HAL open science

Mutagenèse - Sources et Détermination

Serge Gangloff

▶ To cite this version:

Serge Gangloff. Mutagenèse - Sources et Détermination. Master. Institut Pasteur (Paris), France. 2022. pasteur-04068882

HAL Id: pasteur-04068882

https://pasteur.hal.science/pasteur-04068882v1

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Institut Pasteur

institutCurie

Ensemble, prenons le cancer de vitesse.

Génétique et Epigénétique Moléculaires

2022-2023

Mutagenèse

Sources et Détermination

Serge Gangloff - Dynamique du Génome - Institut Pasteur

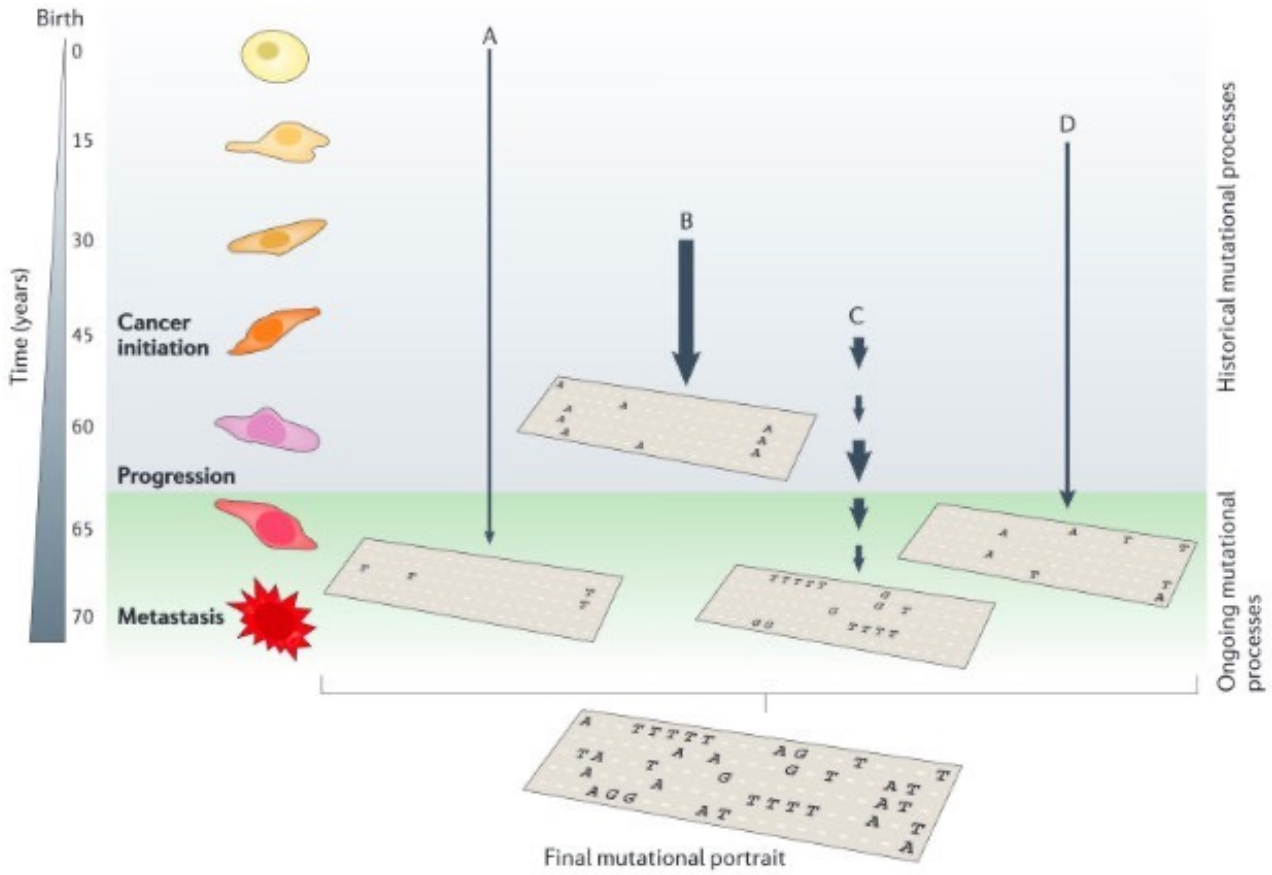
serge.gangloff@pasteur.fr

cnrs

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

Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Nat Rev Genet 2014;15:585–98.

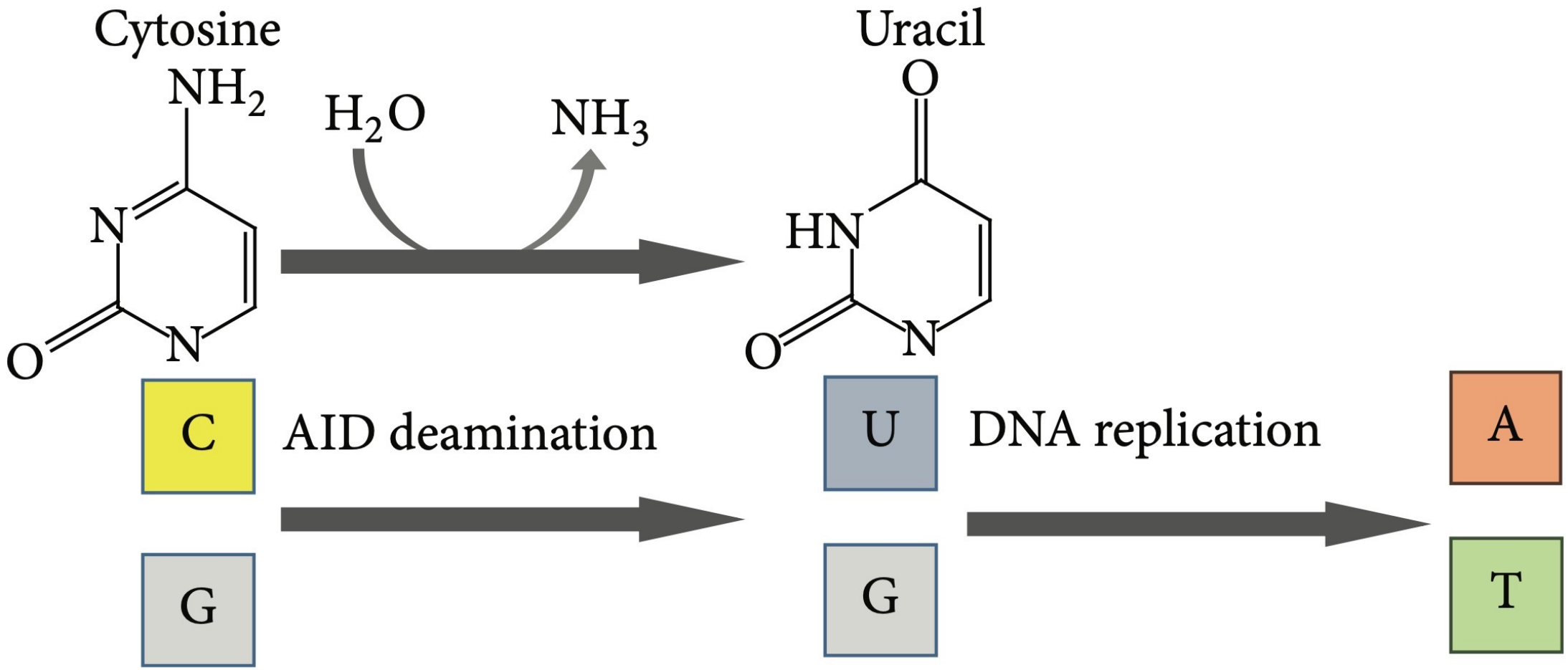
Les mutations

- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs réplicatives
  - 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)
- **Epigénétiques**
  - Modifications réversible des marques chromatiniennes

Les mutations

- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs réplicatives
  - 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)
- **Epigénétiques**
  - Modifications réversible des marques chromatiniennes

Activation-Induced Deaminase (AID)

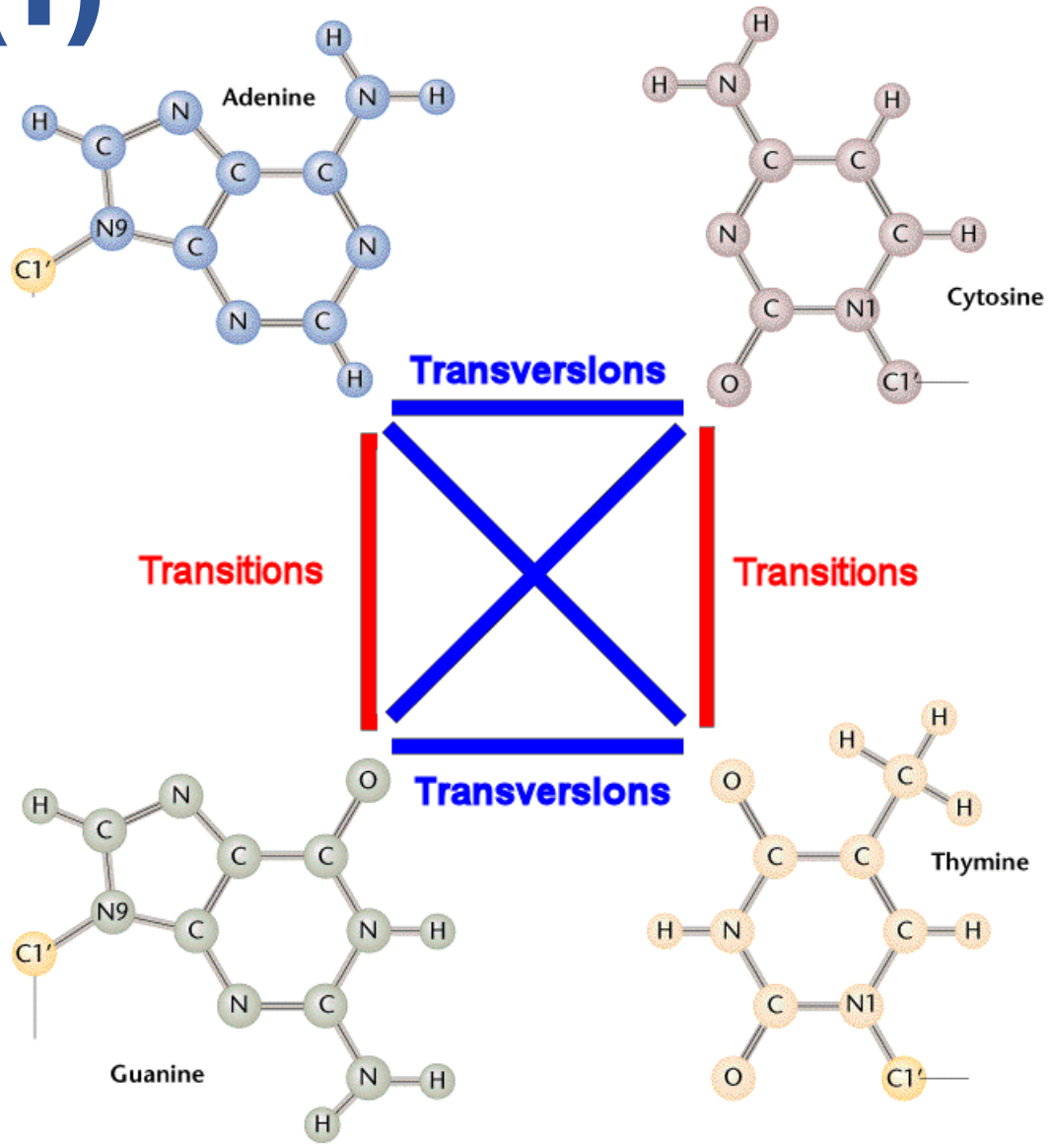


Les mutations

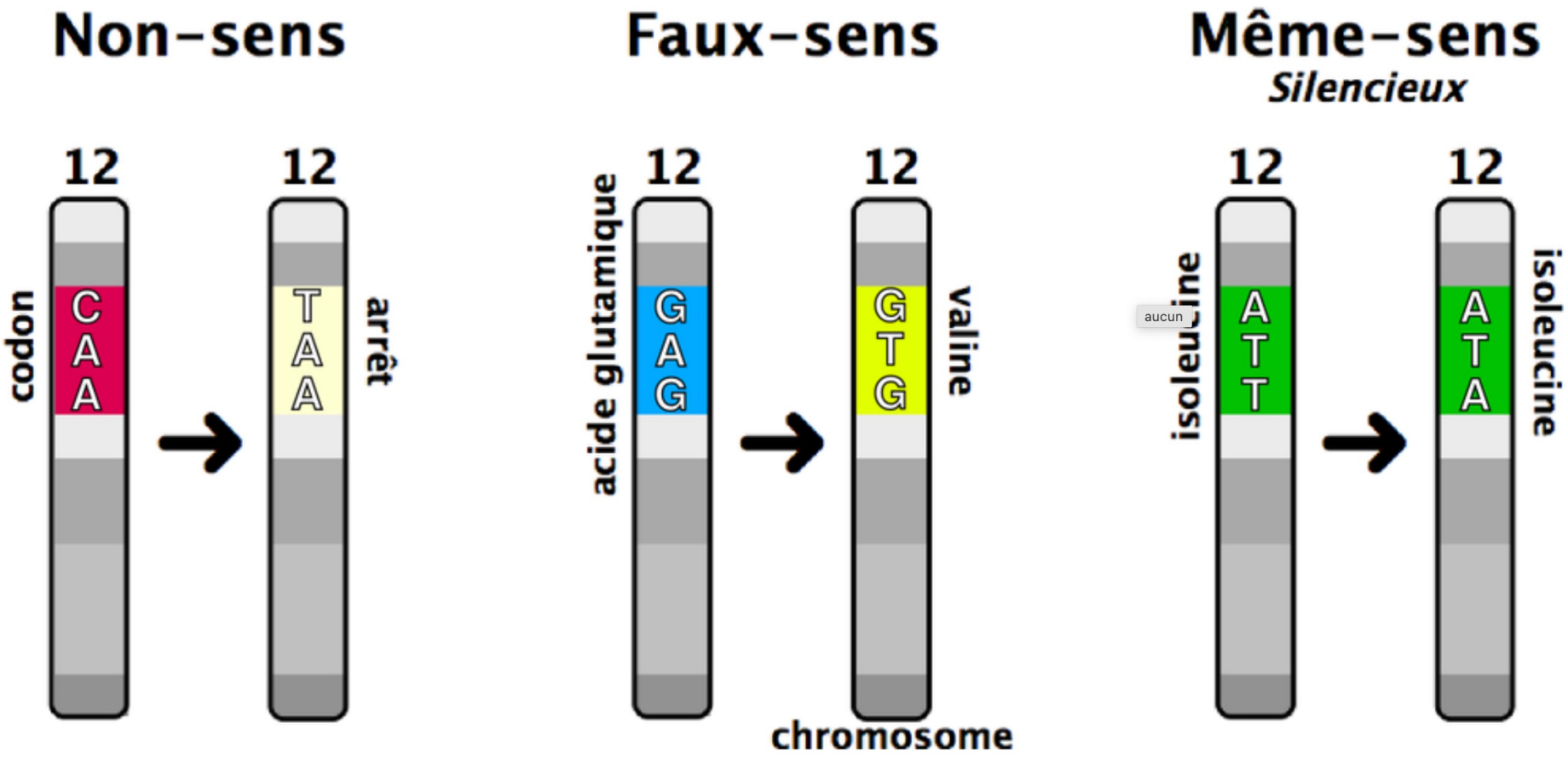
- **Spontanées qui résultent d'un processus naturel**
  - Erreurs réplicatives
  - Altération des bases
  - Les points chauds (hotspot)
- **Induites qui résultent d'une interaction entre l'ADN et un agent mutagène**
  - Radiations UV ou ionisantes
  - Agents chimiques
  - Cytidine deamination (APOBEC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

Les types de mutation (1)

- **Les substitutions de nucléotides**

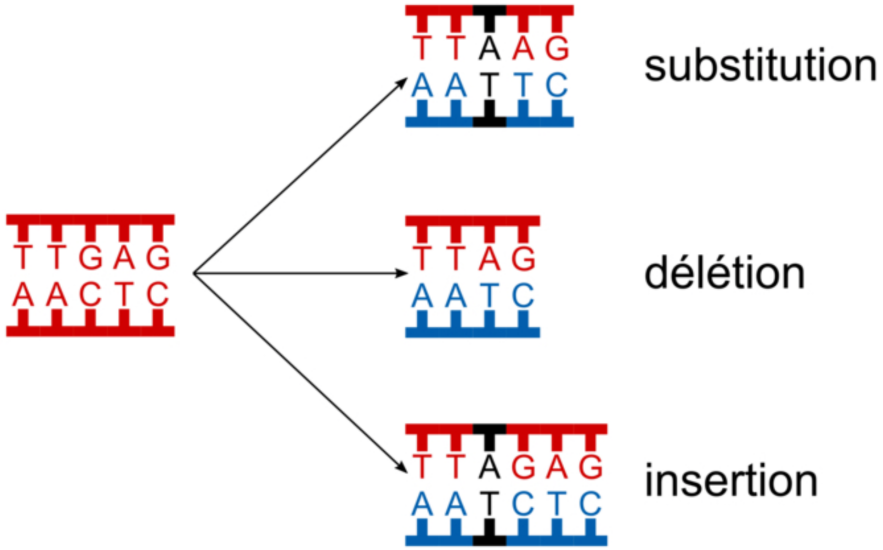


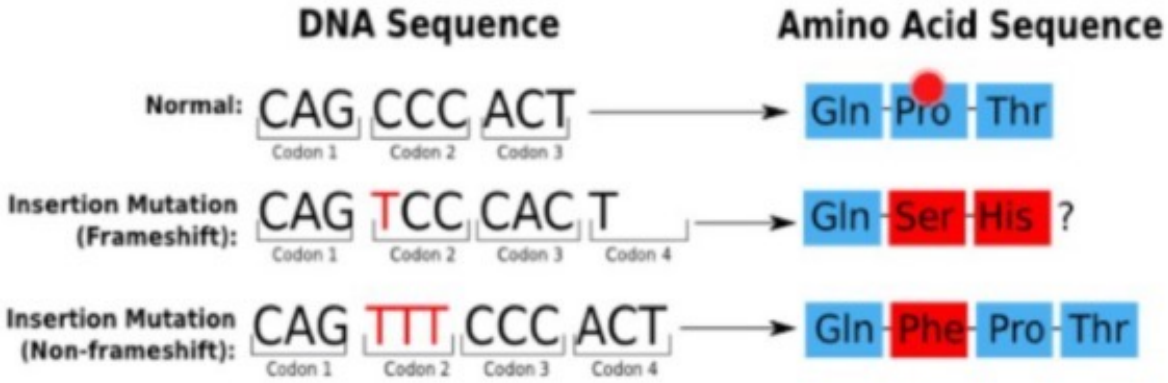
Les types de mutation (2)



Les types de mutation (3)

- **Les modifications du cadre de lecture (Frameshift)**



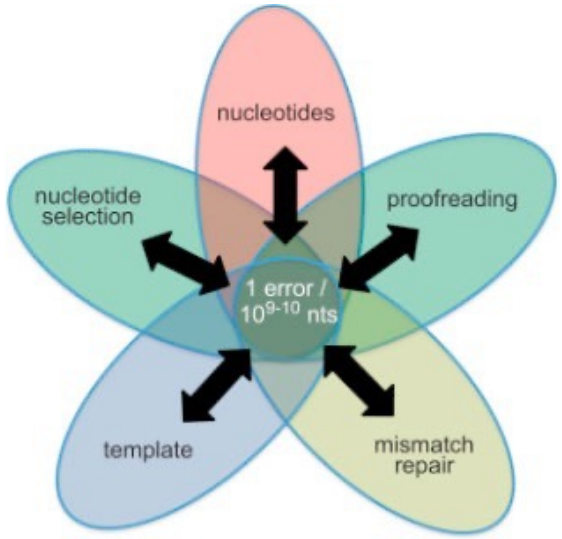


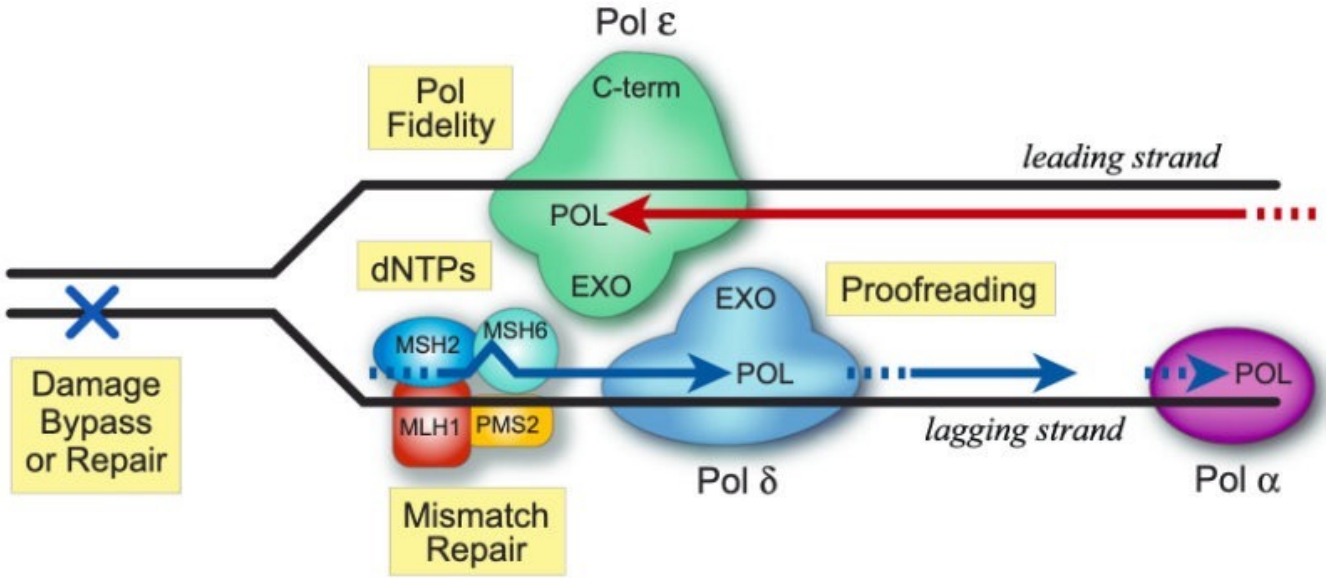
L’origine des mutations spontanées

- 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



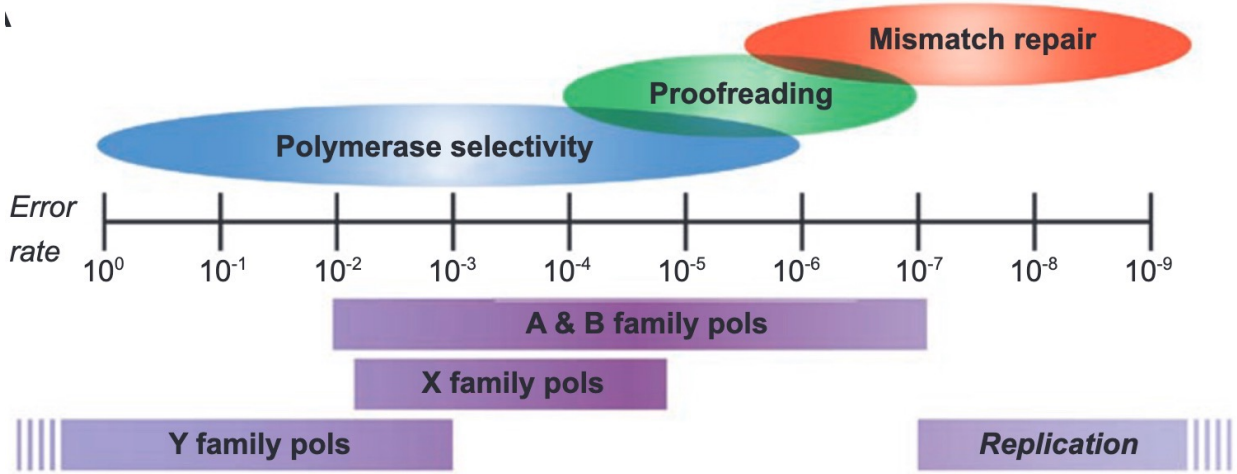


Ganai, R.A., and Johansson, E. (2016). Mol Cell 62, 745–755.

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

L'origine des mutations spontanées

Taux d'erreur des ADN polymérases A et B



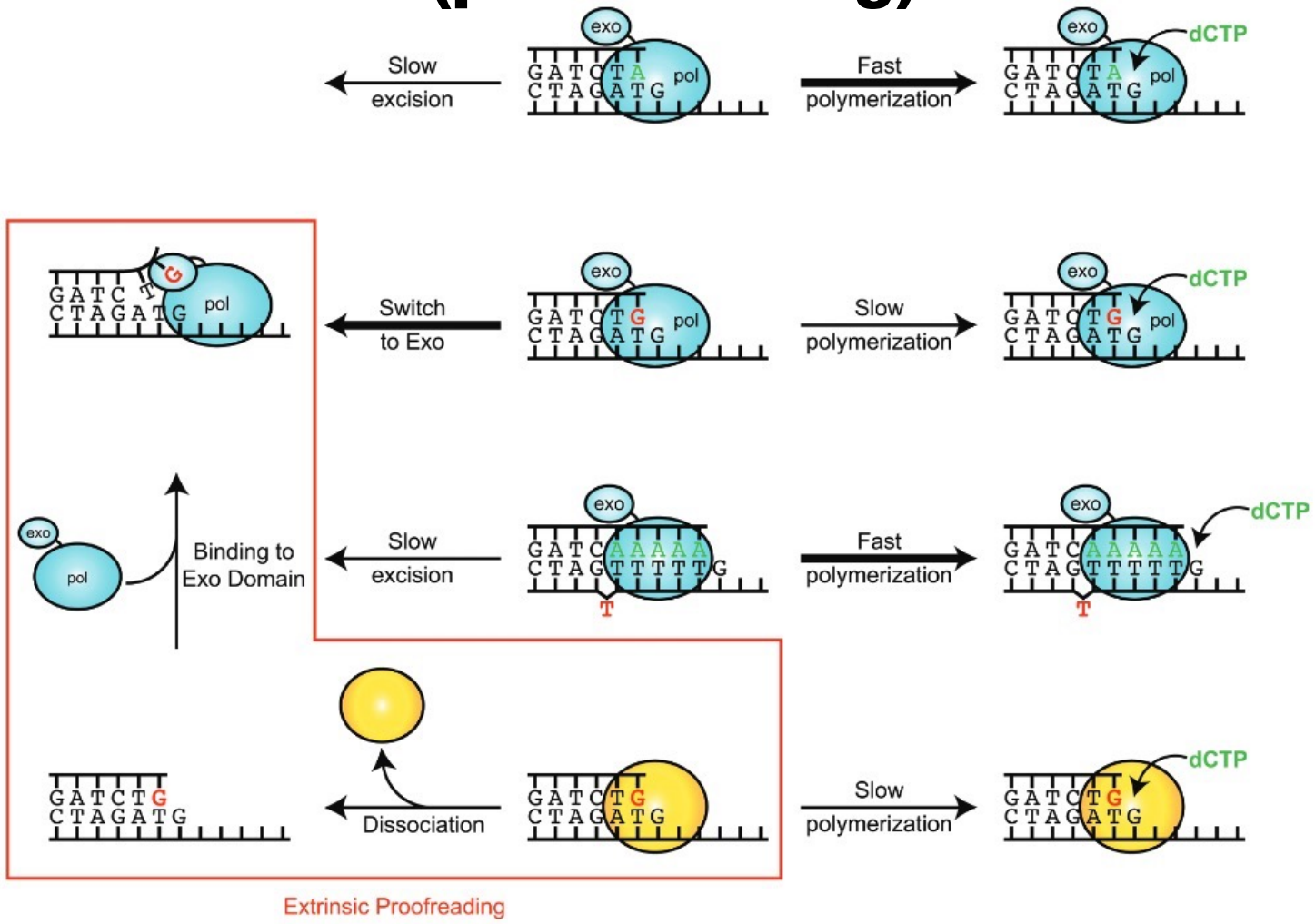
Kunkel, T.A. (2009). Cold Spring Harb Sym 74, 91–101.

Origin[1]	Polymerase[2]	Family	Error rate ($\times 10^{-5}$) Single base substitution	Single base indel
Replicative polymerases				
Exonuclease deficient				
Hs	γ	A	4.5	1.7
Sc	α	B	9.6	3.1
Sc	δ	B	1.3	5.7
Sc	ε	B	24	5.6
Exonuclease proficient				
Hs	γ	A	1.0	≤0.12
Sc	δ	B	≤1.3	1.3
Sc	ε	B	≤0.2	≤0.05

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

L'origine des mutations spontanées

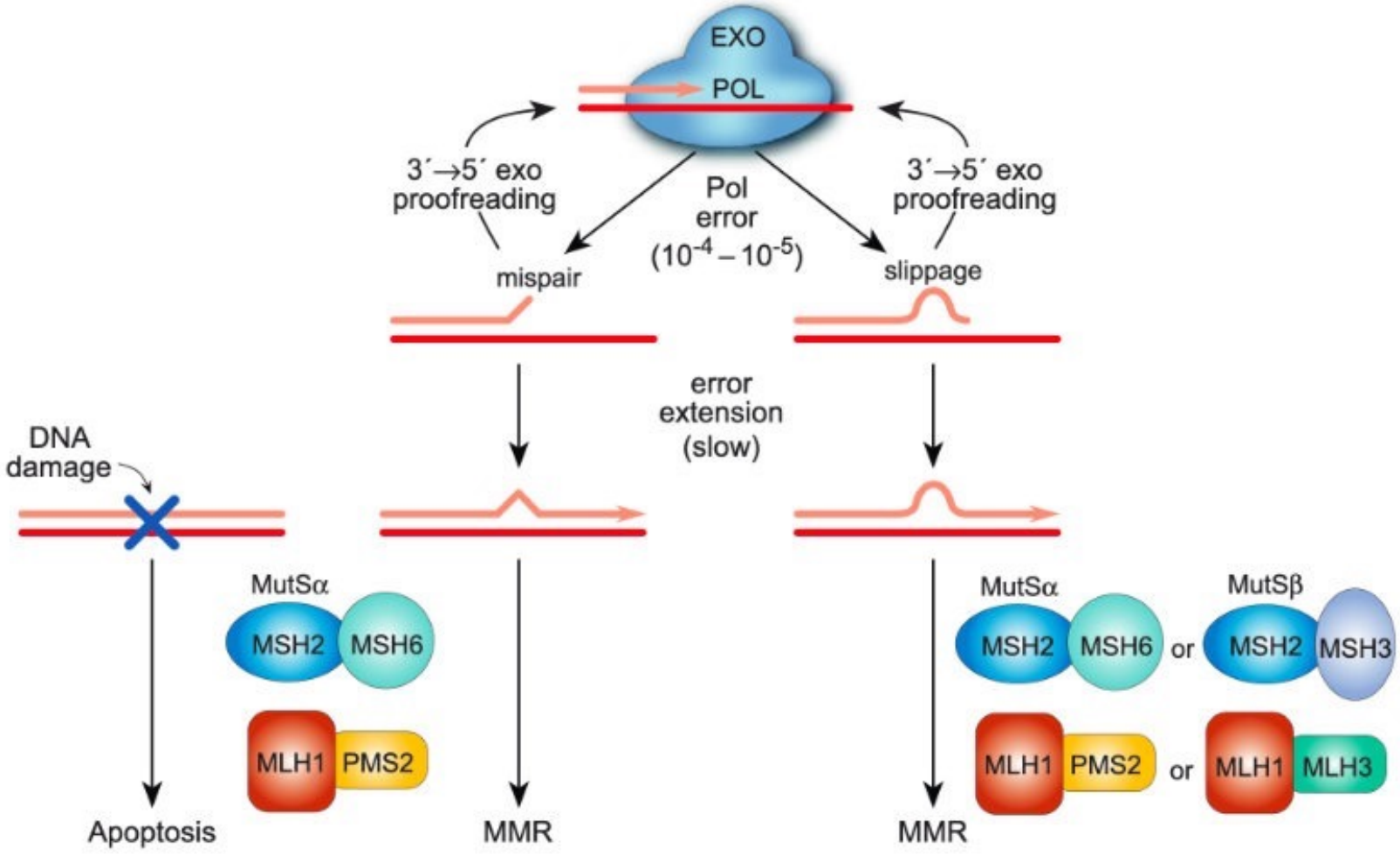
La relecture (proofreading)



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

L'origine des mutations spontanées

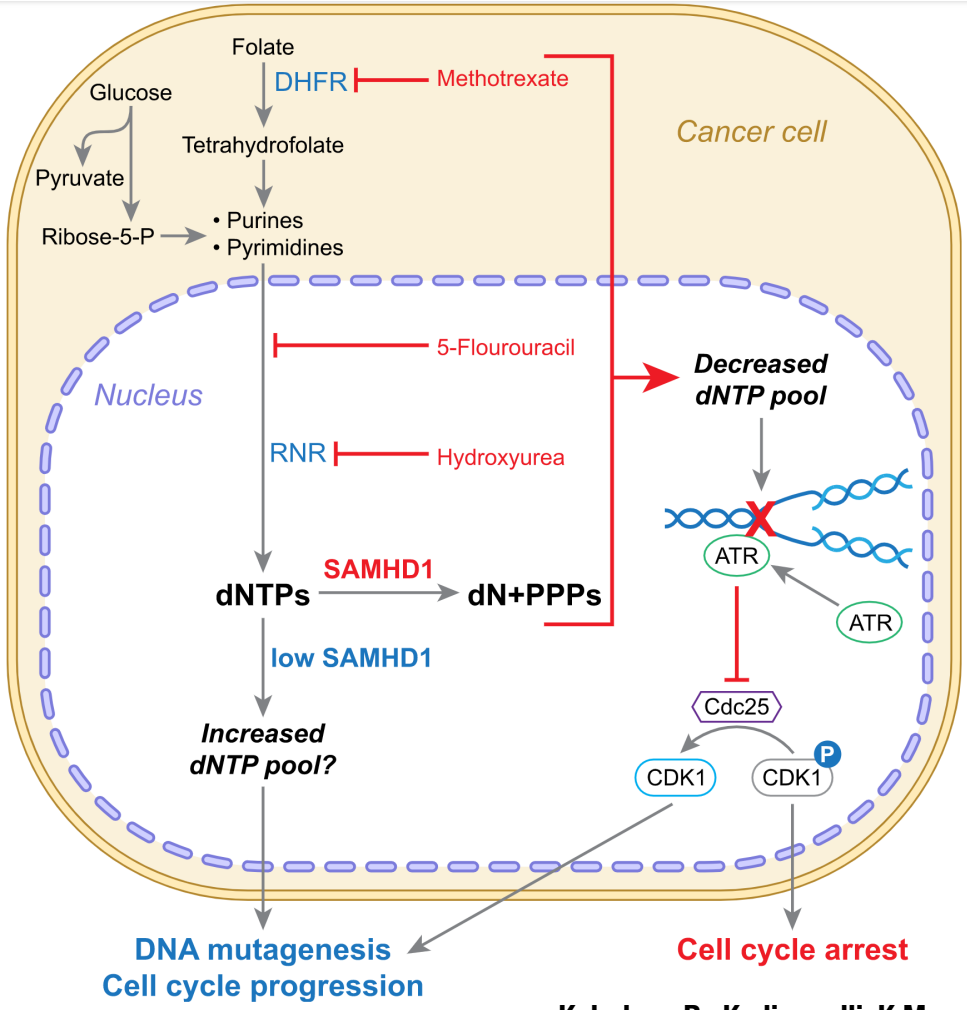
La réparation des mésappariements (MMR)



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

L'origine des mutations spontanées

Déséquilibre du pool de dNTPs



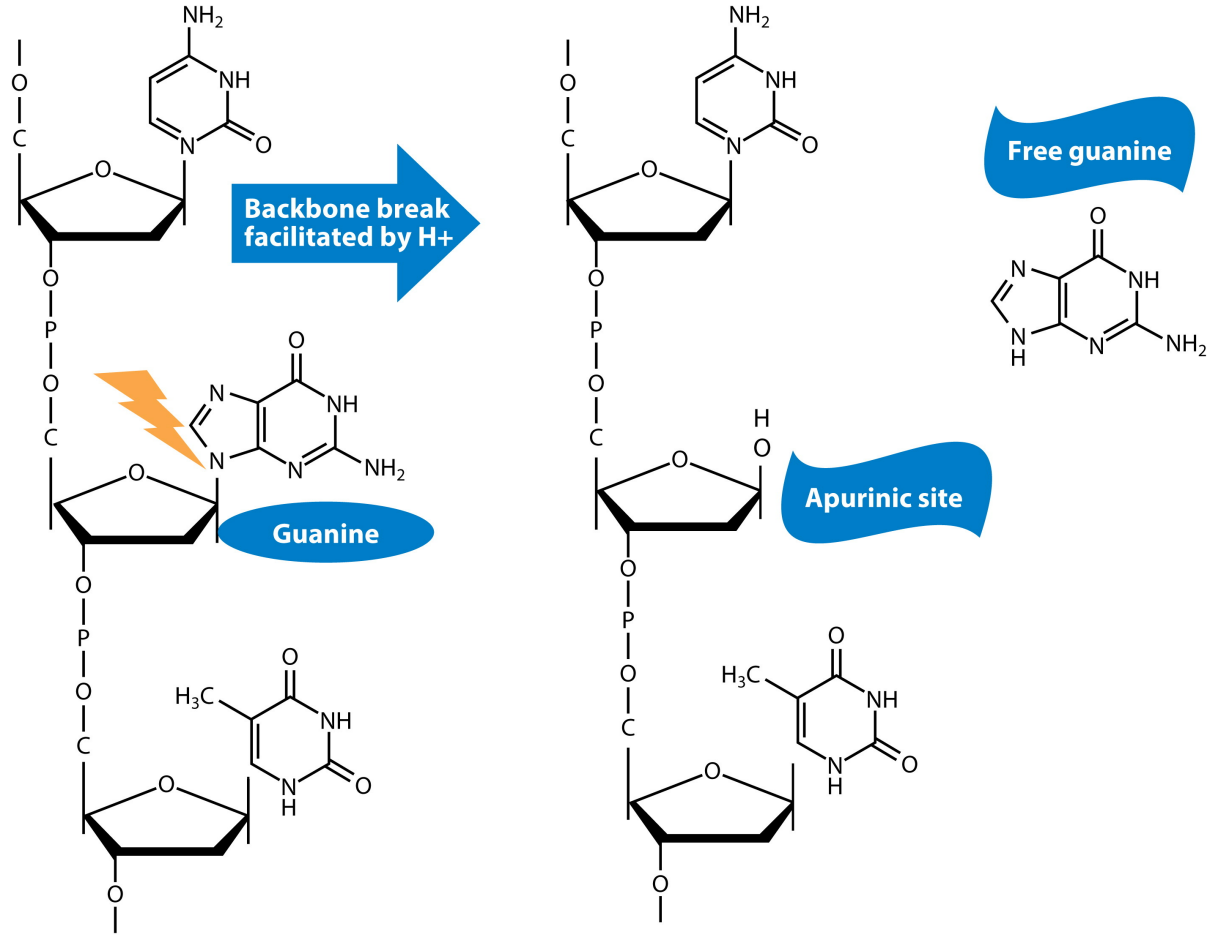
Kohnken, R., Kodigepalli, K.M., and Wu, L. (2015). Mol Cancer 14, 176.

Les altérations affectant les bases

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

Les altérations affectant les bases

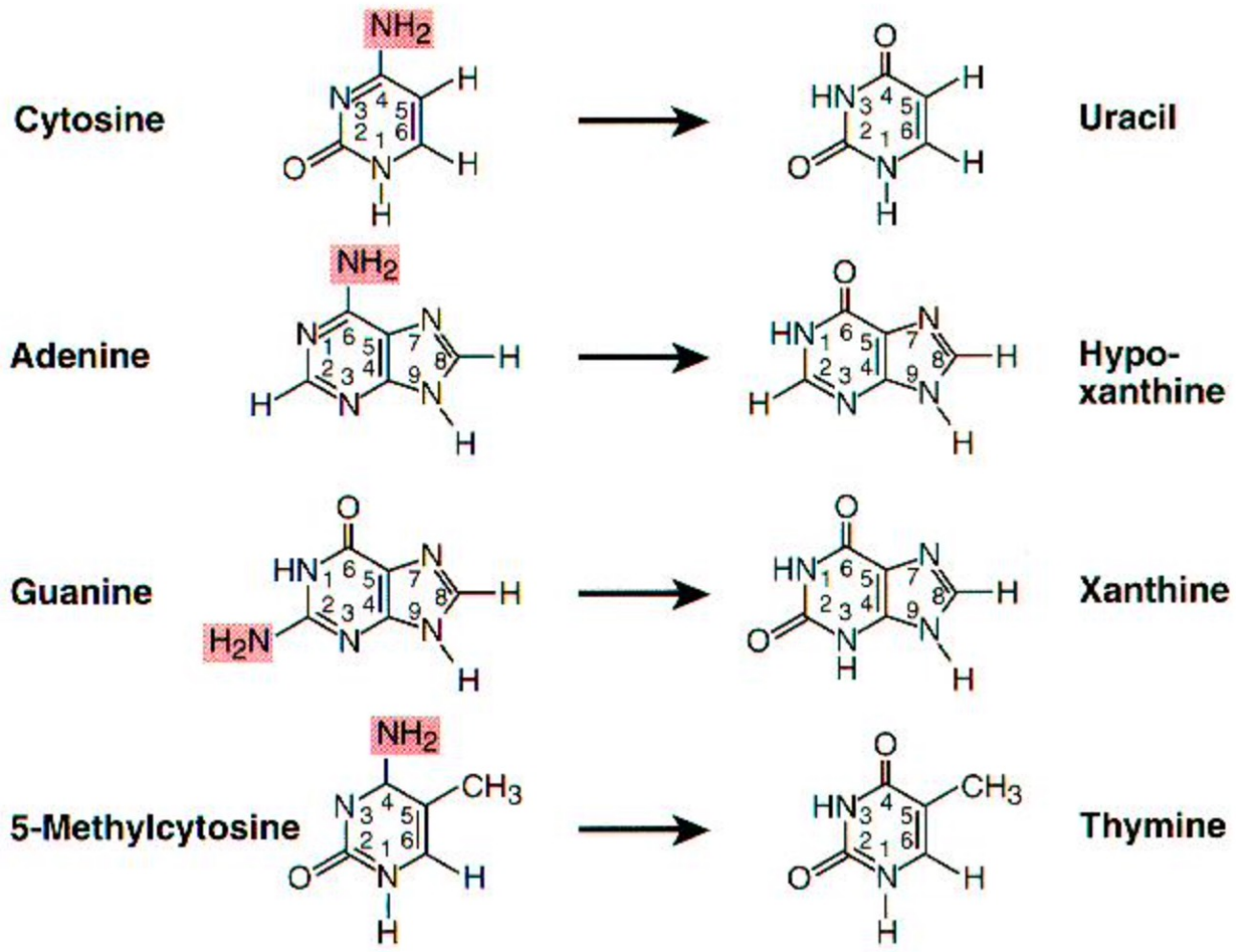
La dépurination (hydrolyse)



Fresco JR, Amosova O. 2017.
Annu. Rev. Biochem. 86:461–84

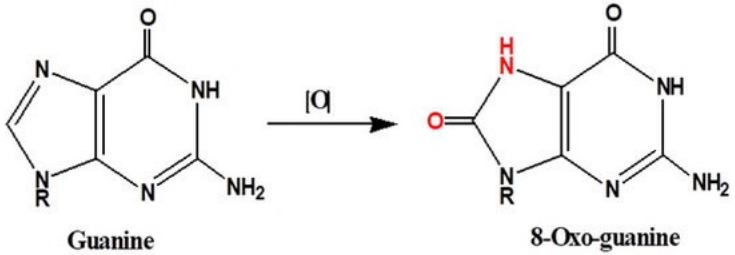
Les altérations affectant les bases

La déamination spontanée (hydrolyse)

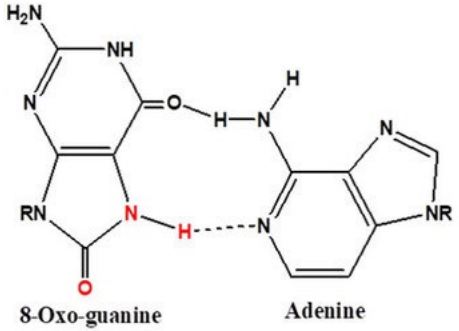


Les altérations affectant les bases

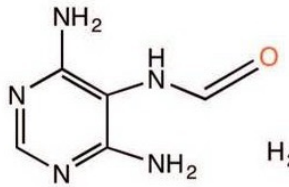
L'oxydation



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

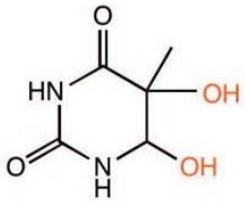


(b) Hoogsteen hydrogen bonding between 8-oxo-guanine and adenine nucleic acid bases.



Formamidopyrimidine

7,8 dihydro-8-oxoguanine

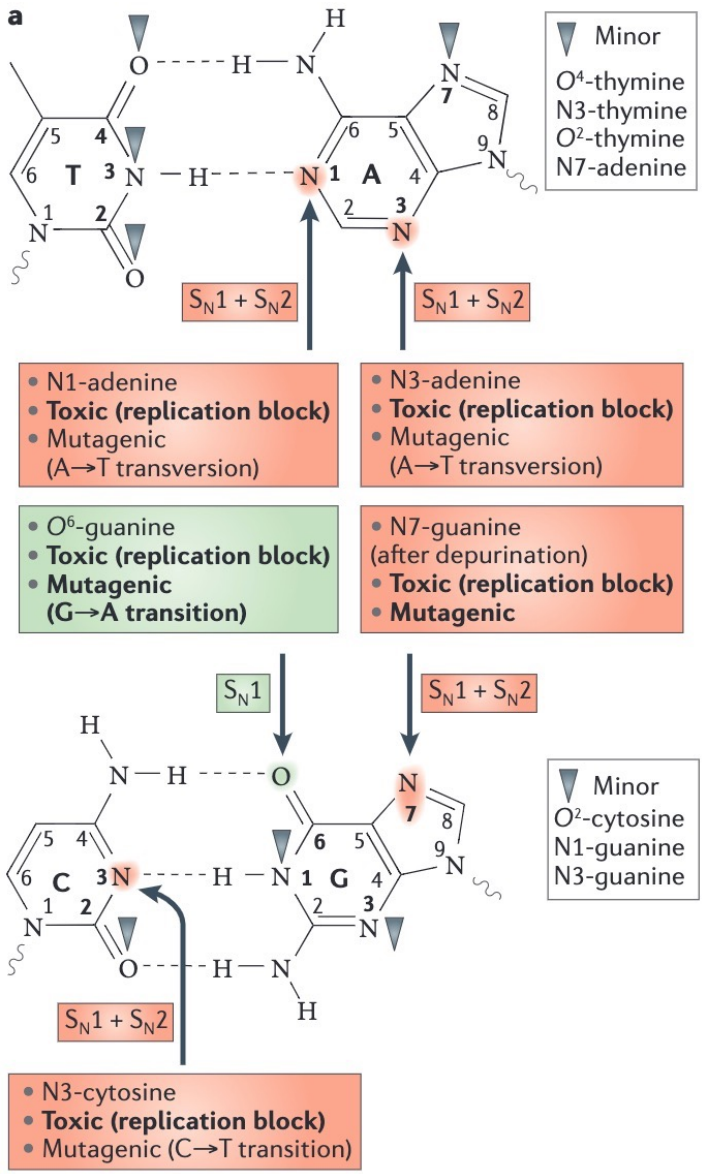


Thymine glycol

Les altérations affectant les bases

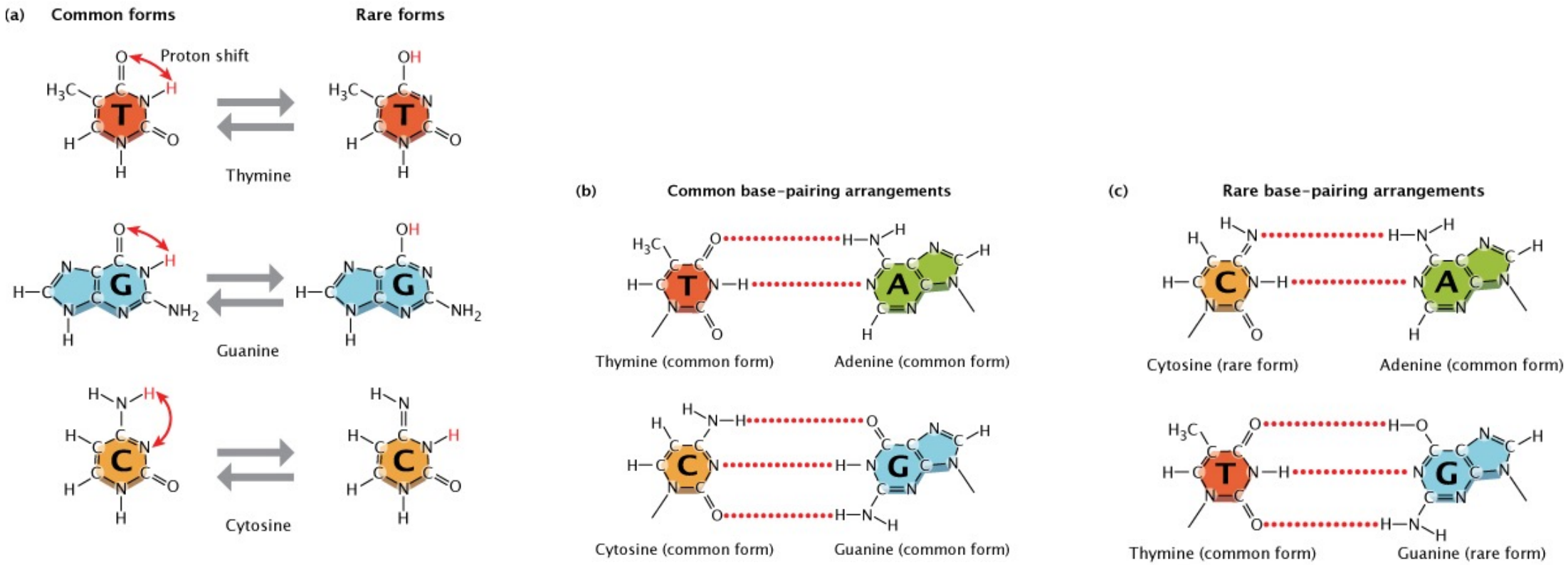
L'alkylation

- 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_6 de la guanine est un site privilégié de méthylation (O_6meG) 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

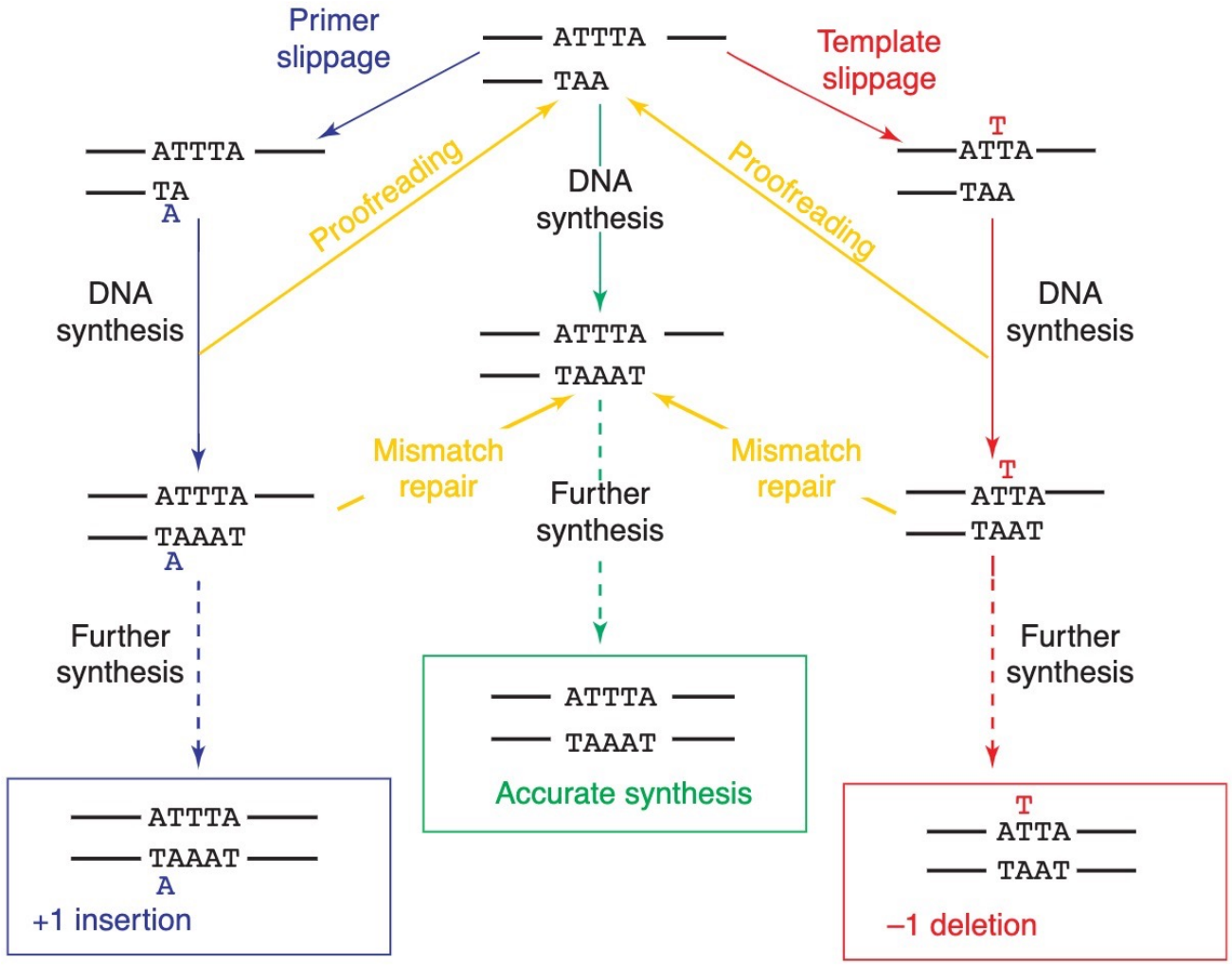


Pray, L. (2008) . Nature Education 1(1):214

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.



Garcia-Diaz, M., and Kunkel, T.A. (2006). Trends Biochem Sci 31, 206–214.

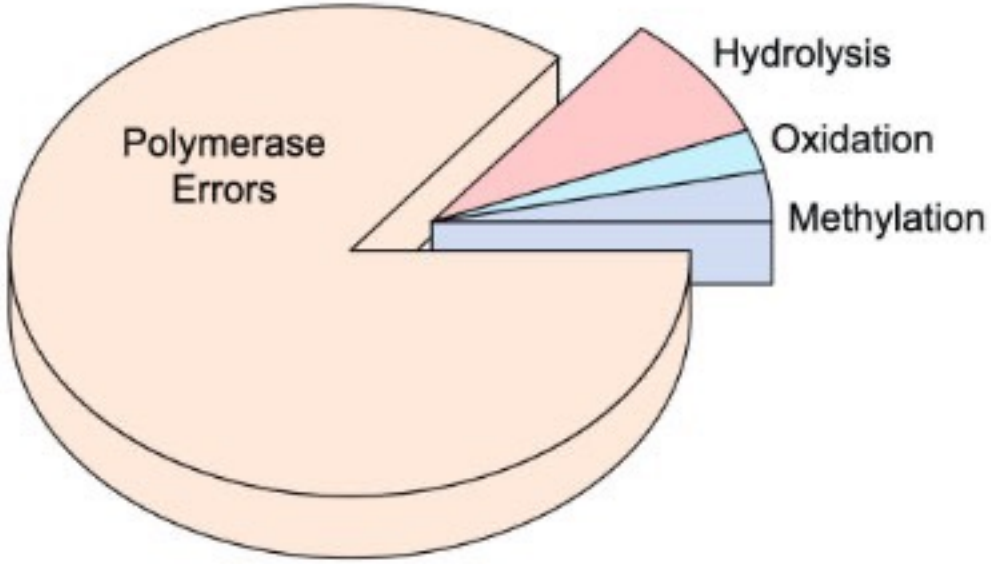
Réparation des bases endommagées

Nombre de lésions quotidiennes dans une cellule de mammifère

A

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

B



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

Réparation des bases endommagées

Les ADN glycosylases de mammifères

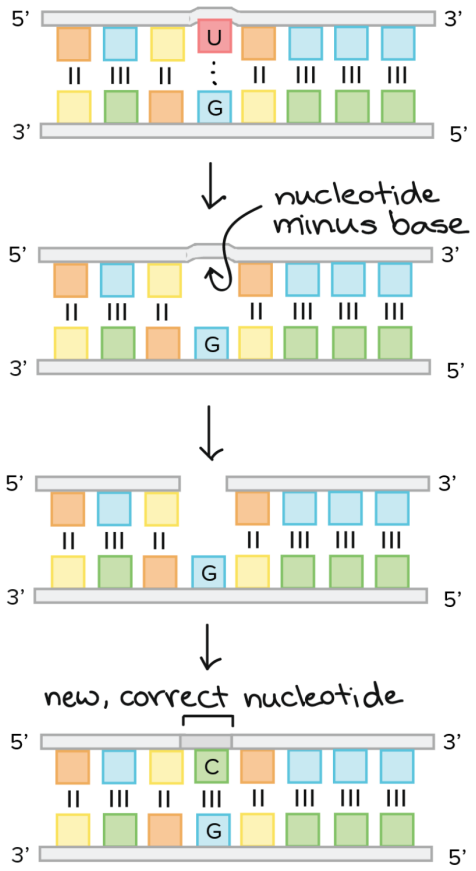
Type of base lesion		Name	Physiological substrates	Mono (M)/ bi(B) functional	Mouse knockout (ko)/ knockdown (kd) phenotype
Uracil in ssDNA dsDNA	UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU, ss and dsDNA	M	ko: viable, B-cell lymphomas, disturbed antibody diversification
	SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5–hmU, 5-FU, ss and dsDNA	M	kd: moderate increase in mutation frequency (C→T)
Pyrimidine derivates 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

Jacobs, A.L., and Schär, P. (2012). Chromosoma 121, 1–20.

Réparation des bases endommagées

Les glycosylases et le BER

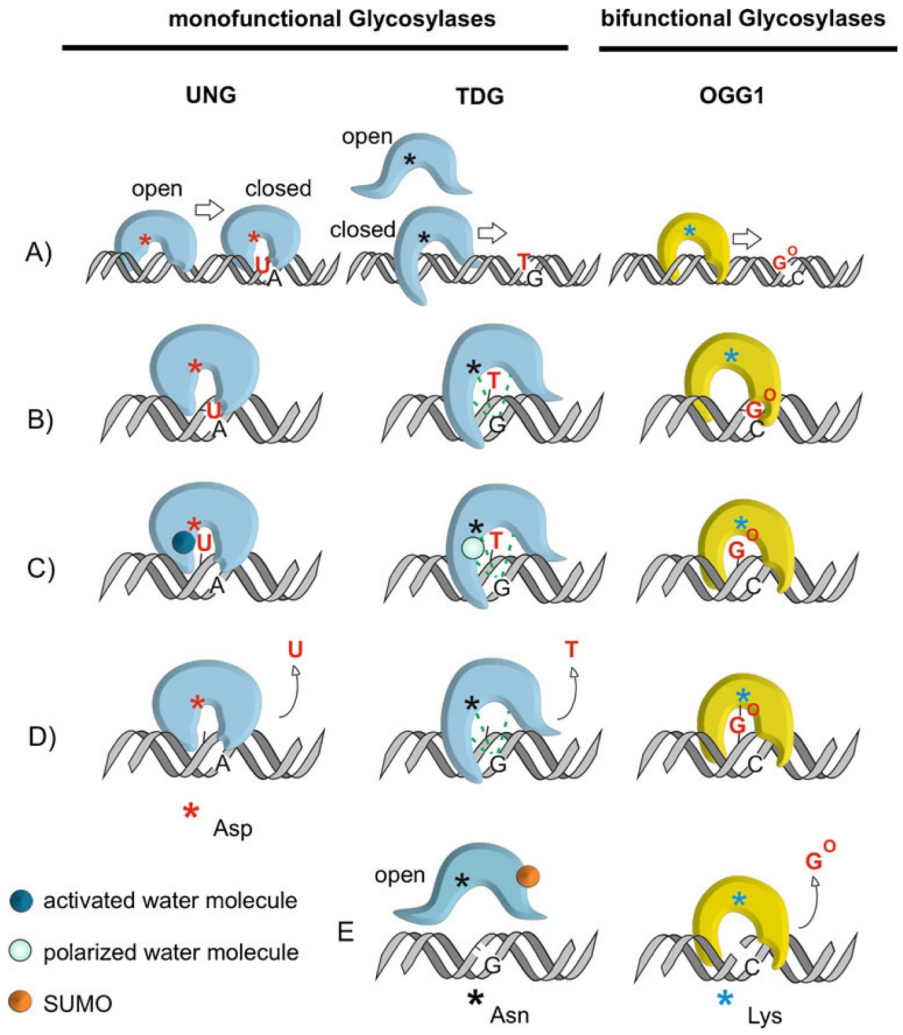


Deamination converts a cytosine base into a uracil.

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.



Jacobs, A.L., and Schär, P. (2012). Chromosoma 121, 1–20.

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

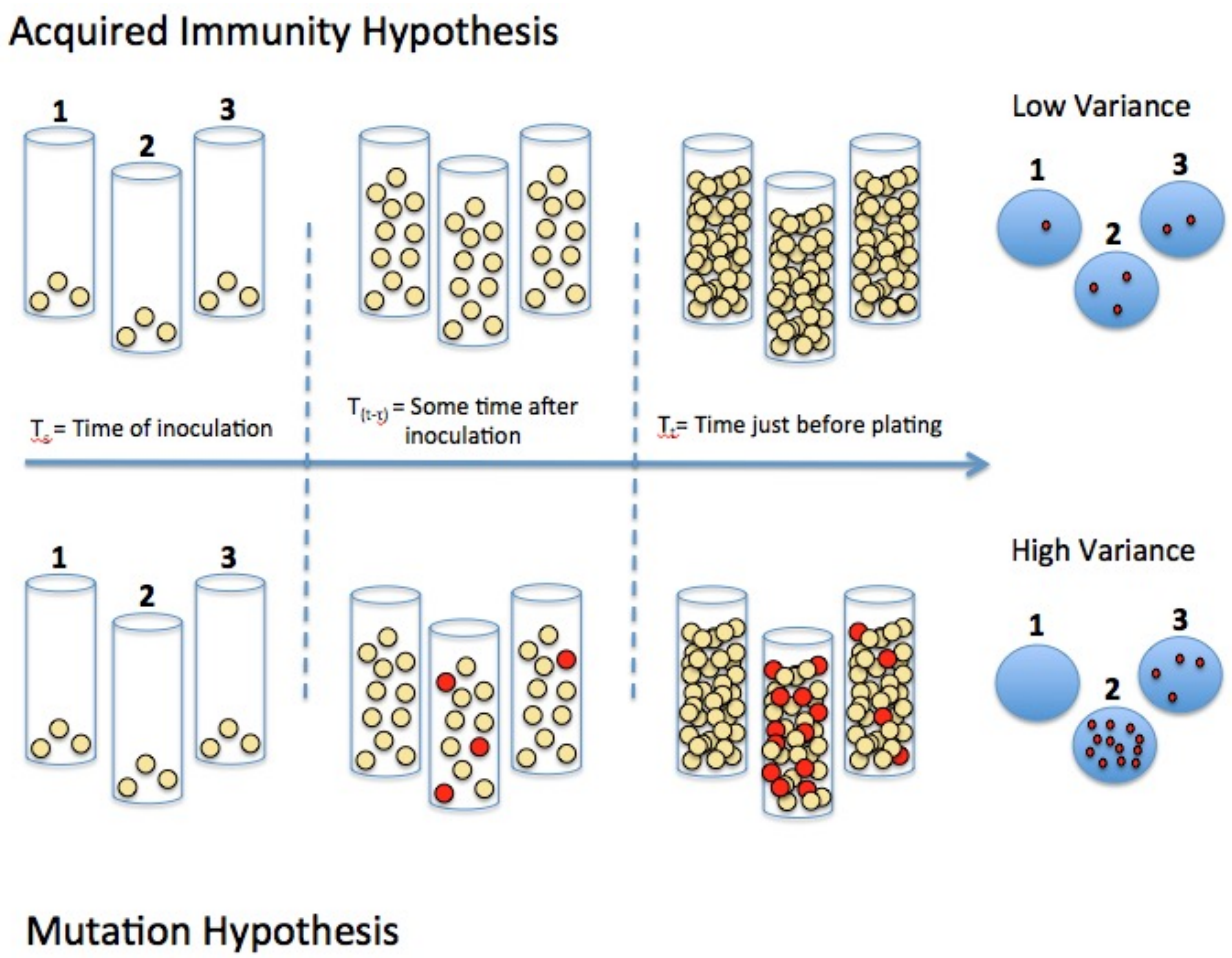
- L’accumulation de mutations

Les hypothèses de Luria et Delbrück (1943)

- **Hypothèse de mutation préexistantes**

- **Hypothèse de mutation acquise.**

Le test de fluctuation de Luria et Delbrück (1943)



Luria, S., Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. Genetics 28(6), 491-511.

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.

Lea, D., Coulson, C. (1949). Journal of Genetics 49(3), 264.

Terminologie

Terme	Définition
m	Nombre de mutations par culture
r	Nombre de mutants observés dans une culture
$\mathbf{r_0}$	Nombre médian de mutants dans les cultures parallèles
$\mathbf{N_0}$	Nombre initial de cellules dans une culture = l'inoculum
$\mathbf{N_t}$	Nombre final de cellules dans une culture
N	Nombre de cellules
μ	Taux de mutation ; probabilité de mutation par cellule par division
f	Fraction de mutant ou fréquence = r/N
V	Volume de la culture
C	Nombre de cultures dans l'expérience

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

Accumulation de Mutants

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

Foster, P.L. (2006). Methods Enzymol 409, 195–213.

Les résultats d'un test

- On compte **r**, le nombre de mutants pour chaque culture et on détermine $\mathbf{r_0}$ 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 **μ** 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 $4 \leq \mathbf{m} \leq 15$, le graphe de la probabilité qu'une culture contienne un nombre de mutants $\leq \mathbf{r_0}$ en fonction de $\mathbf{r_0}/\mathbf{m} - \ln(\mathbf{m})$ 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 : $\mathbf{r_0}/\mathbf{m} - \ln(\mathbf{m}) = 1.24$ à la médiane et -0.2 et 4.1 aux quartiles.
- Ceci permet d'estimer **m** par interpolation à partir des valeurs expérimentales de $\mathbf{r_0}$ à partir de la **table 3** de Lea & Coulson ($1.4 \leq \mathbf{r_0} \leq 4400$).
- Fonctionne bien pour des valeurs de $1.5 \leq \mathbf{m} \leq 15$ ou $2.5 \leq \mathbf{r} \leq 6$

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 :

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

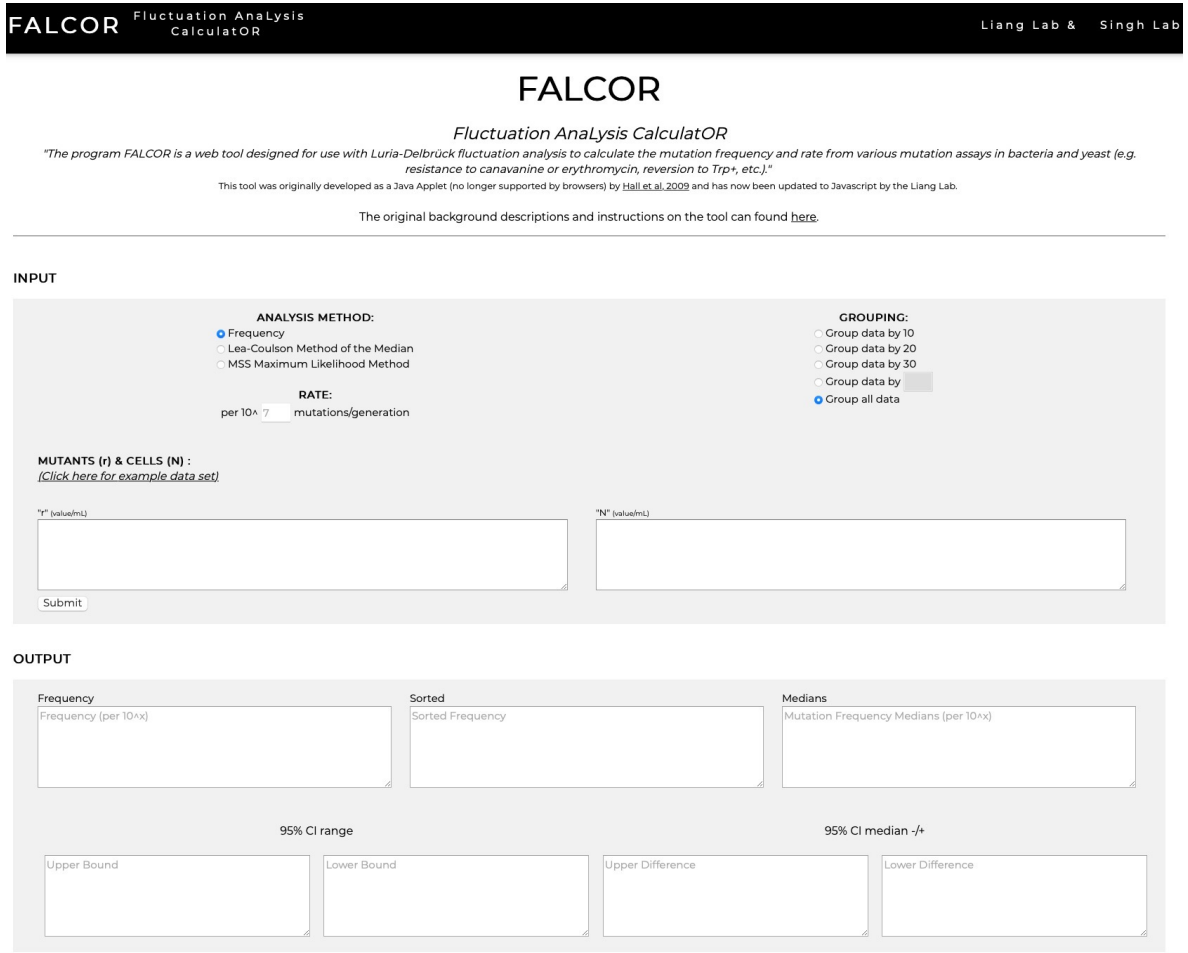
MSS est la meilleure méthode disponible pour estimer m. Il utilise tous les résultats d'une expérience de fluctuation et est valable sur toute la plage de valeurs de m.

Ma, W.T., Sandri, G. vH., and Sarkar, S. (1992). J Appl Probab 29, 255–267.

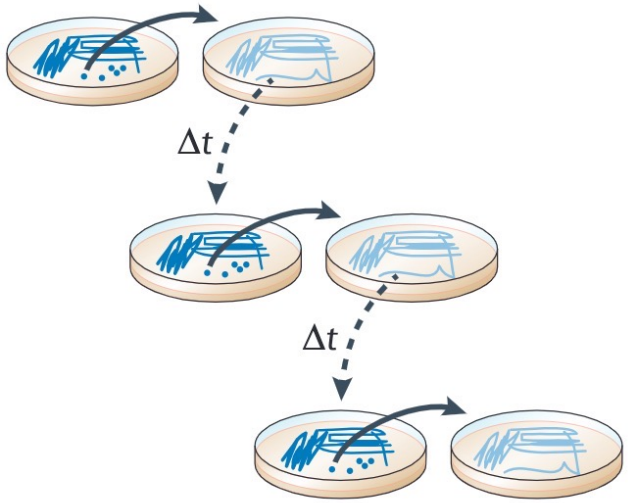
La bonne nouvelle…

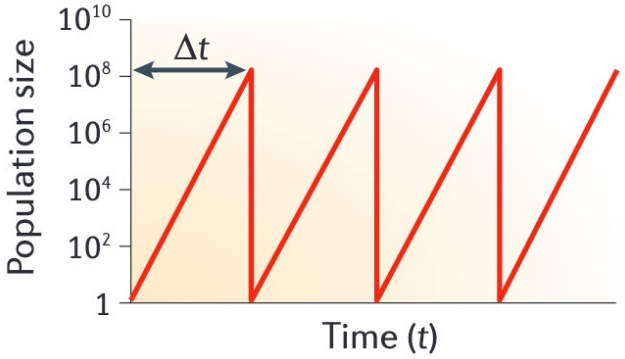
- http://genomics.brocku.ca/FALCOR/

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



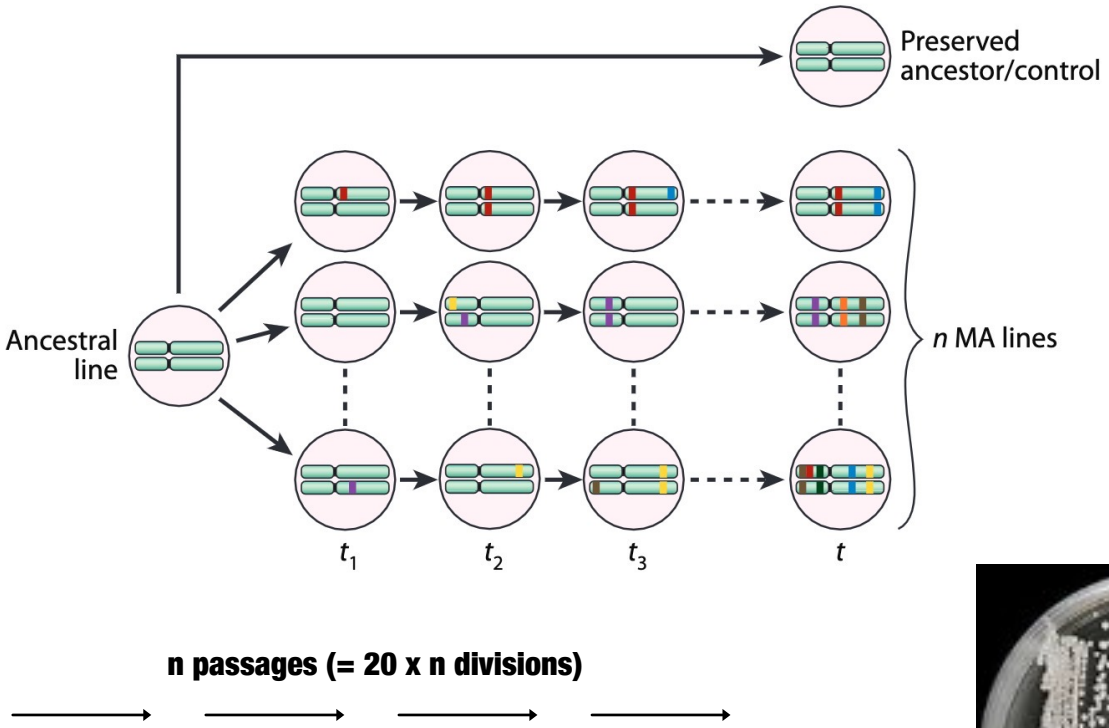
Accumulation de mutations

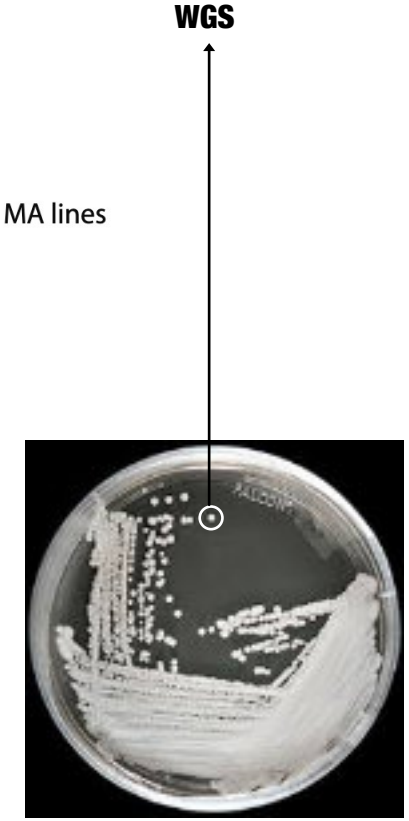




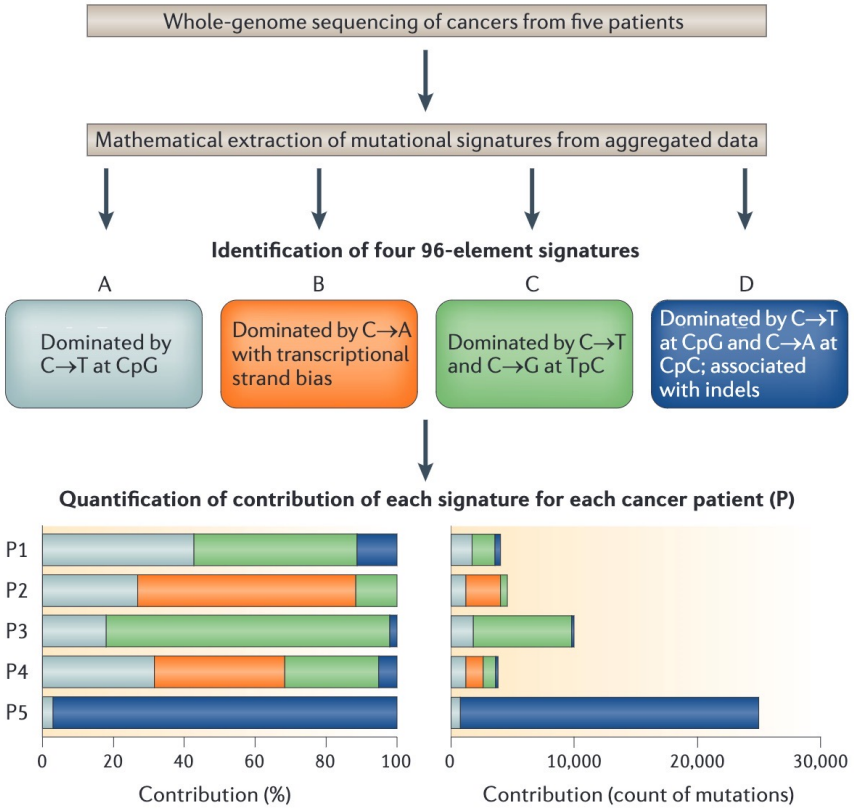
Barrick, J.E., and Lenski, R.E. (2013). Nat Rev Genet 14, 827–839.

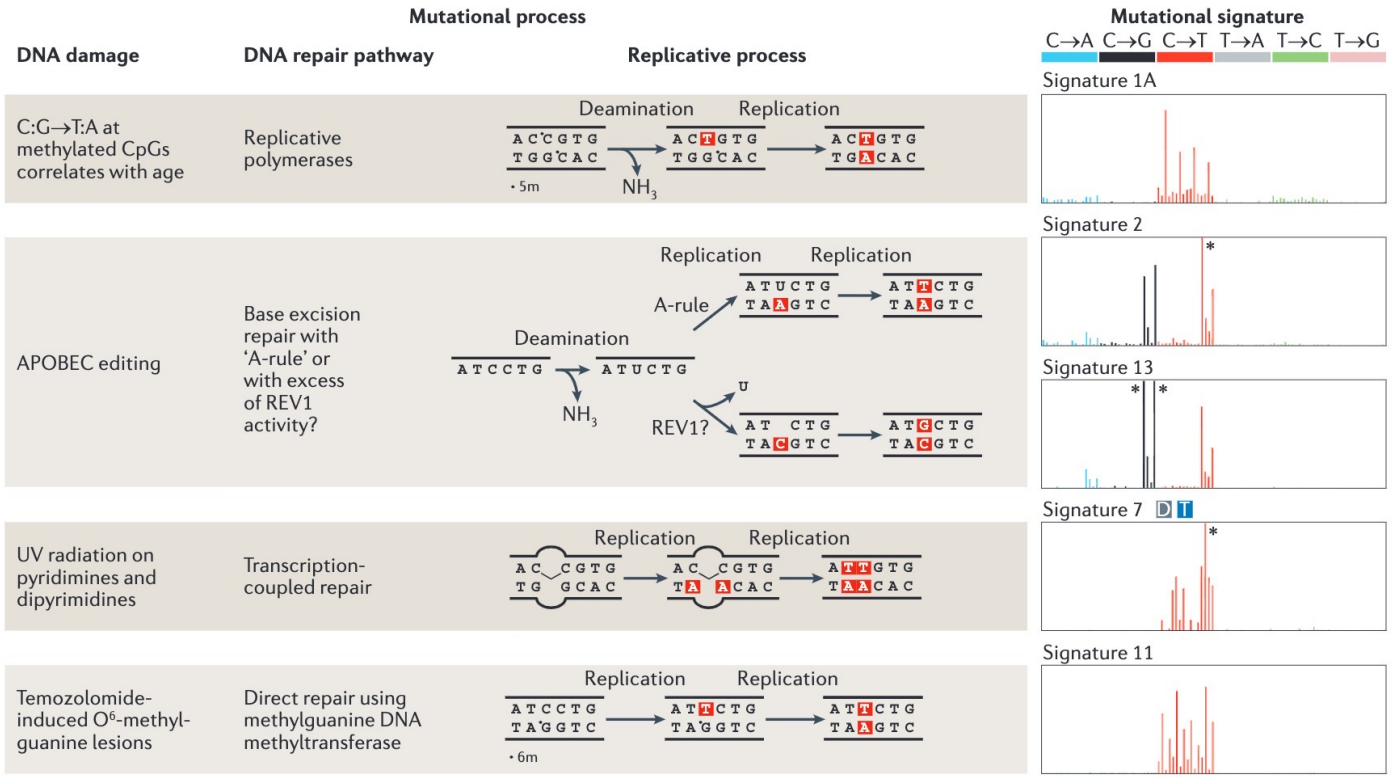
Halligan, D.L., and Keightley, P.D. (2009). Annu Rev Ecol Syst 40, 151–172.





Exemples de signatures mutationnelles



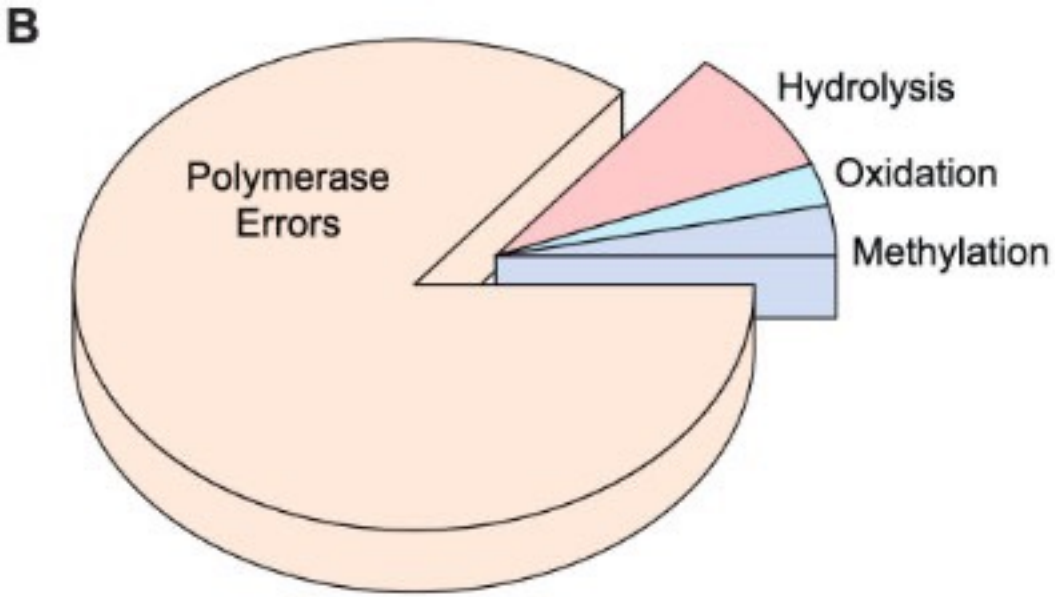


Les signatures mutationnelles permettent de révéler la conséquence de voies de réparation défectueuses et d'appliquer une thérapie appropriée

Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Nat Rev Genet 2014;15:585–98.

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



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

A vous de jouer…

Bon TP !