canavanine or erythromycin, reversion to Trp<sup>+</sup>, etc.)."

This tool was originally developed as a Java Applet (no longer supported by browsers) by [Hall et al. 2009](#) and has now been updated to Javascript by the Liang Lab.

The original background descriptions and instructions on the tool can found [here](#).

---

**INPUT**

**ANALYSIS METHOD:**

Frequency  
 Lea-Coulson Method of the Median  
 MSS Maximum Likelihood Method

**GROUPING:**

Group data by 10  
 Group data by 20  
 Group data by 30  
 Group data by   
 Group all data

**RATE:**

per 10<sup>7</sup>  mutations/generation

**MUTANTS (r) & CELLS (N) :**  
(Click here for example data set)

\*r (value/mL)

\*N (value/mL)

**OUTPUT**

**Frequency**  
Frequency (per 10<sup>x</sup>)

**Sorted**  
Sorted Frequency

**Medians**  
Mutation Frequency Medians (per 10<sup>x</sup>)

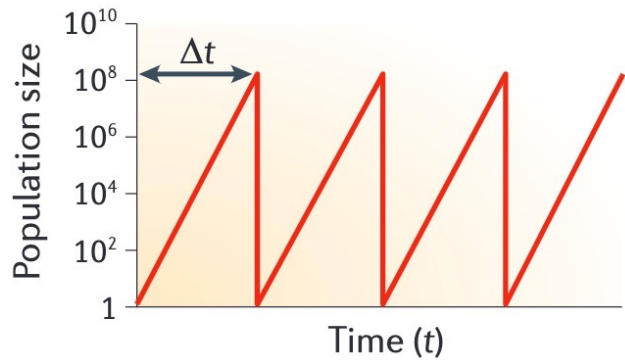
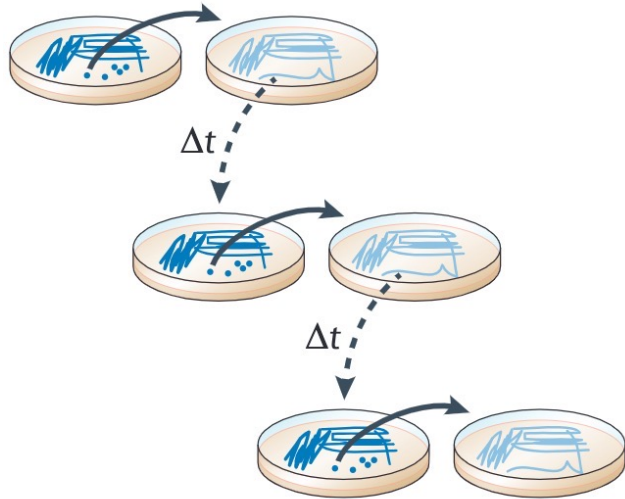
**95% CI range**

Upper Bound  Lower Bound

**95% CI median +/-**

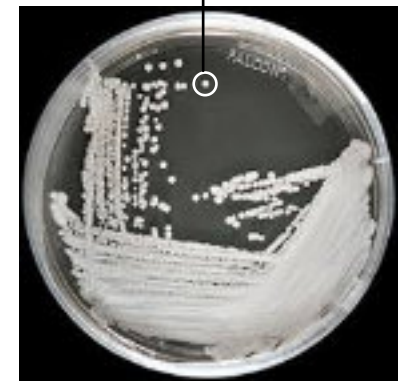
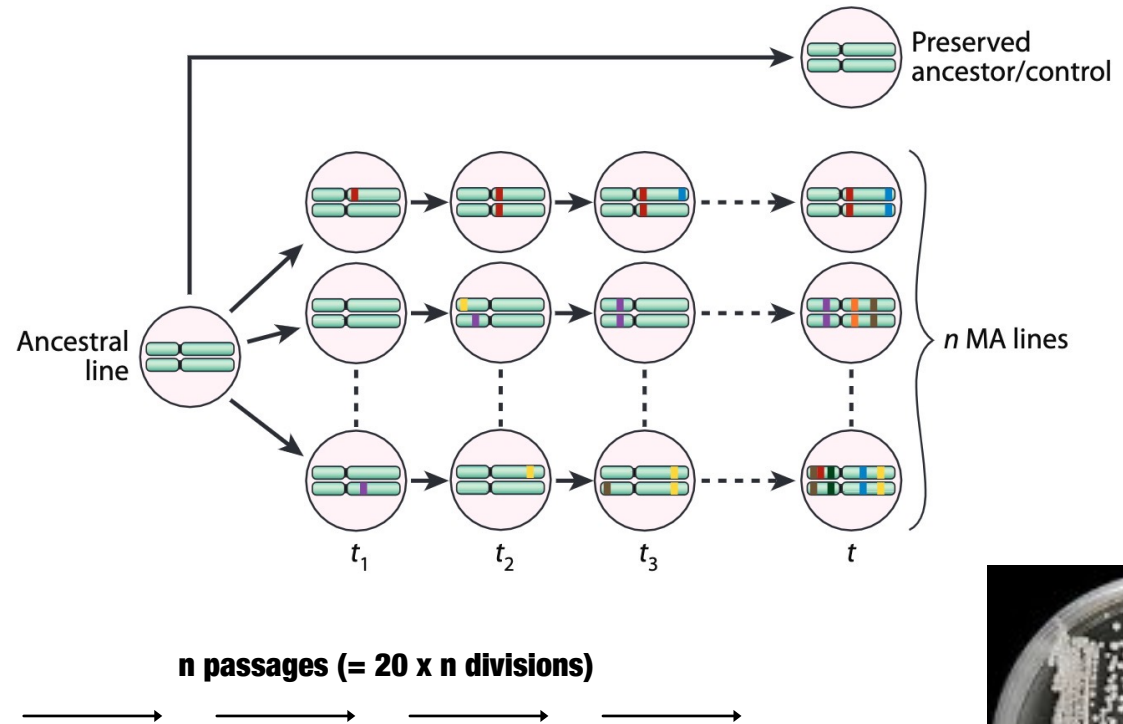
Upper Difference  Lower Difference

# Accumulation de mutations

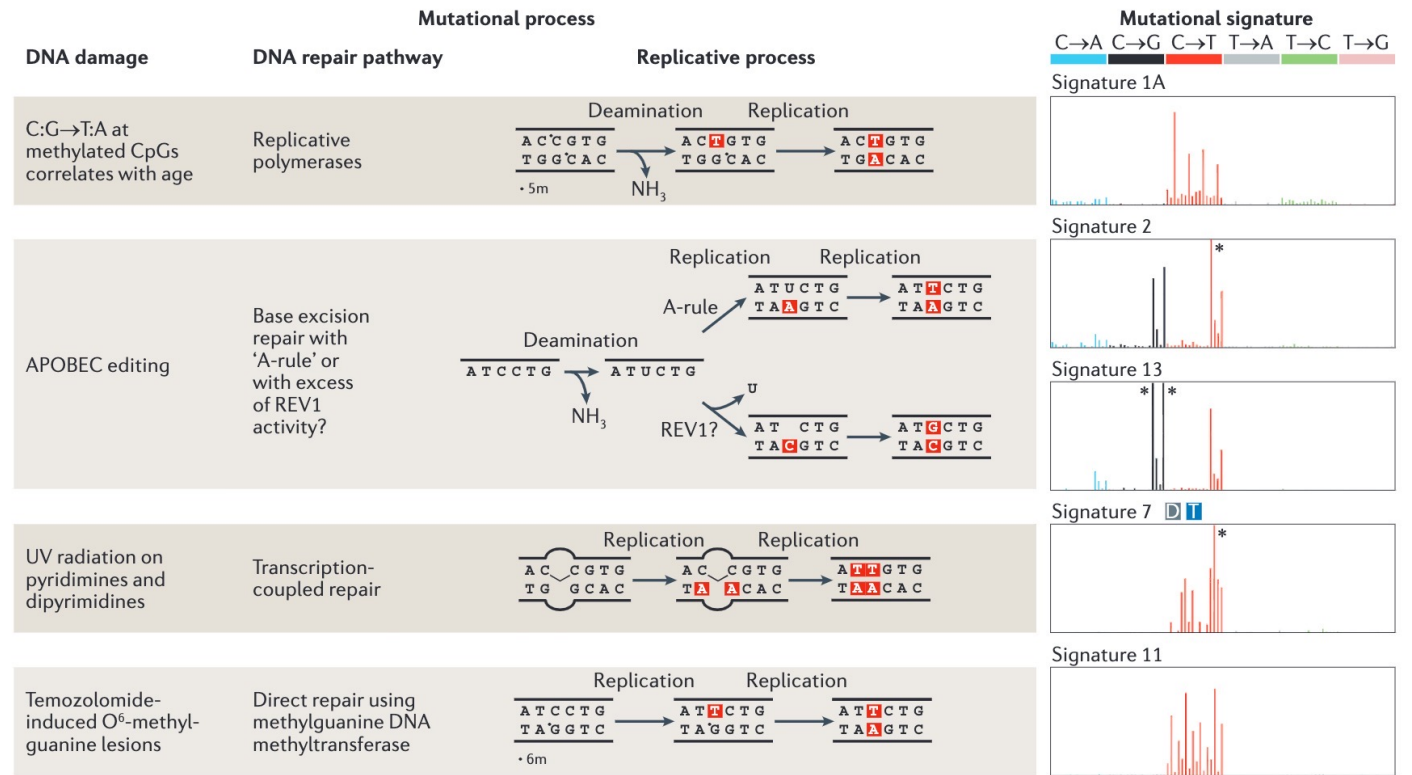
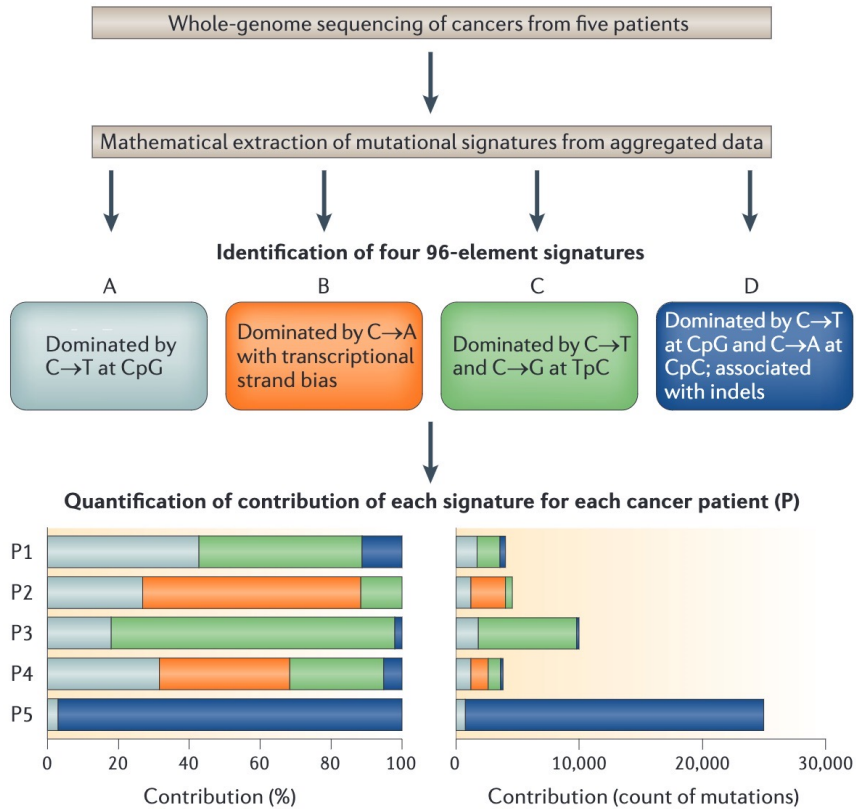


Barrick, J.E., and Lenski, R.E. (2013). *Nat Rev Genet* 14, 827–839.

Halligan, D.L., and Keightley, P.D. (2009). *Annu Rev Ecol Syst* 40, 151–172.



# Exemples de signatures mutationnelles



Les signatures mutationnelles permettent de révéler la conséquence de voies de réparation défectueuses et d'appliquer une thérapie appropriée



# La mutagenèse de quiescence

- Absence de réplication de l'ADN
- Mutagenèse en fonction du temps
- Offre la possibilité d'étudier la mutagenèse masquée par la réplication

