

# Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques :

Applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur  
réparation sur support

Mélanie Flaender

Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques – SCIB/INAC CEA

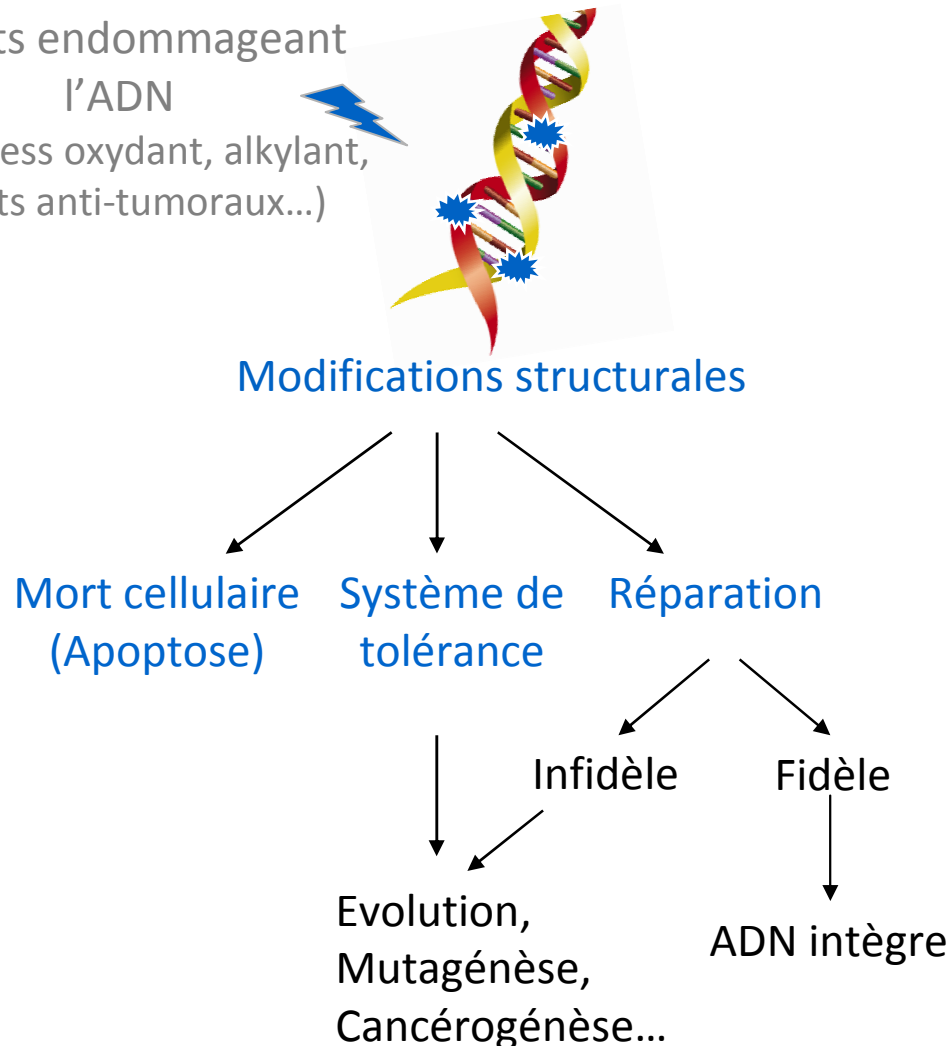
Thèse co-dirigée par Alain Favier & Didier Gasparutto



# Introduction

## L'ADN : support de l'information génétique et les lésions de l'ADN

Agents endommageant  
l'ADN  
(UV, stress oxydant, alkylant,  
agents anti-tumoraux...)



5 grandes voies de réparation  
de l'ADN

(selon la structure de la lésion)

Parmi ces voies de réparation  
de l'ADN :

- Réparation par excision de base (BER) :  
Petites lésions
- Réparation par réversion (RR) :  
O<sup>6</sup>-alkylG, O<sup>4</sup>-alkylT

# Objectifs de l'étude



Développer de nouveaux outils moléculaires pour étudier les lésions de l'ADN

- Sondes oligonucléotidiques pour analyser la **réparation** (BER & RR) de l'ADN lésé
- Sondes oligonucléotidiques pour étudier la **structure** de l'ADN lésé (par RPE pulsée)

# PLAN

## 1. Sondes oligonucléotidiques **fluorescentes** pour analyser la réparation de l'ADN lésé

- Nouvelle biopuce pour la BER
- Nouvelle biopuce pour la MGMT (réversion)
- Conclusions et perspectives


## 2. Sondes oligonucléotidiques **paramagnétiques** pour étudier la structure de l'ADN lésé par RPE pulsée

- Mise au point des sondes & stratégies de marquage
- Principaux résultats
- Conclusions et perspectives

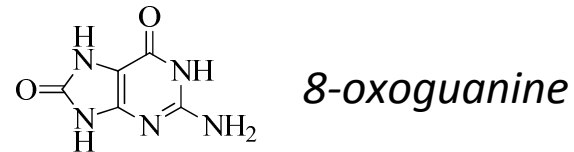
-1-

Sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour  
analyser la réparation de l'ADN lésé

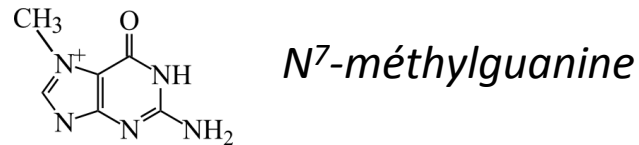
# Les lésions réparées par la BER

 Petites lésions de l'ADN, modifications chimiques, pas de modifications importantes de la structure 3D de l'ADN

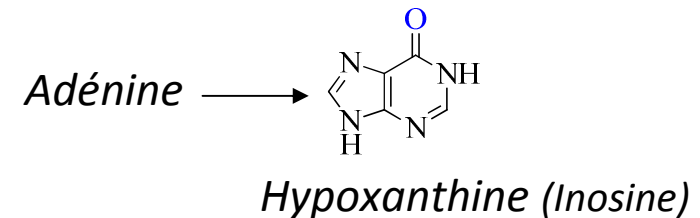
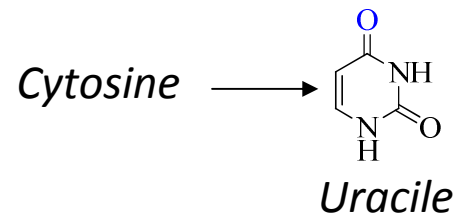
- Les bases oxydées



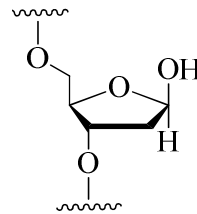
- Certaines bases alkylées



- Les bases désaminées

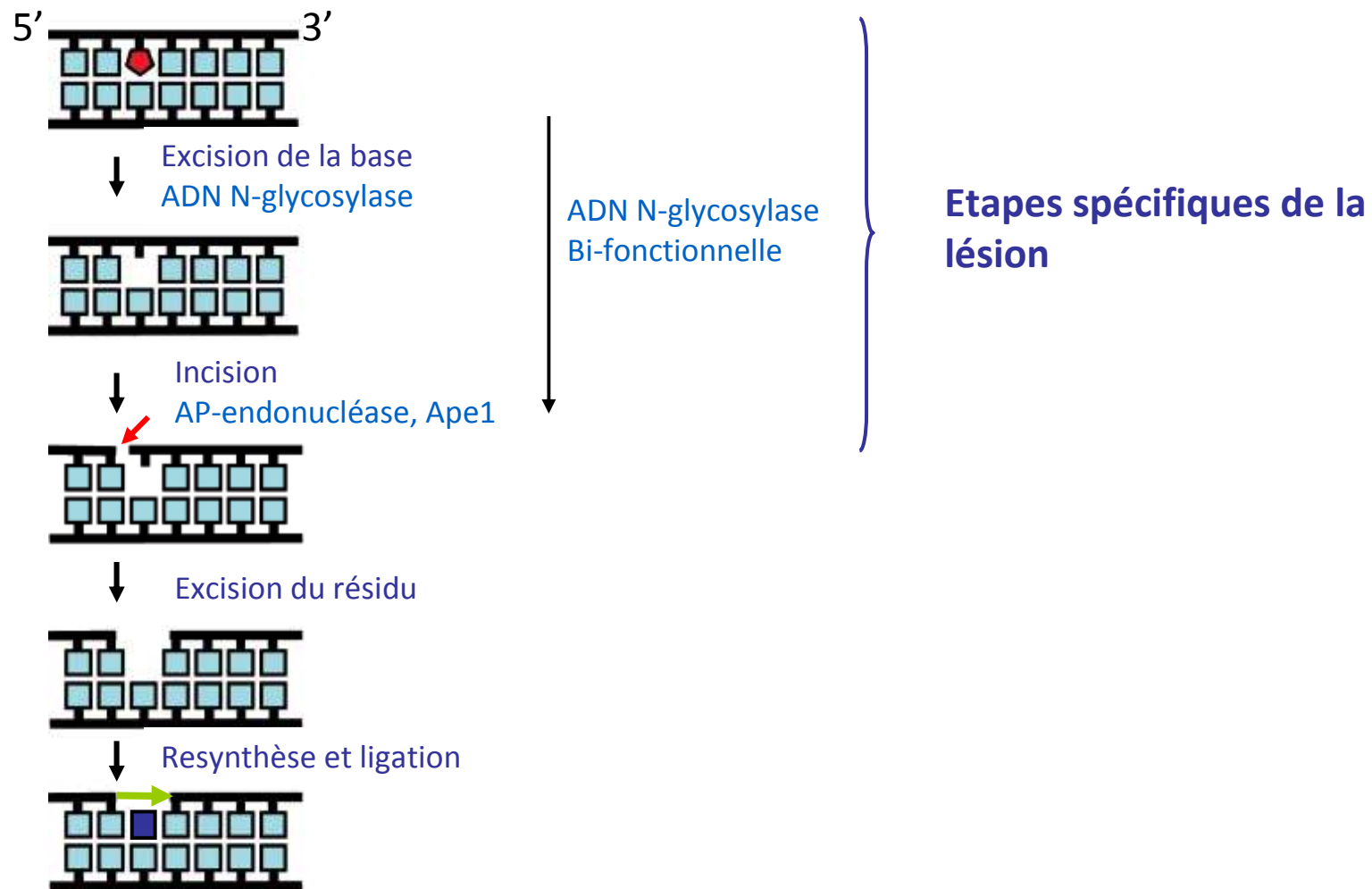


- Les sites abasiques



# Généralités sur le mécanisme de réparation de la BER

## La BER : mécanisme général



Nospikel *et al.*, 2009

# Pourquoi développer des outils de mesure de la BER ?




 Etudes fondamentales des mécanismes : *Qui répare quoi ? Comment ?*

 Implication dans certains phénomènes biologiques (vieillesse cellulaire, neurodégénérescence, cancers...)





- Expression, activité enzymatique et cancers
  - Prédispositions à certains cancers : OGG1, MYH, (Fortini *et al.*, 2003, Al-Tassan *et al.*, 2002)
  - Surexpression de Ape1 pour certains cancers (utérus, prostate, épithélium ovarien) (Evans *et al.*, 2000)



# Pourquoi développer des outils de mesure de la BER ?

-  Etudes fondamentales des mécanismes : *Qui répare quoi ? Comment ?*
-  Implication dans certains phénomènes biologiques (vieillesse cellulaire, neurodégénérescence, cancers...)
-  Etudier son rôle dans la réponse à certains stress (alkylants, oxydants...)
  - Expression, activité enzymatique et réponse au traitement thérapeutique
    - Surexpression Ape1, résistance au cisplatine, cancer du poumon (Wang *et al.*, 2009)
    - Surexpression Aag (*glycosylase réparant certaines bases alkylées*), sensibilisation TMZ (Trivedi *et al.*, 2005 et 2008)

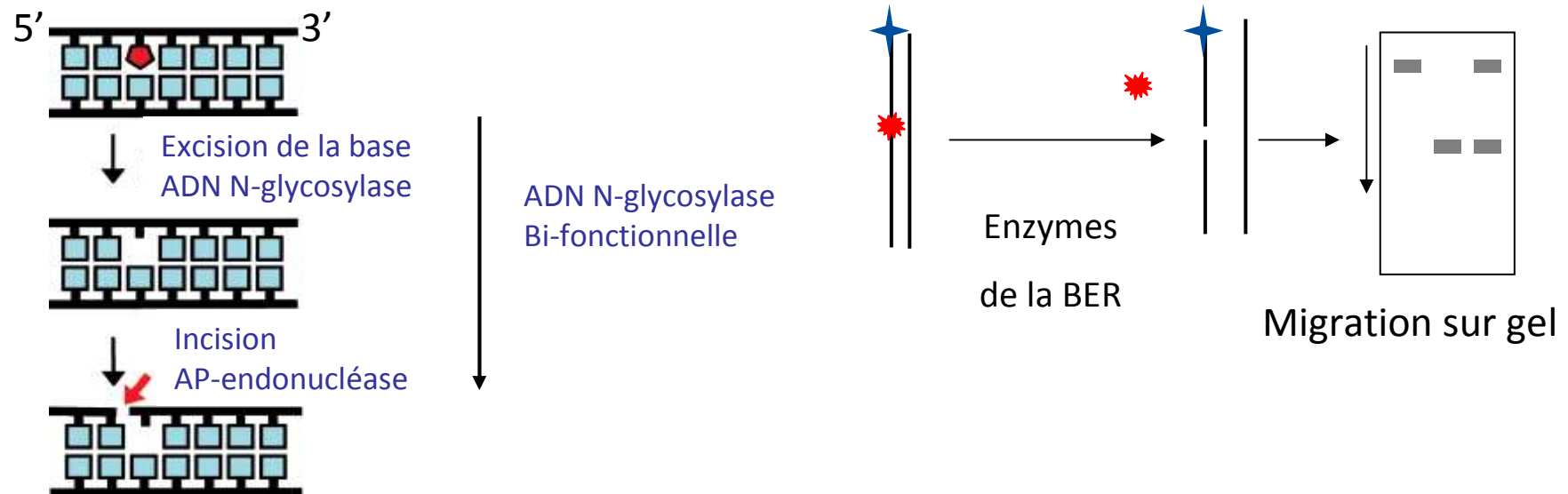
# Pourquoi développer des outils de mesure de la BER ?

-  Etudes fondamentales des mécanismes : *Qui répare quoi ? Comment ?*
-  Implication dans certains phénomènes biologiques (vieillesse cellulaire, neurodégénérescence, cancers...)
-  Etudier son rôle dans la réponse à certains stress (alkylants, oxydants...)
-  Développer de nouveaux inhibiteurs de la réparation
  - La méthoxyamine, la lucanthone : inhibiteurs de Ape1 (Liu et Gerson, 2004)
  - ARN interférents : inhibition de Aag (Sedgwick *et al.*, 2007)

# Les méthodes de mesure des activités de la BER (I)

## Méthodes *in vitro* de détection utilisant des oligonucléotides

- ODN (duplex ou hairpin) marqué au  $^{32}\text{P}$  ou à un fluorophore puis migration sur un gel d'acrylamide

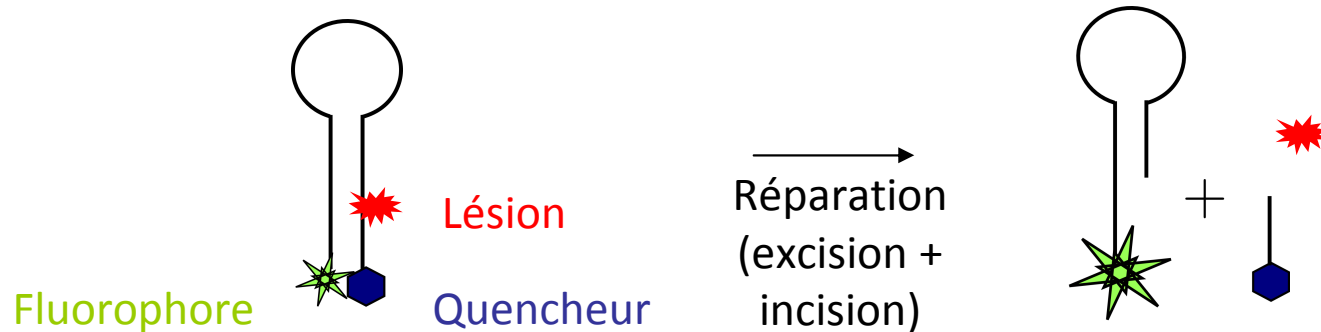


- Très sensible, méthode de référence
- mais fastidieuse, dégradation par des nucléases (extraits cellulaires)

# Les méthodes de mesure des activités de la BER (II)

## Méthodes *in vitro* de détection utilisant des oligonucléotides

- ODN quenché (duplex ou hairpin) : détection en temps réel (brevet : Gasparutto, 2003 : FR2836926)

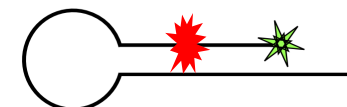


- Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)  
Information sur le mécanisme mais appareillage spécialisé, sensibilité variable
- Tests sur supports : multiplexage
  - Biopuce avec une détection par fluorescence (brevet Sauvaigo, 2001 : FR2809417, S. Sauvaigo *et al.*, 2004)
  - Biopuce avec une détection par imagerie SPR (Corne *et al.*, 2008)

# Les méthodes de mesure des activités de la BER : un nouvel outil

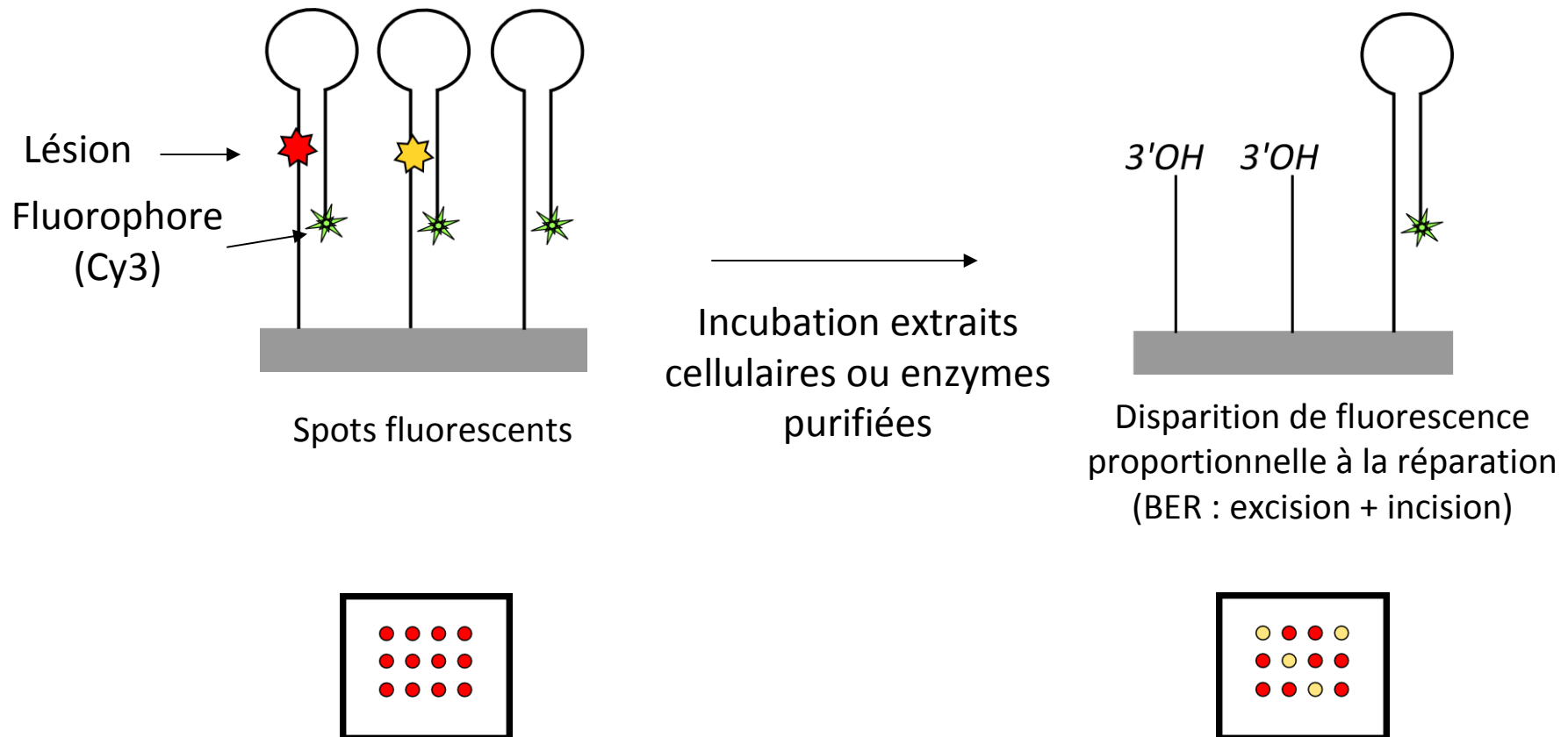
## Un nouvel outil d'analyse de la BER : Les principales caractéristiques

- Format : biopuce à oligonucléotides
  - Miniaturisation et parallélisation des analyses
  - Protection extrémités contre dégradation
  - Possibilité de changer de tampon facilement
- Oligonucléotide « hairpin » fluorescent
  - Molécule unique, auto-complémentaire
  - Meilleure stabilité du double brin (étapes de lavage) et vis-à-vis des nucléases (extraits cellulaires) (Hamann *et al.*, 2009)
- Activités de réparation ciblées
  - ADN N-Glycosylases et AP-endonucléase




# Principe général de la biopuce pour la BER

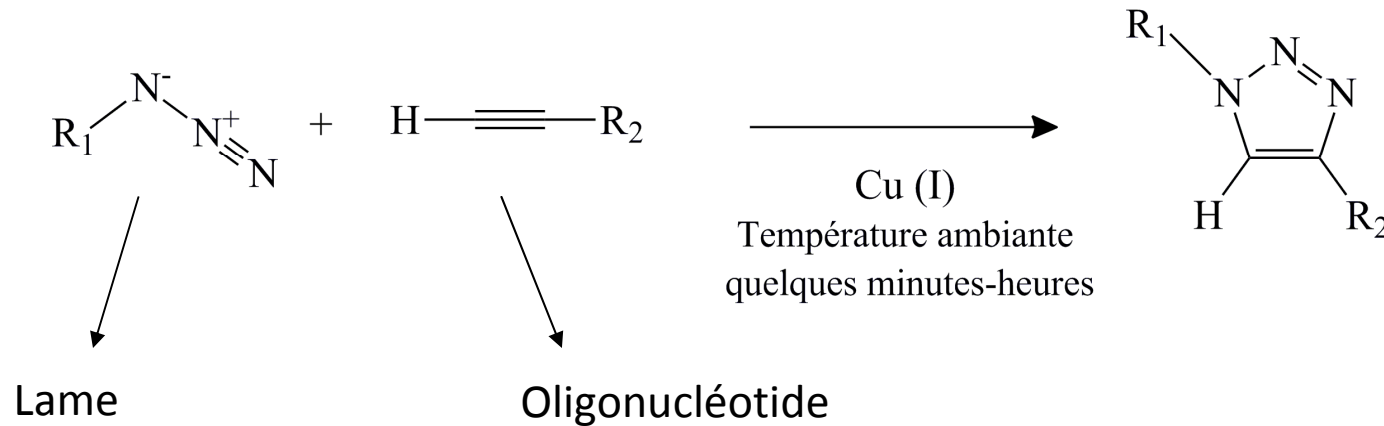
 Disparition de fluorescence si coupure enzymatique de la lésion (BER)



# Le greffage des sondes oligonucléotidiques

 **Chimie click** (réaction de 1-3 cycloaddition dipolaire de Huisgen catalysée par Cu(I) (Meldal *et al.*, 2002 ; Sharpless *et al.*, 2002))

- Greffage covalent
- Rendements élevés
- Conditions de réaction simples et compatibles avec les biomolécules
- Ne nécessite pas d'étapes post immobilisation de blocage des lames

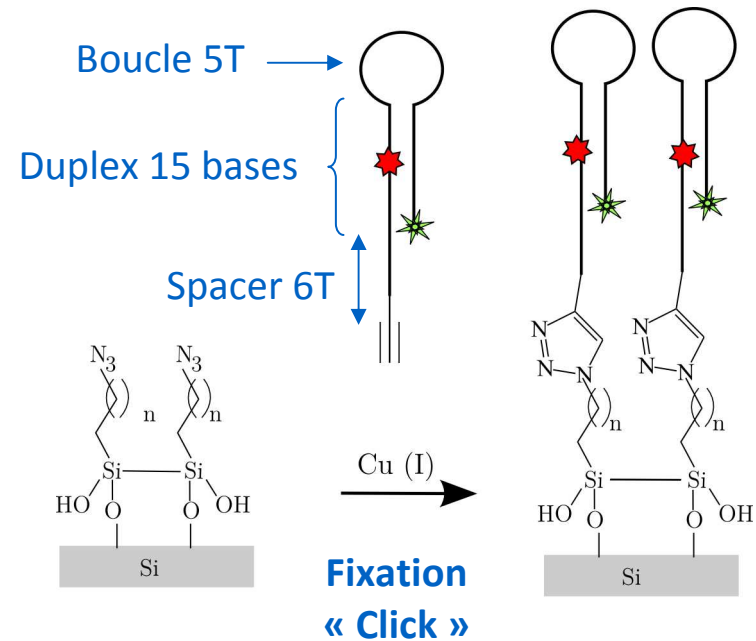
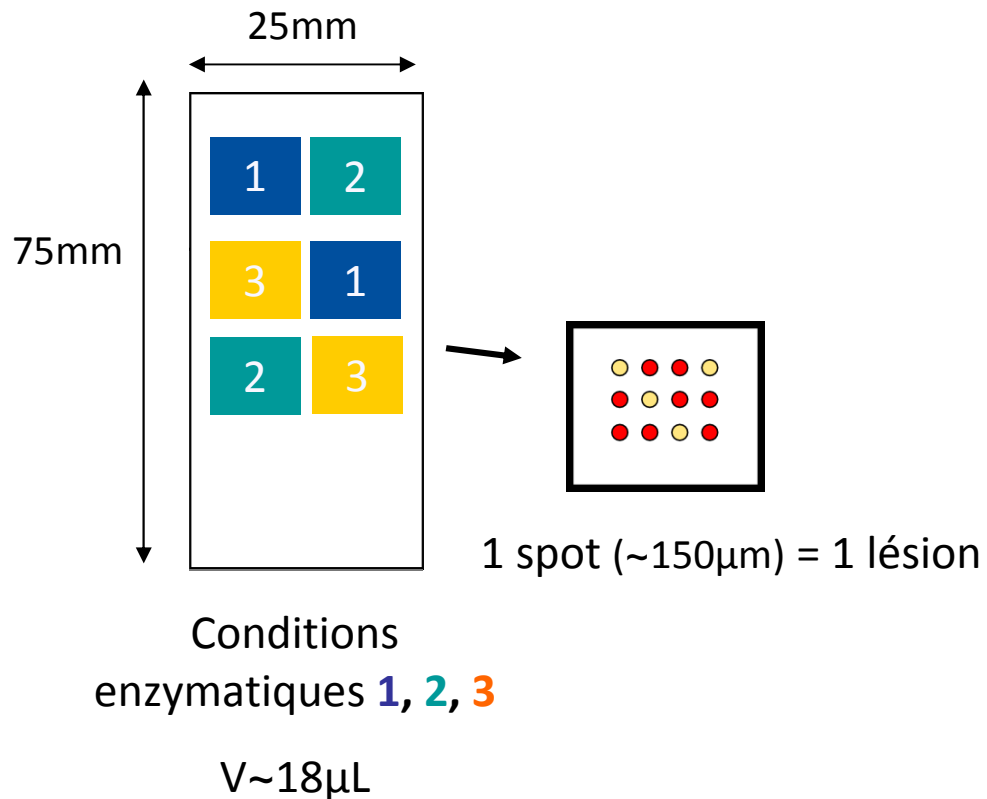


Laboratoire de Fonctionnalisation et  
Chimie pour les Microsystèmes  
(LETI CEA-Grenoble)

Synthèse, purification,  
caractérisation au laboratoire

# Mise au point de la chimie de greffage

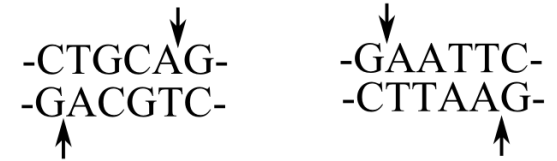
## Conception



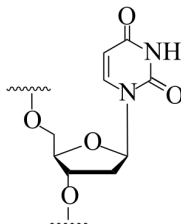
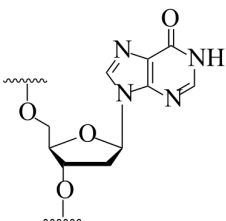


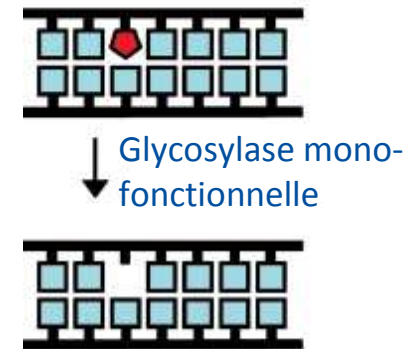
# « Modifications » introduites sur la puce BER

 Site de restriction PstI et EcoRI (Témoins)



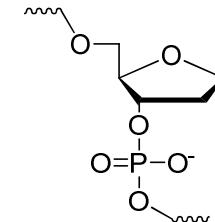
 Bases modifiées reconnues par des glycosylases mono-fonctionnelles

Uracile (U:A)		Uracile N-glycosylase (UNG)
Inosine (I:T)		Alkyladénine N-glycosylase (Aag)



 Tétrahydrofurane (THF) (analogue stable de site abasique)

- Substrat pour l'AP-endonucléase

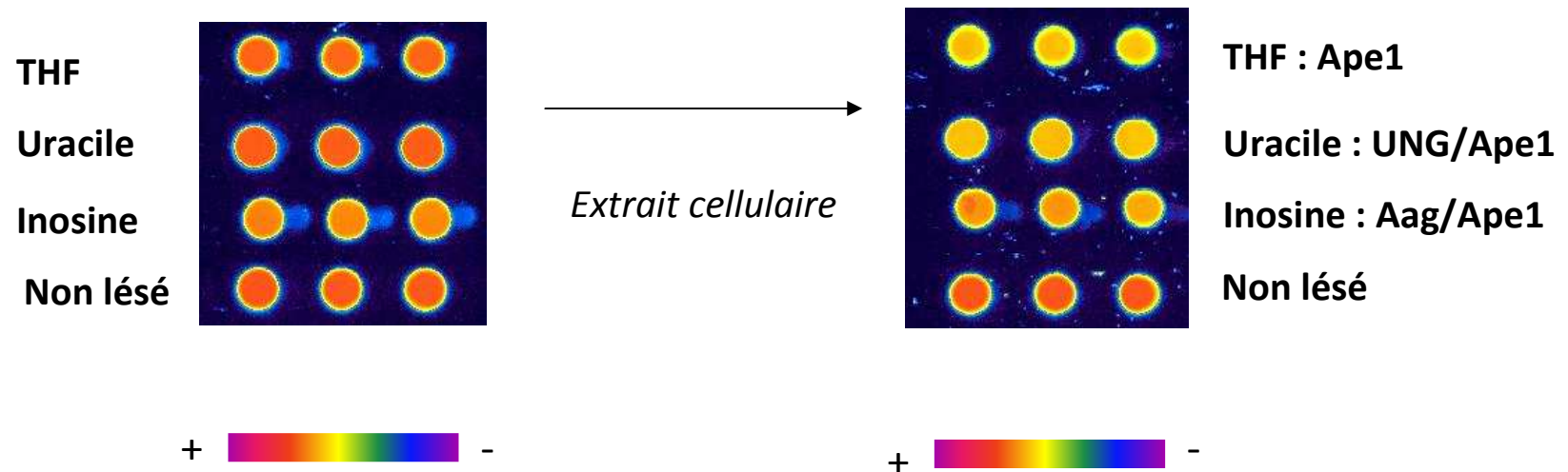


# Validation de la biopuce

🧬 Validation initiale avec les enzymes purifiées

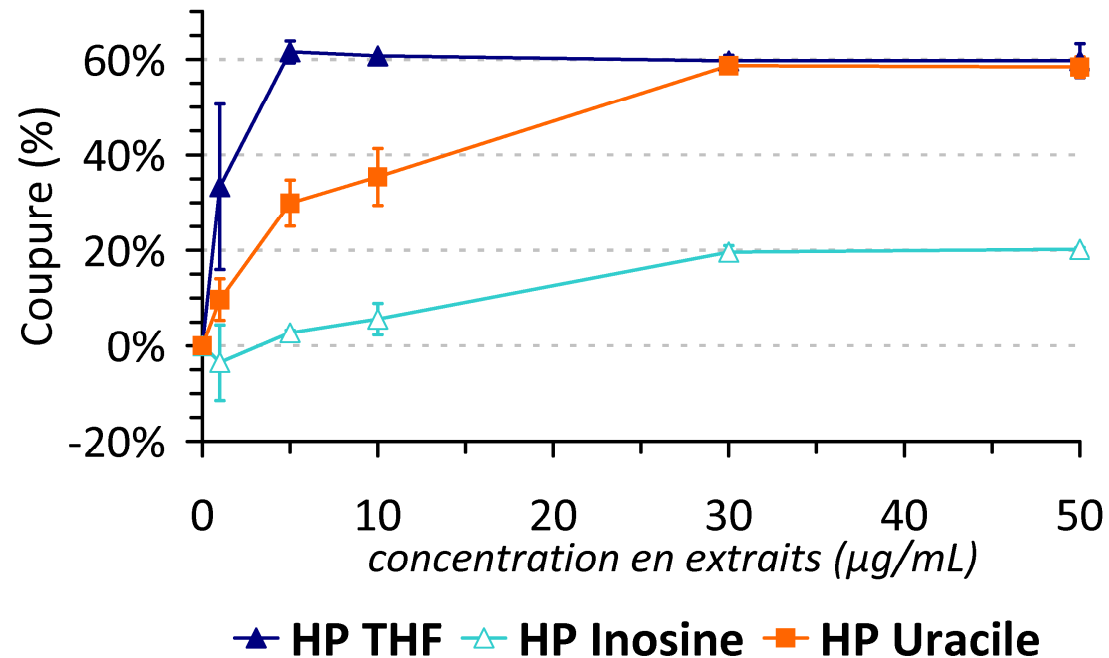
🧬 Validation avec un extrait cellulaire

- Extrait nucléaire de cellules HeLa
- Gamme de concentrations



# Validation de la biopuce

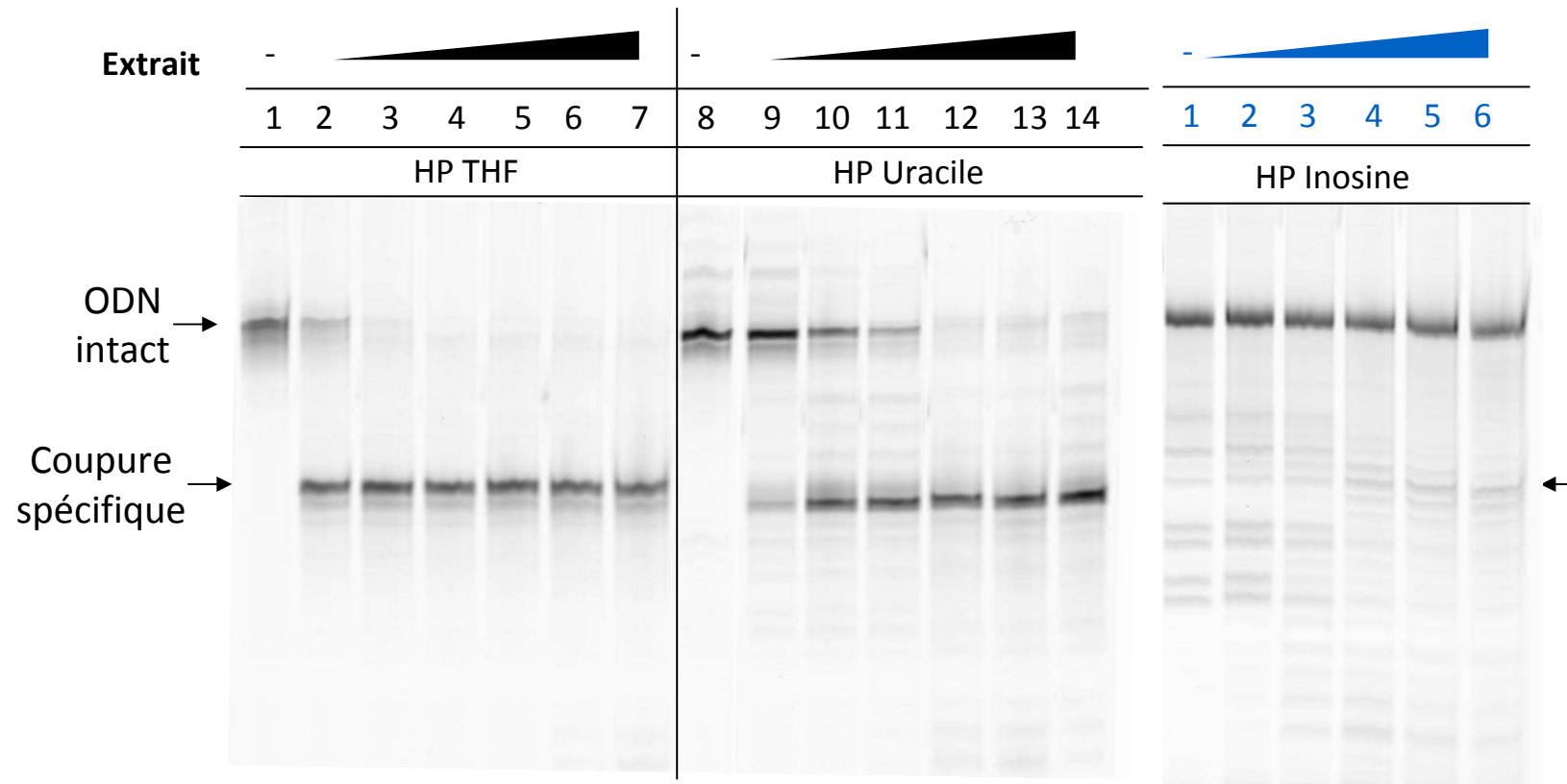
## Validation avec un extrait cellulaire



- Détection de 3 activités enzymatiques simultanément
- Plateau atteint pour concentration plus faible pour THF (Ape1)
- Activité Aag plus faible (Kreklau *et al.*, 2001, Sauvaigo *et al.*, 2004)

# Validation de la biopuce

 Validation avec un extrait cellulaire, vérification par technique PAGE fluorescent




Gamme extrait : 10, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$

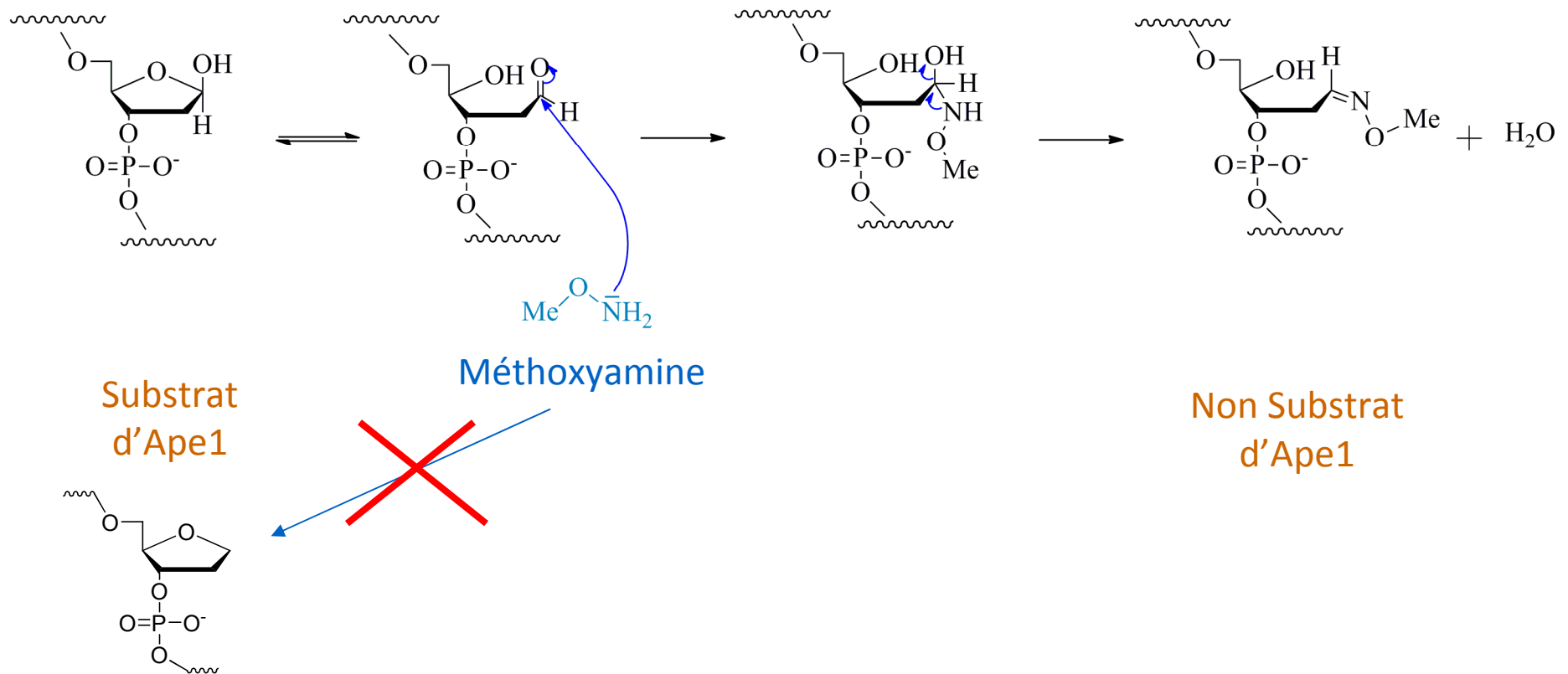
50, 200, 500, 1000, 1500  $\mu\text{g/mL}$

ODN : 15 pmoles, réaction 1h à 37°C




# Etude d'inhibiteurs de la BER

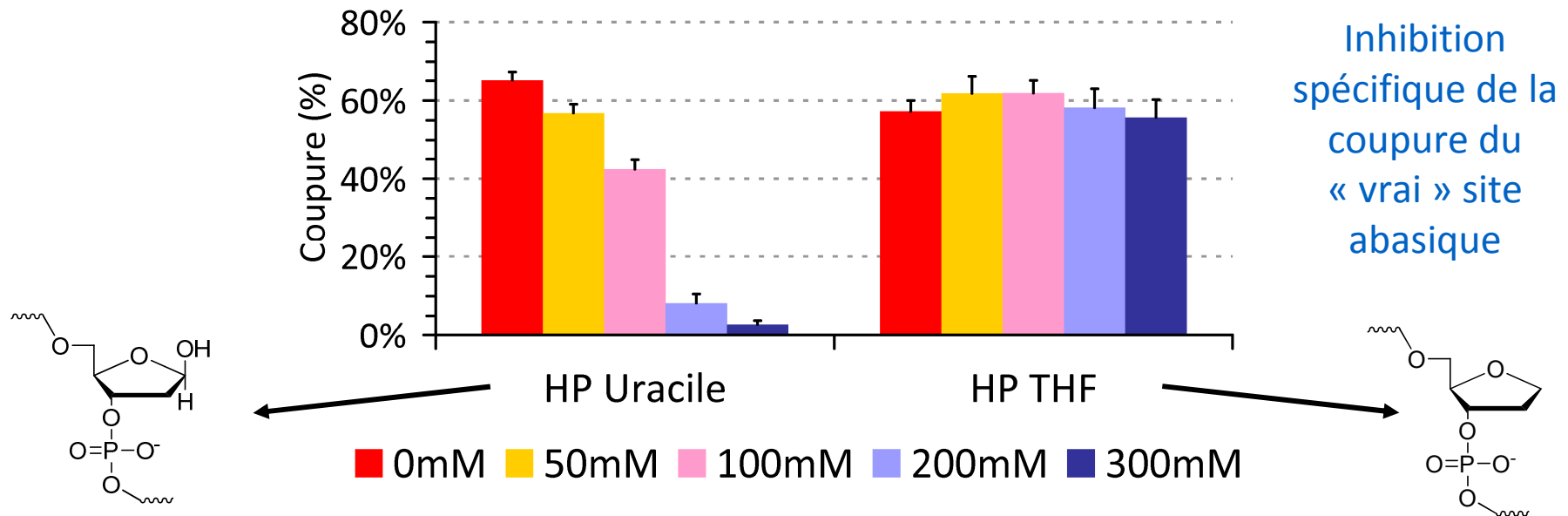
 Inhibiteur de la réparation de l'ADN, exemple de la méthoxyamine :  
Inhibiteur indirect de Ape1 (Liu *et al.*, 2004)



# Etude d'inhibiteurs de la BER

 Inhibiteur de la réparation de l'ADN, exemple de la méthoxyamine :  
Inhibiteur indirect de Ape1 (Liu *et al.*, 2004)


- Gamme de méthoxyamine en présence d'un extrait nucléaire HeLa
- Substrats étudiés : Uracile et THF




 Inhibition complète pour concentration élevée :

- Probable réaction avec les autres composants de l'extrait.
- Concentration « active » en accord avec la littérature (Rosa *et al.*, 1991)

# Etude de sous-lignées U373

 3 sous-lignées issues de U373 (glioblastomes humains), fournies par Dr L. Pelletier (GIN, Grenoble) :

- U373
- U373-IV3
- U373-IV3-TMZ : résistante à l'agent antitumoral alkylant Témazolomide (*adduits majoritairement réparés par la BER : Aag/Ape1*)

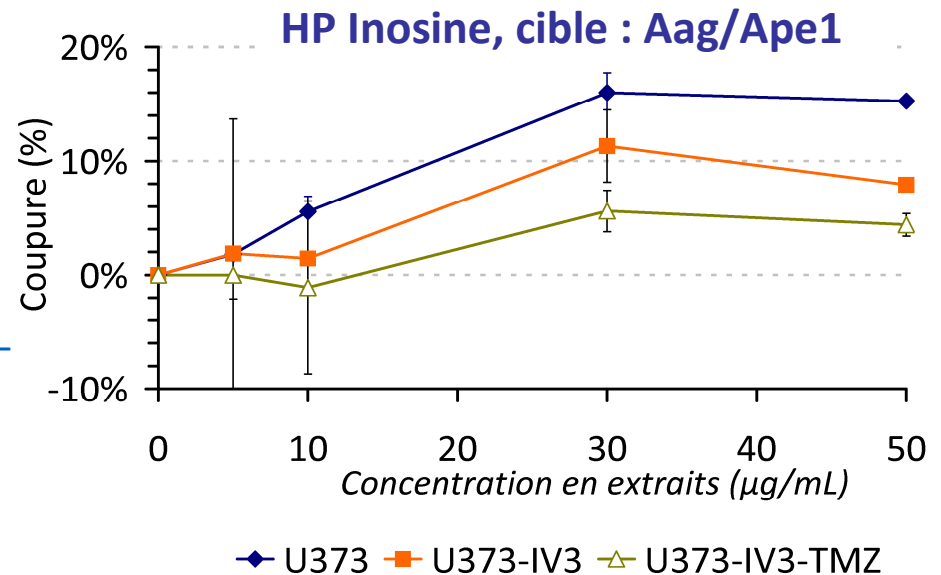
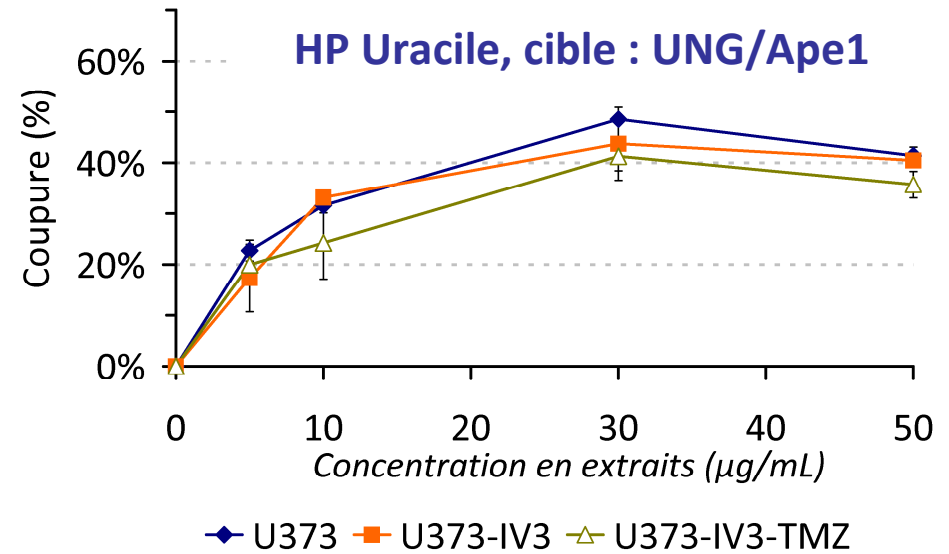
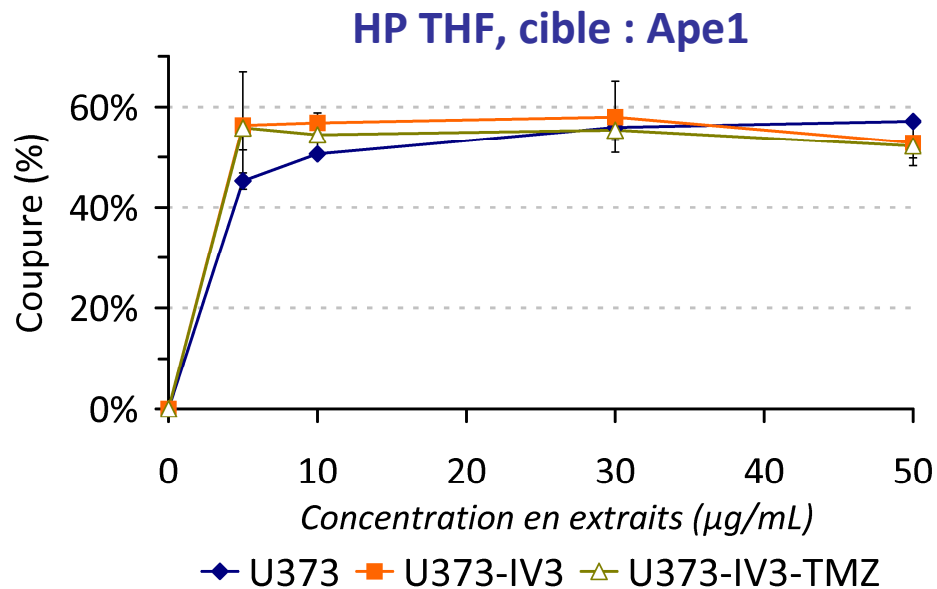
 Préparation d'extraits nucléaires

 Incubation des lames avec une gamme de chaque extrait

 Un témoin « extrait nucléaire HeLa » (50µg/mL) par lame

# Etude de sous-lignées U373

## Résultats



- Activité Aag semble plus faible pour U373-IV3-TMZ (résultats préliminaires)
- Outil validé pour la comparaison d'activités glycosylase et AP-endonucléase



# Biopuce à ADN pour détecter la BER – Conclusions

## Suivi **simultané** d'activités glycosylases et AP-endonucléase

- Détection possible d'**activités** réparation **faibles** (ex Aag)
- Bonnes **reproductibilité** et **sensibilité**
- **Pas de dégradation** des sondes

## Outil validé pour

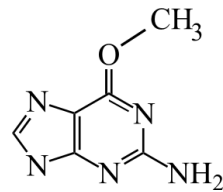
- L'analyse d'**inhibiteurs** de la BER (potentiel outil de **screening**)
- La **comparaison** d'activités de plusieurs échantillons biologiques (lignées)

**Adaptation du système pour détecter une autre activité de réparation de l'ADN par réversion directe : la MGMT**

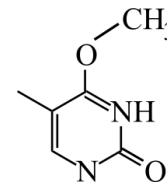
# La Réparation par Réversion directe : La MGMT

🧬 Exemples de lésions réparées par réversion directe :

*certaines lésions alkylées : en position O<sup>6</sup> de la guanine et O<sup>4</sup> de la thymine*



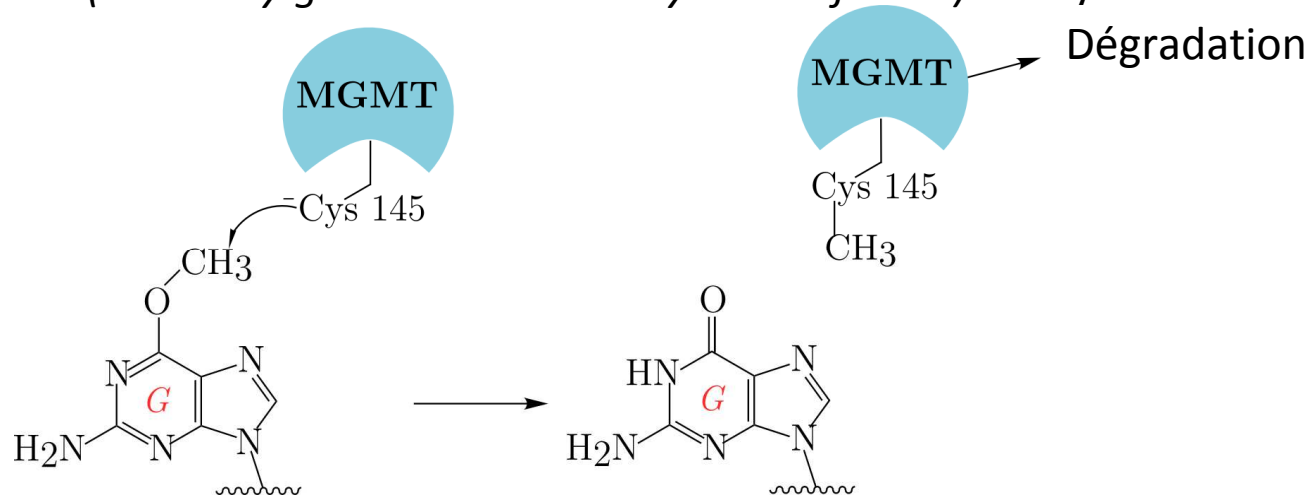
O<sup>6</sup>-méthylguanine



O<sup>4</sup>-méthylthymine

🧬 Mécanisme général

- Réversion du groupement alkyle
  - Pas de coupure de chaîne
  - MGMT (*O<sup>6</sup>-Méthylguanine-ADN méthyle transférase*) : enzyme « suicide »



# Liens entre la réparation par réversion et le cancer


## Implications de la MGMT dans la réponse aux traitements antitumoraux alkylants

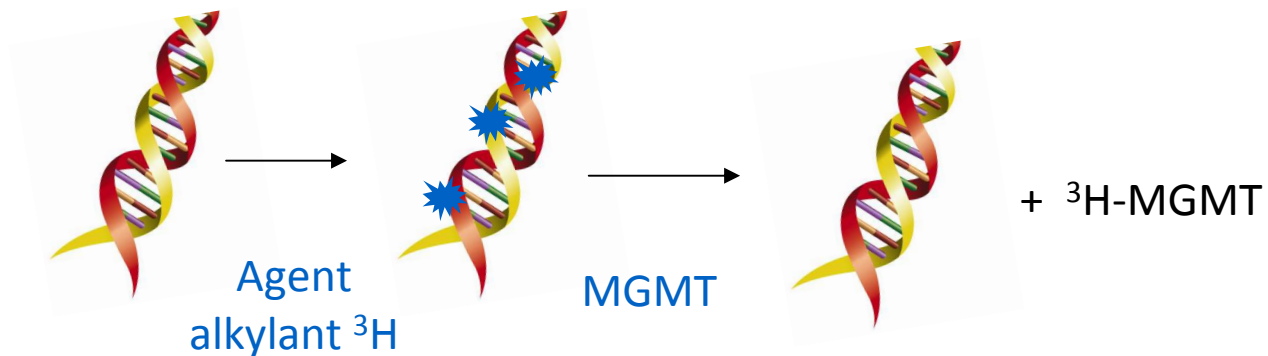
- Agents alkylants antitumoraux de type SN1 ~6% de adduits formés : O<sup>6</sup>-alkylguanine
- Cytotoxicité attribuée à la lésion O<sup>6</sup>-alkylguanine
- MGMT : marqueur prédictif (gène, protéine, activité)

## Développements d'inhibiteurs de l'activité de la MGMT

- Mimes de lésions, exemples : O<sup>6</sup>-benzylguanine, Lomeguatrib (Verbeek *et al.*, 2008)


# Les méthodes de mesures de l'activité de la MGMT (I)

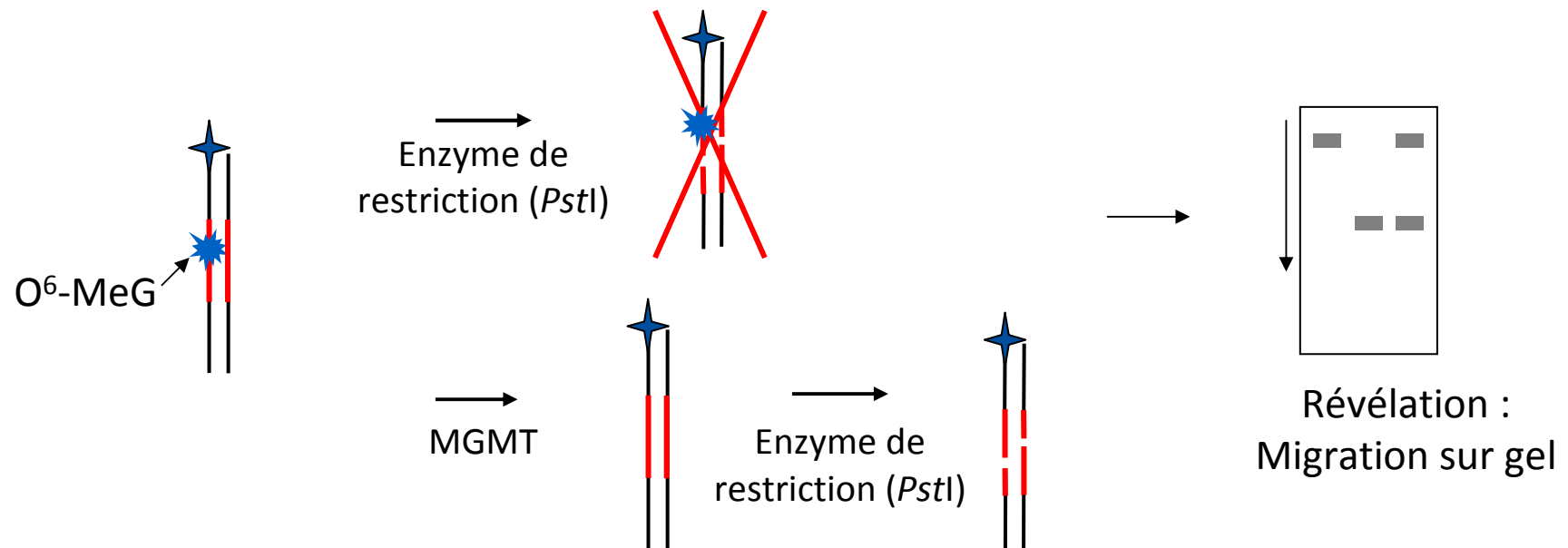
 Suivi chromatographique (HPLC) radioactif au tritium



- Sensible, mais utilise la radioactivité

# Les méthodes de mesures de l'activité de la MGMT (II)

 Méthode « indirecte » : Insertion de la lésion dans le site d'une enzyme de restriction (Green *et al.*, 1984, Wu *et al.*, 1987)



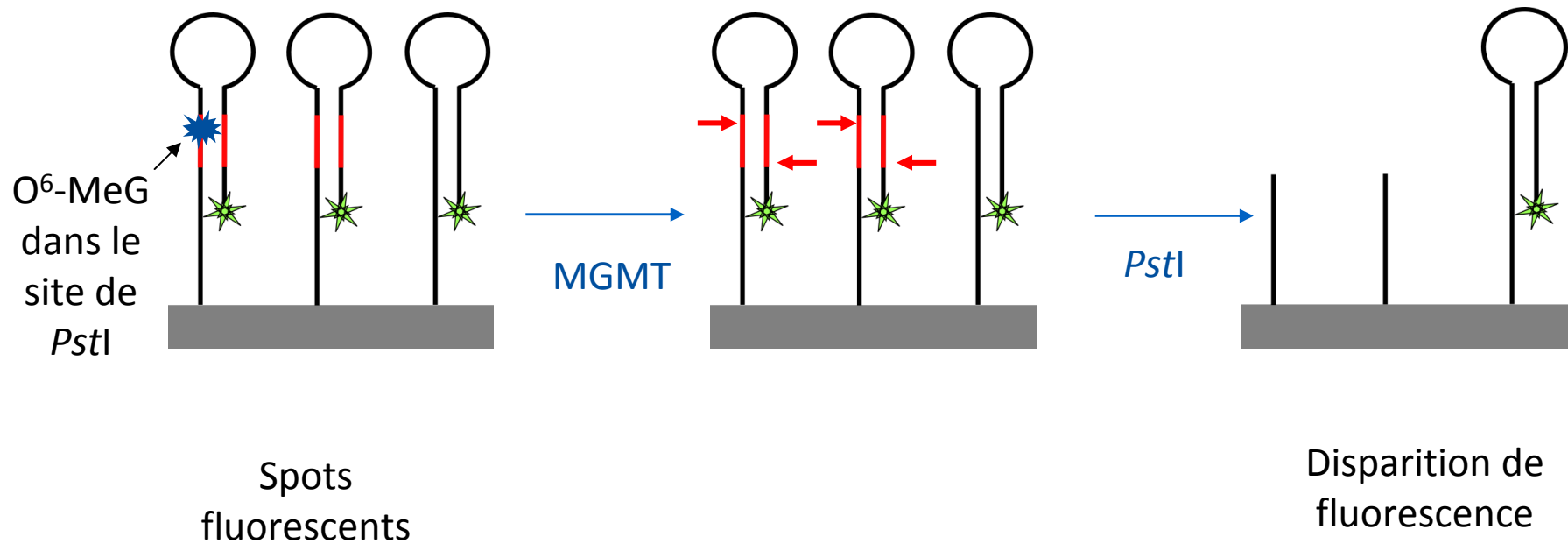
- Limitations :

- Dégradation (extraits cellulaires)
- Nécessité d'utiliser un tampon enzymatique commun ou une étape intermédiaire de précipitation de l'ADN

# Biopuce à ADN pour détecter l'activité de la MGMT

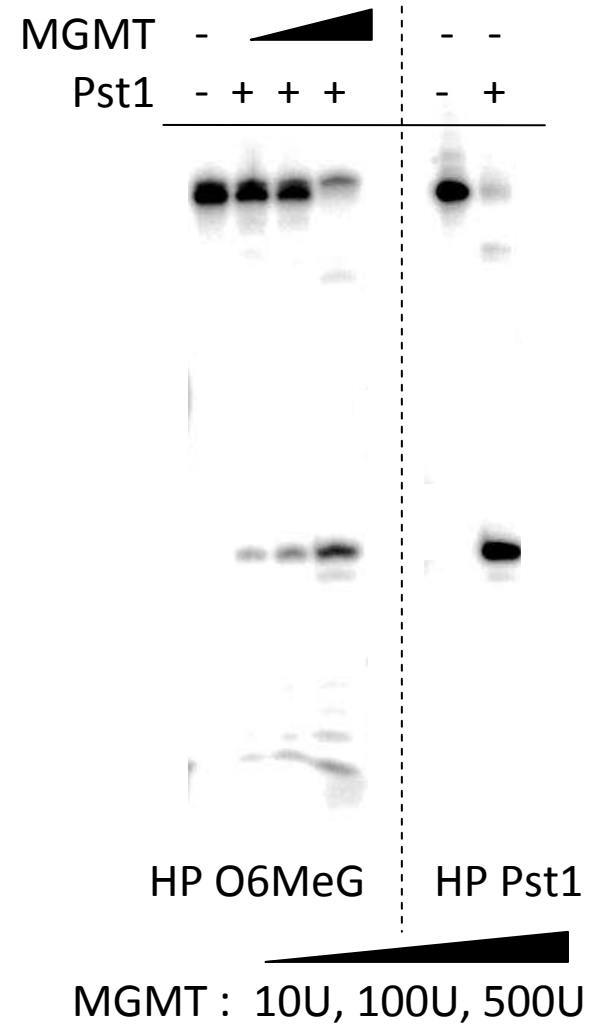
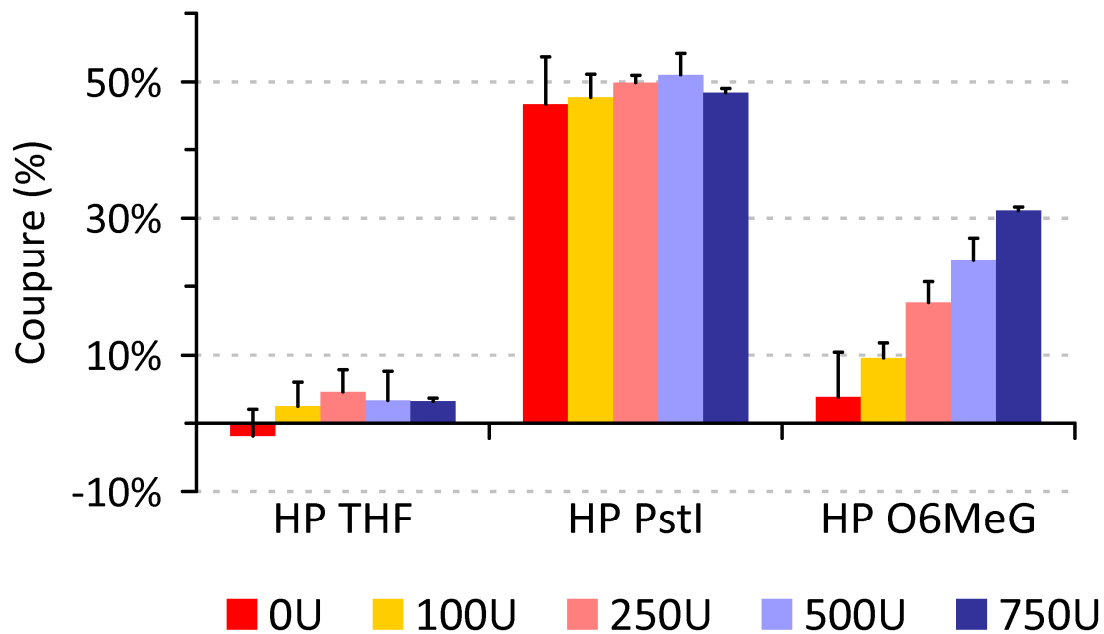
 Adaptation du système à la détection de la voie de réparation par réversion (MGMT)

- Permet étape intermédiaire de lavage : changement de tampon enzymatique
- Principe : lésion dans le site de restriction de *Pst*I



# Résultats (I)

🧬 Résultats obtenus à partir de l'enzyme purifiée (gamme)



# Résultats (II)

## Résultats à partir d'extraits cellulaires

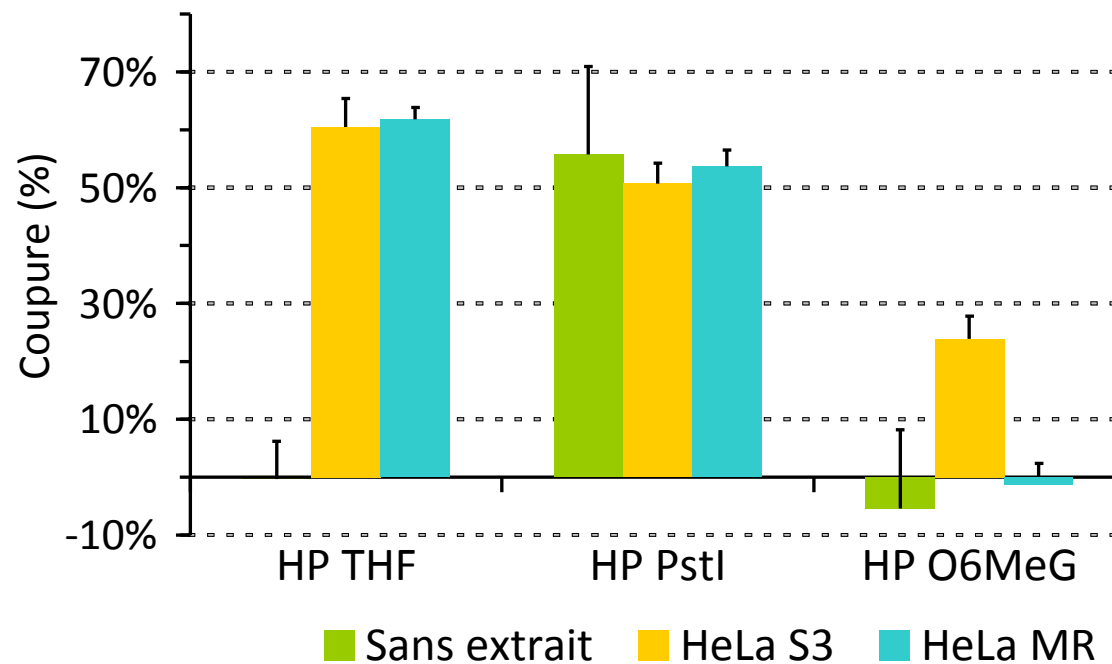
- Extraits cellulaires totaux fournis par Dr B. Kaina (Mainz, Allemagne) de cellules **surexprimant (HeLa S3)** ou **déficientes (HeLa MR)** en MGMT
- Incubation des lames avec ou sans extraits (200µg/100µL) puis avec *PstI*




## Résultats (II)

### Résultats à partir d'extraits cellulaires

- Extraits cellulaires totaux fournis par Dr B. Kaina (Mainz, Allemagne) de cellules **surexprimant (HeLa S3)** ou **déficientes (HeLa MR)** en MGMT
- Incubation des lames avec ou sans extraits (200µg/100µL) puis avec *PstI*



# Conclusions (I)

 Validation de l'utilisation de la **chimie click** pour le greffage de sondes oligonucléotidiques originales de type **hairpin**

- **Greffage** du double brin d'ADN **efficace, simplifié** et **stable** lors des étapes de lavage
- **Bruit de fond faible**
- **Coefficients de variation** après immobilisation **faibles** (~10%)

 Test **performant** pour détecter activités de réparation (BER & RR)

- Sensibilité pour ces activités similaire à celles d'une analyse PAGE fluorescente dans nos conditions

 Système de mesure **facilement adaptable**

- Détection de plusieurs activités **simultanément** (BER)
- Conditions enzymatiques adaptables aux besoins de l'utilisateur

# Conclusions (II)







Outil particulièrement **pertinent** pour

- L'étude de **plusieurs** activités enzymatiques à partir d'un même échantillon ou la comparaison de plusieurs échantillons
- Le **screening** d'**inhibiteurs** de la réparation
- Analyser l'activité de la **MGMT**  
Preuve de concept à partir de l'enzyme purifiée et d'extraits surexprimant/déficient

} *Multiplexage*

# Perspectives

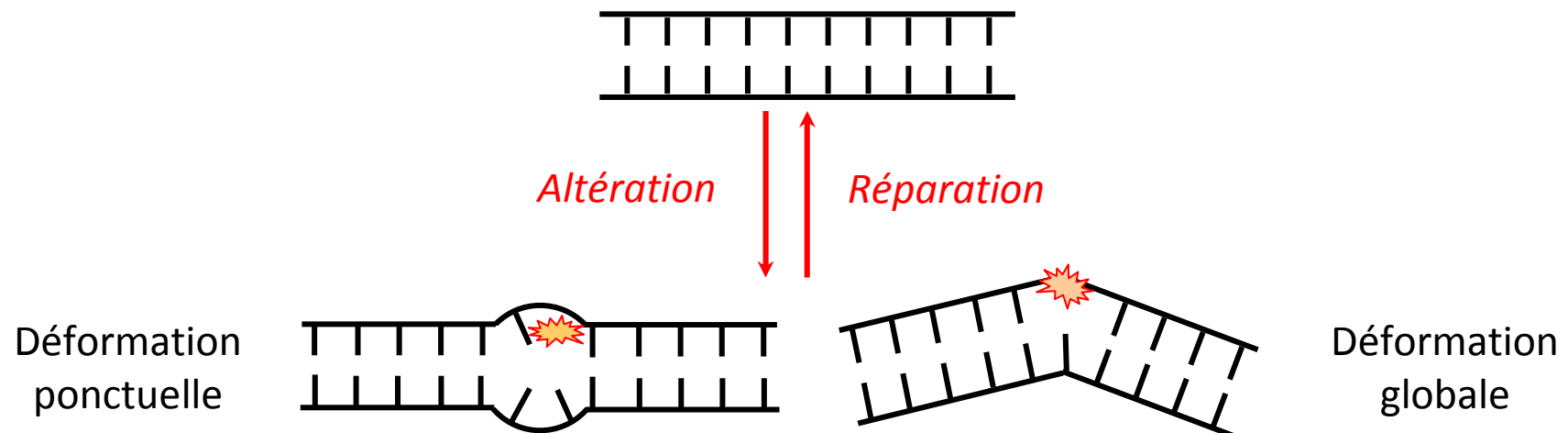
-  Certaines limitations : pourcentage de coupure maximal limité à ~60%
  - Approfondir les premières études pour **augmenter** l'accessibilité des sondes : densité, position des sondes...
-  Adaptation de l'outil pour une détection **apparition** de fluorescence (sonde « quenchée »)
-  Pour la MGMT, **calibration** du test avec des extraits « normaux »
-  Développement d'un outil similaire supporté sur **billes** (Camille Désiron, Guillaume Gines : stagiaires M2)

-2-

Sondes oligonucléotidiques paramagnétiques  
pour l'étude structurale des lésions de l'ADN  
par RPE pulsée

# Structures et déformations de l'ADN

- La présence de lésions dans la structure d'ADN peut induire une déformation ponctuelle ou globale de la molécule



- La reconnaissance des déformations structurales est l'étape initiale dans les processus biologiques impliquant les lésions (réparation, réplication...)
- L'analyse de la structure de l'ADN lésé est essentielle pour une meilleure compréhension des conséquences biologiques des lésions

# Méthodes d'étude structurale

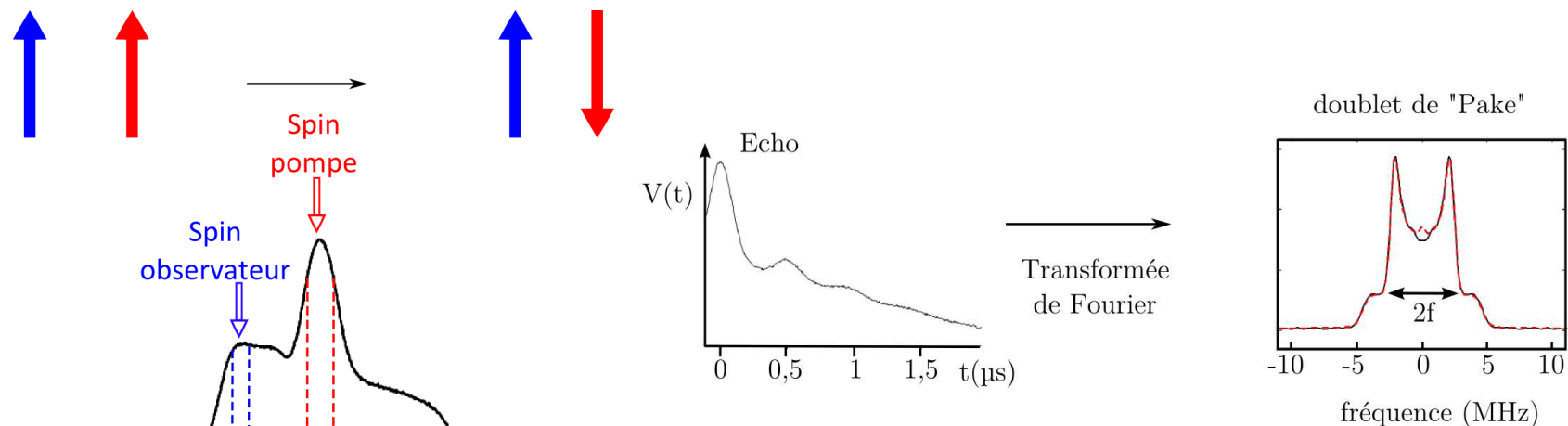
 Méthodes généralement utilisées pour les études structurales de l'ADN :

- Résonance magnétique nucléaire (RMN)
  - Distances faibles (environ 5 Å)
  - Quantité d'échantillon importante
- Diffraction des rayons X
  - Haute résolution
  - Difficulté d'obtention des cristaux, structure cristalline (solide)
- Transfert d'énergie de fluorescence (FRET)
  - Grandes distances (10 à 100 Å)
  - Résolution faible
  - Marquage de l'ADN
  - Marqueurs de taille importante

# La RPE pulsée

## La résonance paramagnétique électronique (RPE) pulsée

- Interaction dipolaire entre **deux** moments magnétiques (spins électroniques, centres paramagnétiques)
- Utilisation d'une séquence de pulses d'excitation (DEER)



$$f = \frac{\alpha}{2\pi d^3}$$



# La RPE pulsée

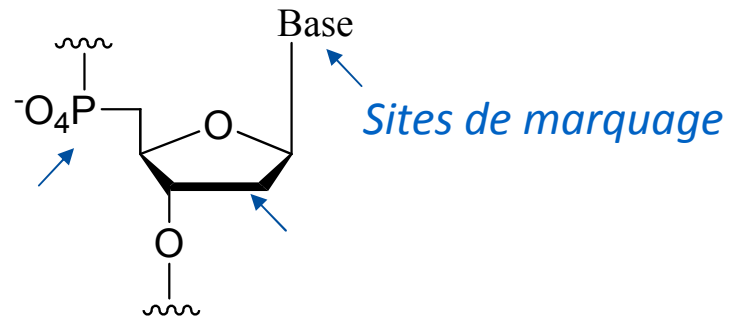
## La résonance paramagnétique électronique (RPE) pulsée

- Distances :  $1,5 \text{ nm} < r < 6-8 \text{ nm}$  (Jeschke, 2002)
- Quantité de sondes nécessaires : 3 nmoles, 60  $\mu\text{L}$
- Nécessite l'introduction de centres paramagnétiques, en général des radicaux (plus petits que la majorité des fluorophores)

# Stratégies de marquage radicalaire

## Critères :

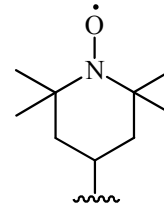
- Facilité d'insertion sans dégradation des radicaux et de l'ADN
- Rigidité du système (pas de gêne de l'appariement mais pas trop souple pour permettre une mesure précise)



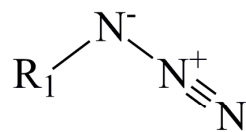
# Stratégies de marquage radicalaire

 Notre stratégie :

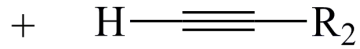
- Utilisation du radical TEMPO



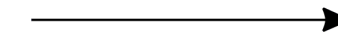
- Chimie Click
  - Marquage sur le sucre
  - Marquage sur la base



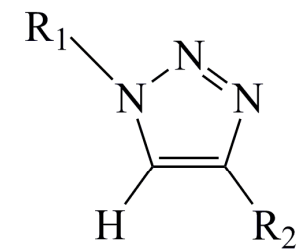
*Azoture*



*Alcyne terminal*



Cu (I)  
Température ambiante  
(quelques minutes-heures)

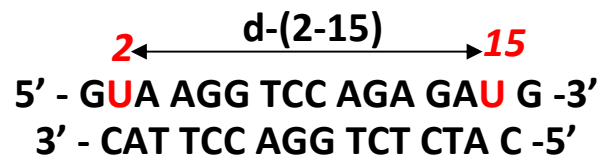


*Triazole 1,4*

# Stratégies de marquage radicalaire

## Chimie Click : Introduction de la fonction alcyne sur l'ADN

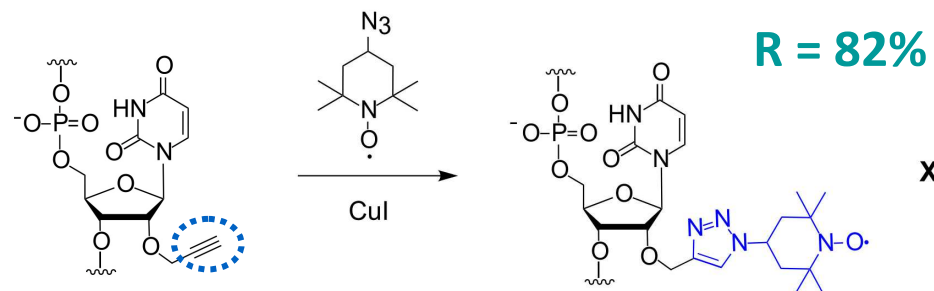
- Bi-marquage :



**U = X ou Y**

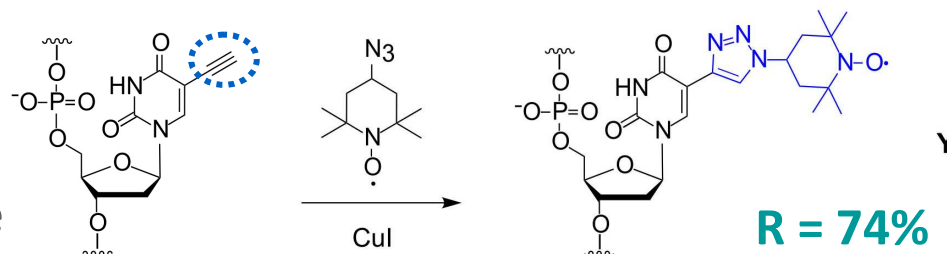
- Marquage sur le sucre :

**X** : 2'-O-propargyle-uridine



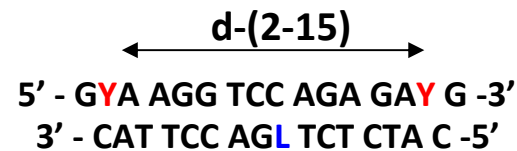
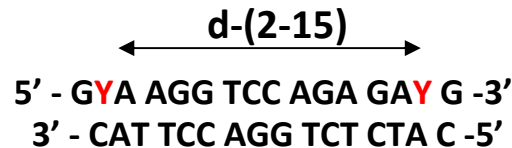
- Marquage sur la base :

**Y** : 5-éthynyle-désoxyuridine

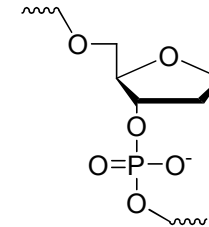



# Mesure de distances des duplex (I)


## Préparation des duplex




L : THF

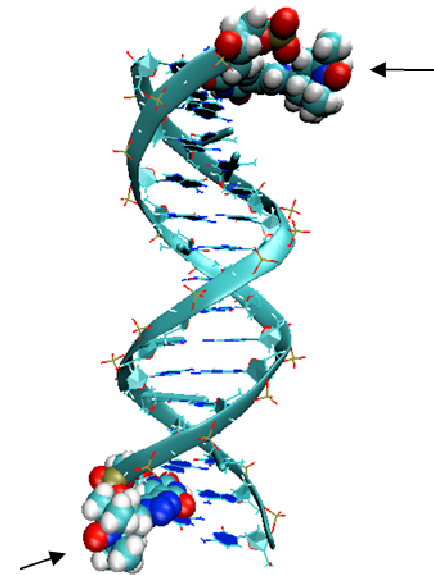
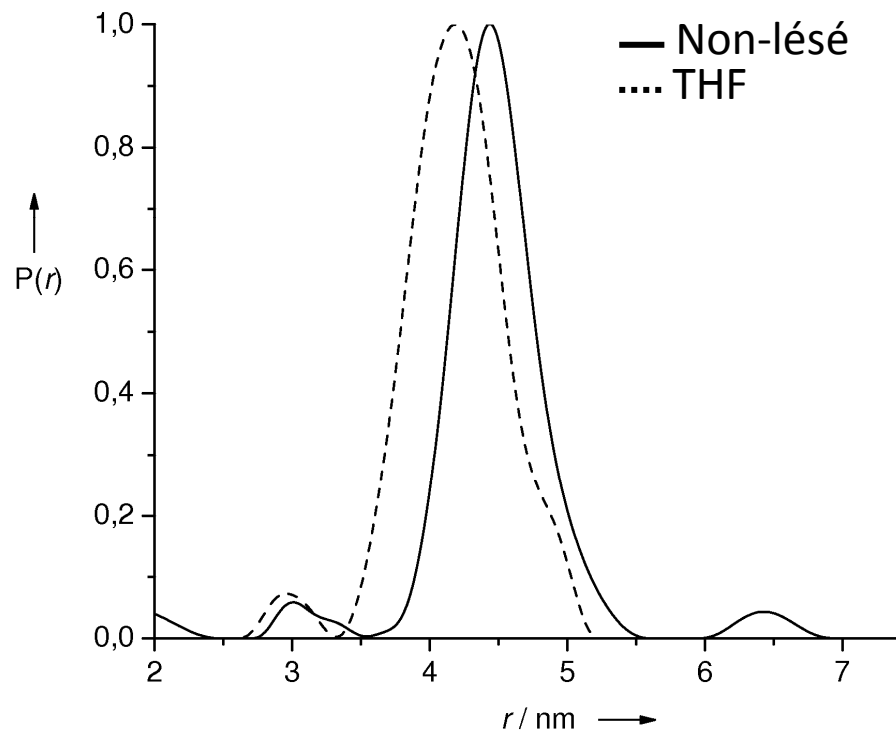


 Mesure de la distance séparant les deux nitroxydes par RPE pulsée (collaboration avec l'équipe du Dr S. Gambarelli, CEA Grenoble)

 Résultats obtenus pour le marquage sur la base (distribution de distances plus fine)

# Mesure de distances des duplex (II)

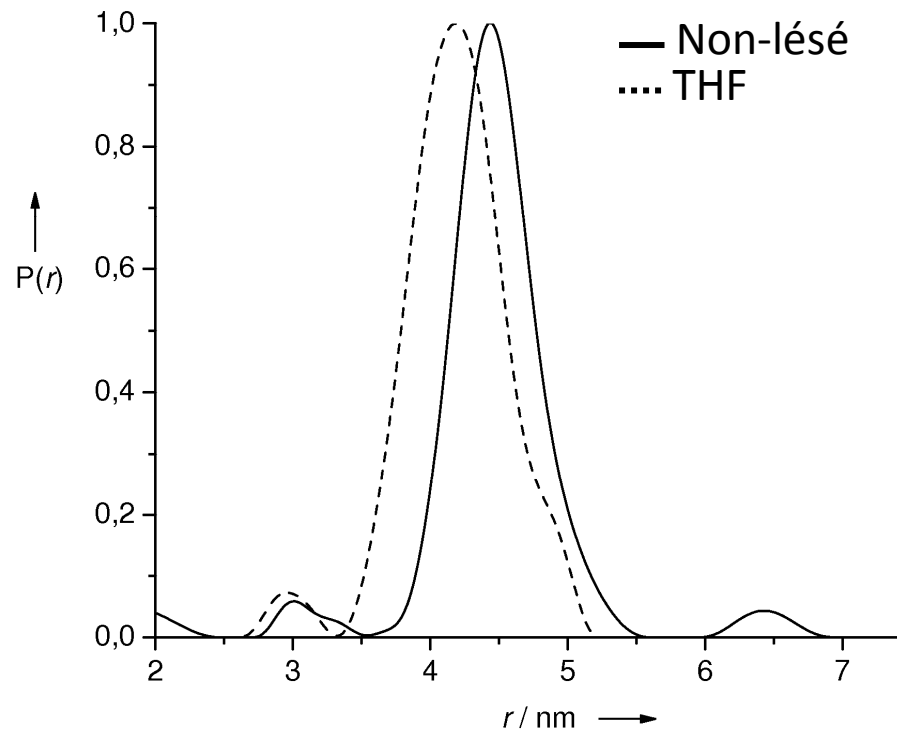
 Modélisation de dynamique moléculaire (collaboration avec l'équipe du Dr Y. Boulard, CEA Saclay)



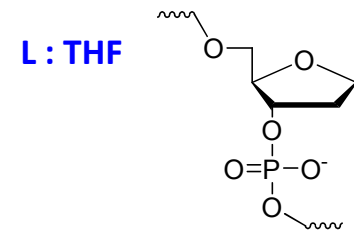
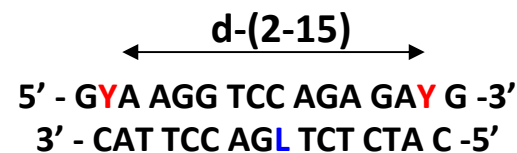
Duplex ADN	Distance max (nm)	Distance modélisation (nm)
Non-lésé	$4,40 \pm 0,3$	$4,38 \pm 0,23$

# Mesure de distances des duplex (III)

## Impact du THF sur la mesure de distances



Duplex ADN	d-(2-15) (nm)	W (nm)	$\Delta d$ (nm)
Non lésé (2-15)-5-TEMPO	4,40	0,6	
THF (2-15)-5-TEMPO-THF	4,20	0,8	-0,25



Résultats en accord avec Sicoli *et al.*, 2009 ; cytosine et THF extra-hélicaux (Cuniasse *et al.*, 1990)

# Application à un système complexe tri-marqué



## Chimie click :

- **Adaptée** & **performante** pour réaliser du bi-marquage
- Rendement **quasi-quantitatif**
- Système **rigide** (marquage de la base)



## Application au tri-marquage :

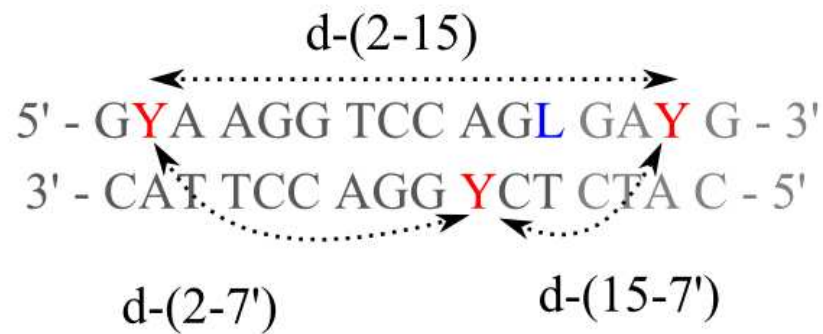
- Plus d'informations sur la structure 3D (*détermination de 3 distances*) et possible application à l'étude d'interaction ADN-protéines
- Introduction de 4 modifications (1 « lésion », 3 nitroxydes)
  - Détermination des distances ?
  - Gène de la reconnaissance de l'ADN par des protéines ?



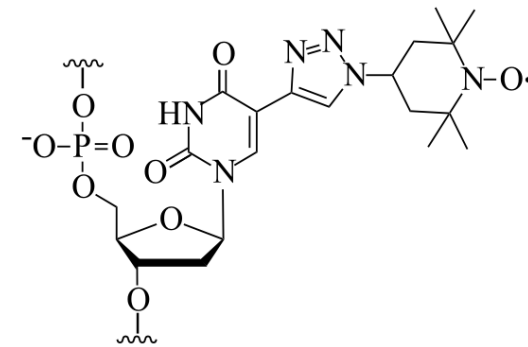
# Conception du duplex d'ADN (I)

## Critères :

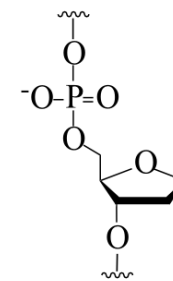
- 3 distances distinguables
- Détection d'une interaction ADN-protéine, ici coupure par une AP-  
endonucléase : détermination de la position du substrat



Y :  
Marqueur  
radicalaire

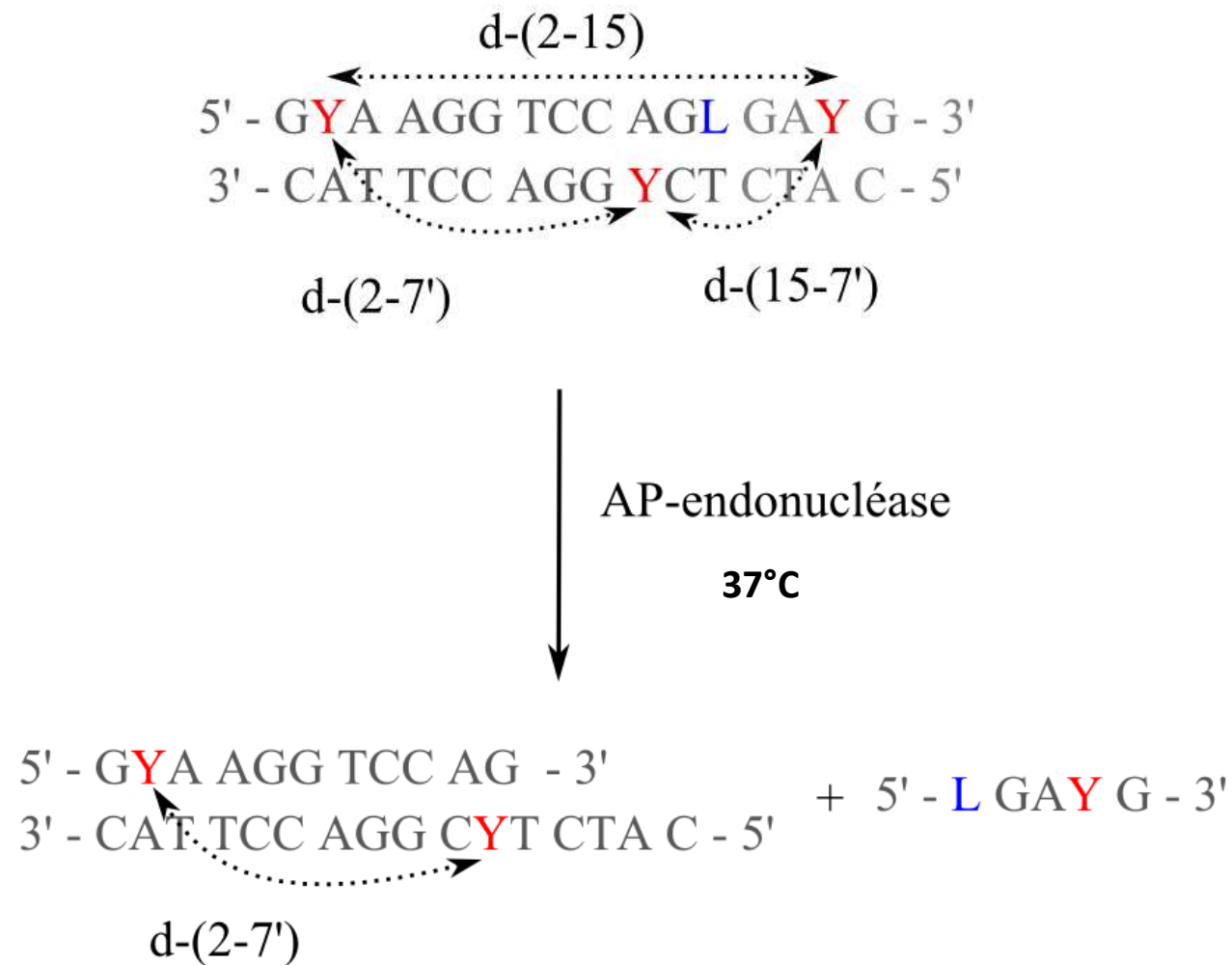


L :  
THF



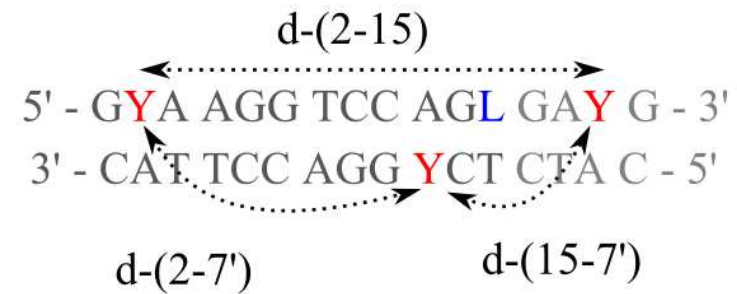
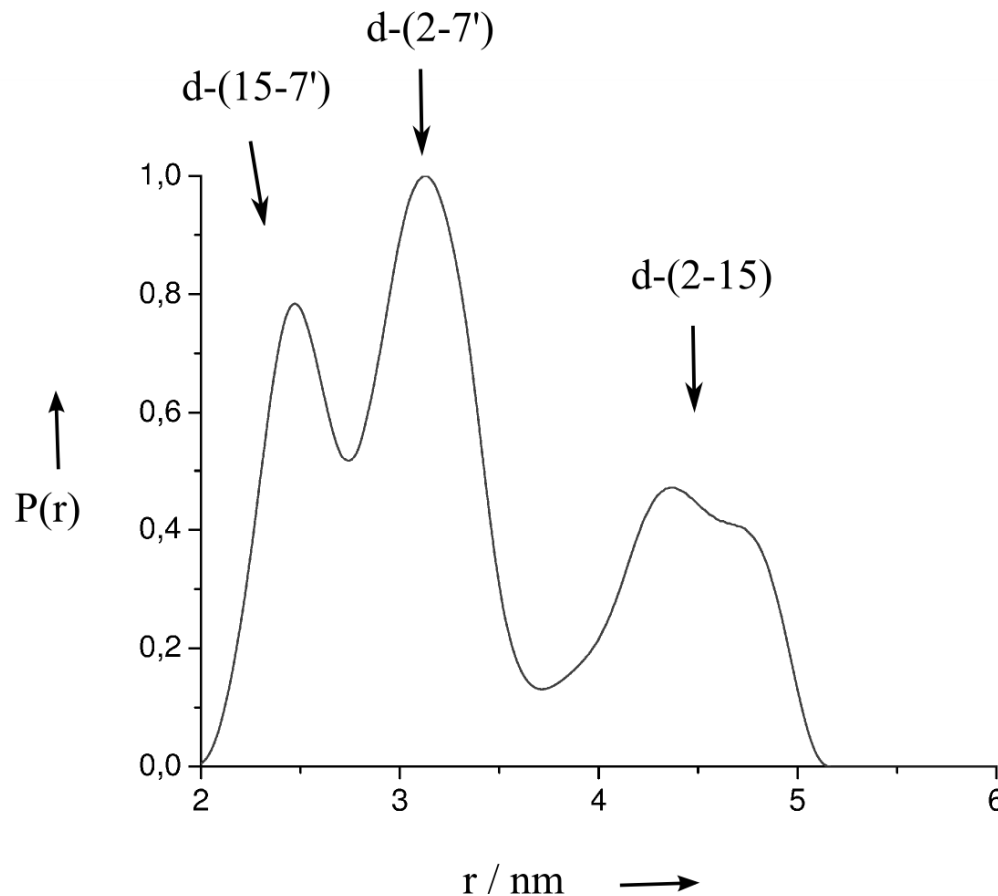
# Conception du duplex d'ADN (II)

- Position du substrat



# Résultats (I)


 Mesures des distances par RPE pulsée au sein du duplex tri-marqué

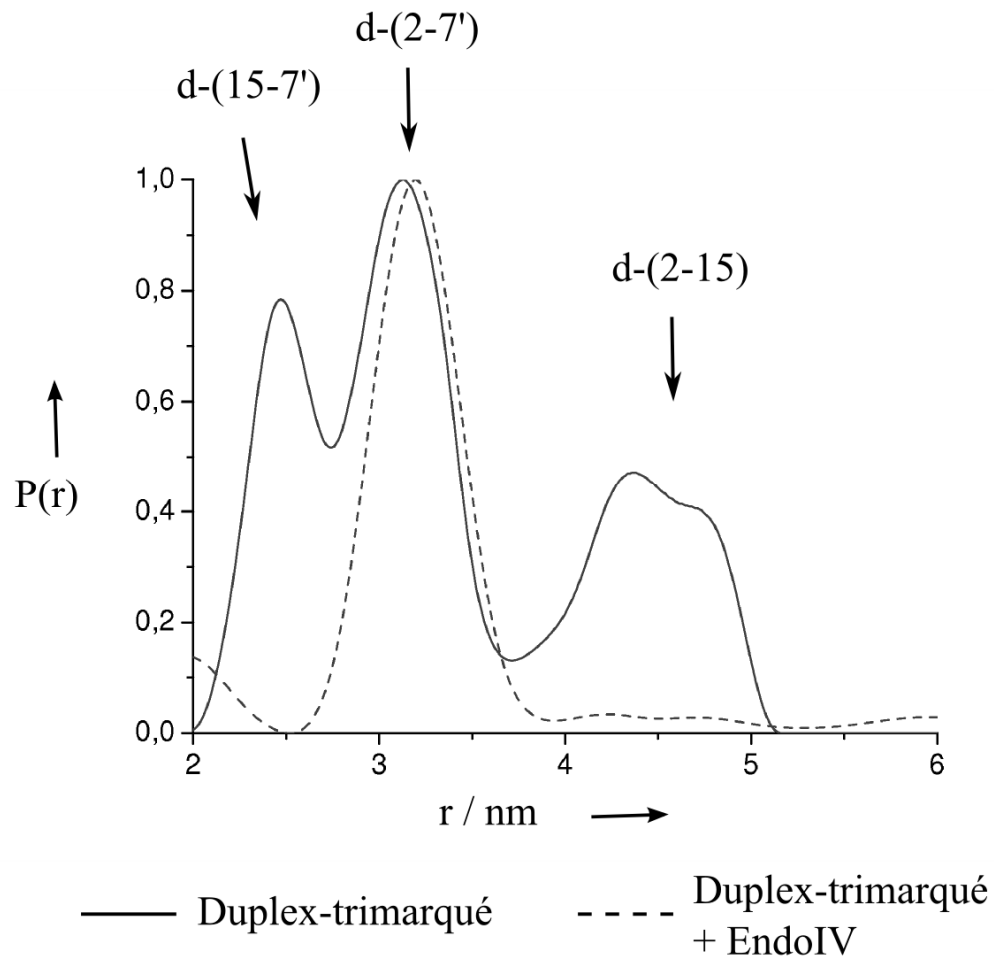


Comparaison avec les distances correspondantes sur un ADN-B non-modifié

	Mesurée (nm)	Calculée (ADN-B non modifié) (nm)
$d-(15-7')$	2,50	1,86
$d-(2-7')$	3,10	2,72
$d-(2-15)$	4,55	4,47
		4,40 (non lésé)
		4,20 (THF)

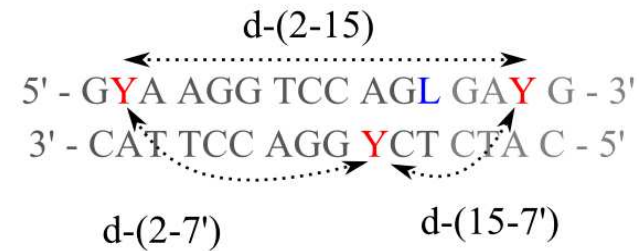
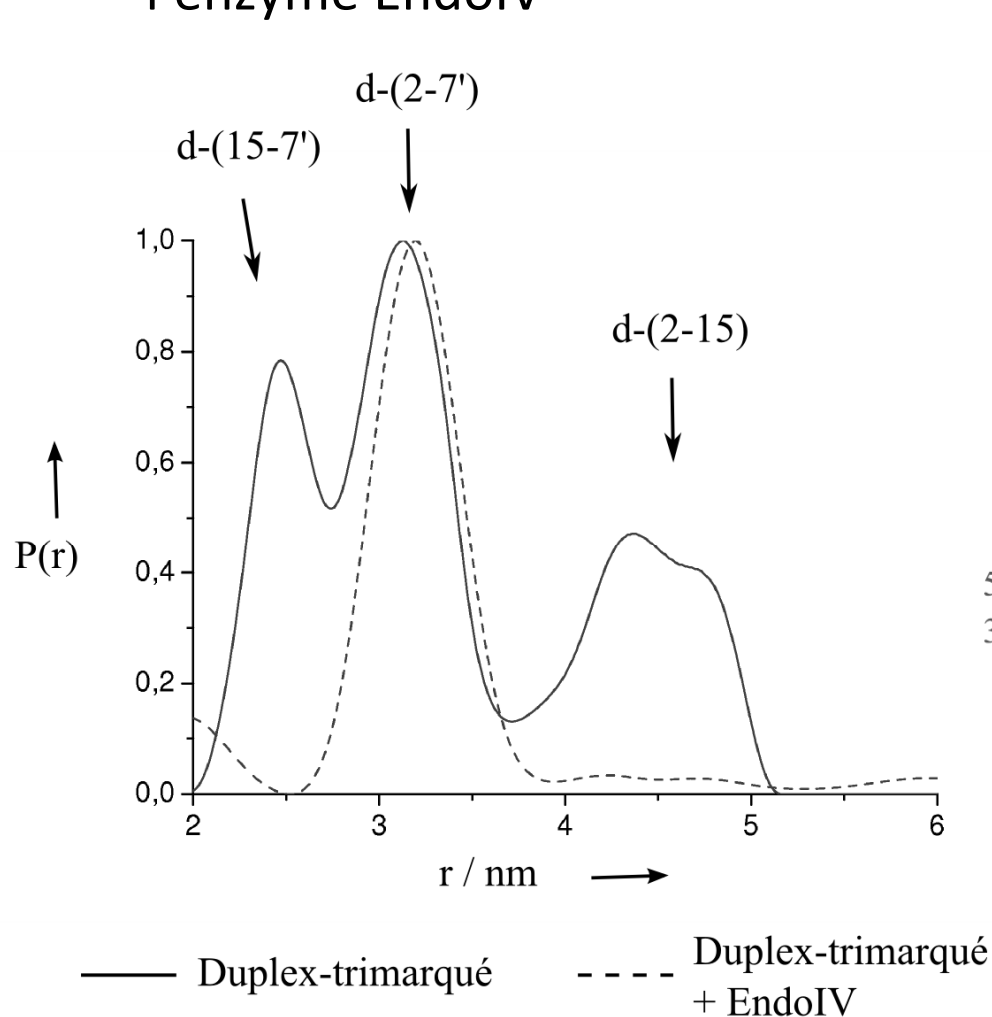
## Résultats (II)

 Mesures des distances par RPE pulsée avant/après ajout de l'enzyme EndoIV



# Résultats (II)

 Mesures des distances par RPE pulsée avant/après ajout de l'enzyme EndoIV



AP-endonucléase  
(EndoIV), 37°C



- Coupure spécifique (validation par analyse MALDI-TOF)
- Pas de gêne des 3 marqueurs pour la reconnaissance et l'activité d'EndoIV

# Conclusions & perspectives (I)



## Conclusions :

- Marquage radicalaire par chimie click **facile**, **quantitatif** et **rigide** (meilleure résolution pour le marquage de la base que du sucre)
- Mise en évidence de **changement de structure** induits par une lésion (THF et adduits platinés)
- Mesures des distances **cohérentes** avec les prédictions/modélisations
- Conception d'un système **innovant tri-marqué : une première sur l'ADN**
- Détection originale d'une **interaction ADN-protéine** (activité enzymatique) : pas de gène des marqueurs nitroxydes

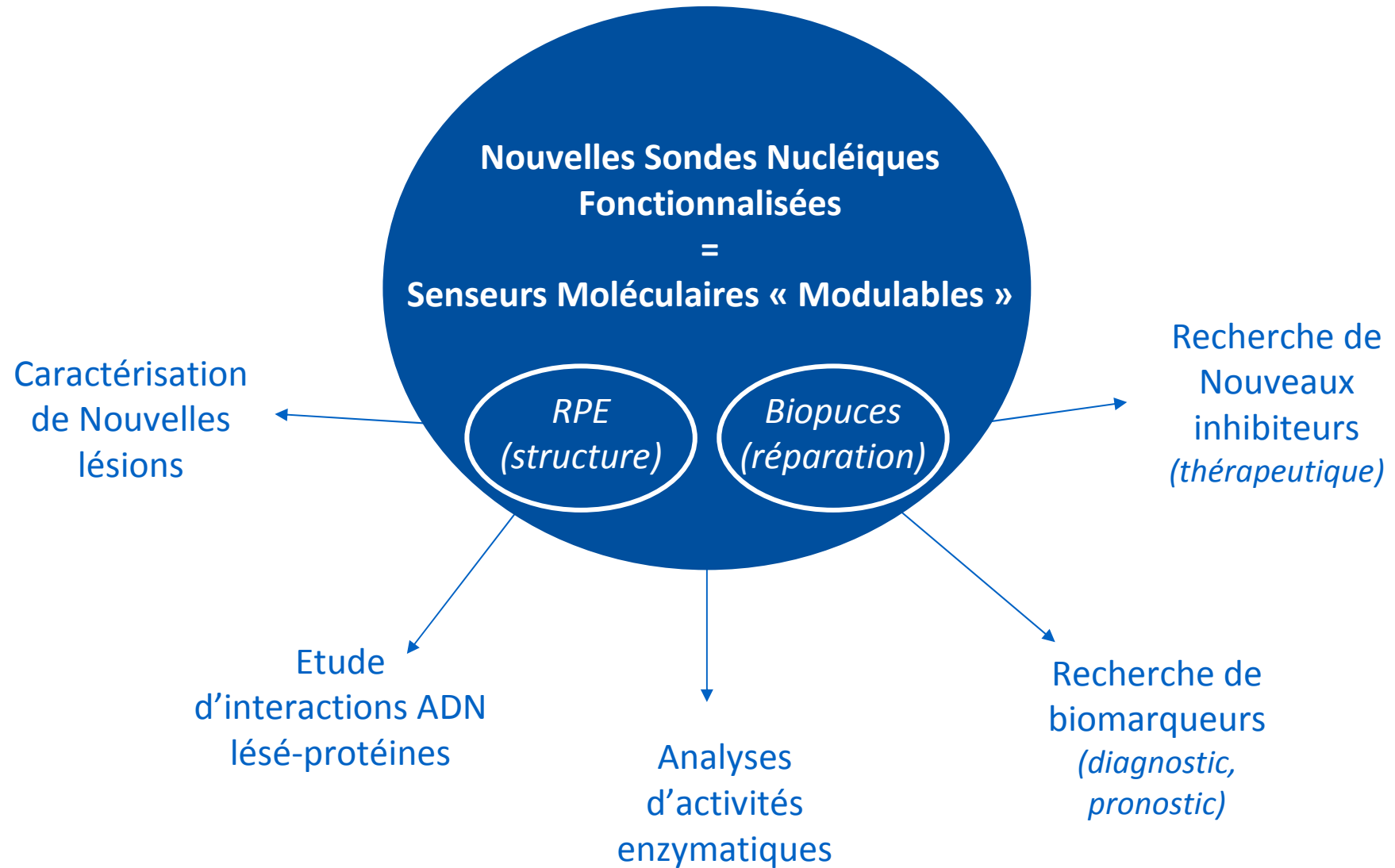
# Conclusions & perspectives (II)



## Perspectives :

- **Modélisations** en support des résultats expérimentaux
  - Améliorer les modélisations actuelles
  - Données expérimentales complémentaires
- **Développement** du système tri-marqué :
  - Application à d'autres lésions non étudiées à ce jour
  - Application à d'autres interactions ADN-protéine
  - Marquage avec de l'azote  $^{15}\text{N}$  et  $^{14}\text{N}$  : discriminer les distances à détecter (Jeschke *et al.*, 2006)

# Conclusion générale





# Remerciements

La liste est longue...



## Le LAN

- Didier Gasparutto
- Alain Favier
- Christine Saint-Pierre
- Sylvain Caillat
- Sylvie Sauvaigo
- Thierry Douki
- Zohra, Maggy, Serge, Jean, Walid, Sandra, Jean-Luc, Laure, Christophe, Viviana, Anne, François, Benoît, Coralie, Camille, Guillaume, Marisa, David, Fanny, Mathilde,...



## Puce

- Guillaume Costa
- Guillaume Nonglaton



## Cellules/extraits

- Laurent Pelletier
- Bernd Kaina



## RPE/Modélisation

- Giuseppe Sicoli
- Vincent Maurel
- Serge Gambarelli
- Yves Boulard



## CEA, INAC, SCIB



## Les « relecteurs »



## Les membres du jury

MERCI de votre attention !