



DOCTORAL THESIS OF THE UNIVERSITY OF BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
prepared at the Institute of Molecular Chemistry of the University of Bourgogne (ICMUB)

Graduate School n°553

« Carnot Pasteur »

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD)
in Chemical biology

by

Mr MITTEAUX Jérémie

Methods and tools for the study of G-quadruplex DNA and RNA in human cells

Thesis presented and defended in Dijon, on 13th December 2023

Jury composition:

Dr MILLEVOI Stefania
Dr BRITTON Sébastien
Dr AMRANE Samir
Dr DENAT Franck
Dr MONCHAUD David
Dr GOBBO Jessica

Senior INSERM researcher, CRCT (Toulouse)
Senior CNRS researcher, IPBS (Toulouse)
Associated INSERM researcher, ARNA/IECB (Bordeaux)
Professor and Director, ICMUB (Dijon)
Senior CRNS researcher, ICMUB (Dijon)
Clinical research scientist, LNC Research Centre (Dijon)

Reviewer
Reviewer
Examiner
Examiner
Supervisor
Guest

Titre : Méthodes et outils pour l'étude des G-quadruplex d'ADN et ARN en cellules humaines

Mots clés : Acides nucléiques, G-quadruplex, déstabilisateur de G4, imagerie optique, purification par affinité

Résumé : Les G-quadruplexes (ou G4s) sont des structures alternatives d'acides nucléiques (ADN et ARN) identifiées depuis 1988. Grâce à des méthodes expérimentales variées (relevant des techniques de biophysique et biochimie) d'une part, et à des outils (bio)moléculaires ciblant les G4s (*e.g.*, ligands de G4s, anticorps spécifiques des G4s) d'autre part, les rôles biologiques de ces superstructures riches en guanines (Gs) commencent à être bien compris : les G4s interviennent notamment dans la régulation de l'expression de gènes, de la réplication et de la transcription, dans le maintien de la structure des télomères, dans la réparation de l'ADN, etc. Les G4s jouent donc des rôles importants dans de nombreux processus clés de la cellule. Ces rôles, ainsi que leur forte densité génomique et transcriptomique, et les dysfonctions associées aux protéines en charge de leur résolution *in cella* (les hélicases), ont conduit à considérer les G4s comme des acteurs (et donc des cibles) important(e)s dans les maladies génétiques.

Dans ce contexte, identifier des composés chimiques capables de moduler la formation de ces structures en cellules humaines apparaît être une stratégie utile non seulement pour mieux comprendre les rôles qu'elles jouent mais aussi pour le développement de traitements potentiels de ces maladies.

Durant mon projet de doctorat, (I) j'ai tout d'abord identifié une molécule permettant de déstabiliser de façon fiable les G4s, le PhpC, et ce, par le développement de nouveaux tests *in vitro* ; (II) j'ai ensuite étudié la relation entre les G4s et les dommages à l'ADN en cellules humaines par imagerie optique *via* l'utilisation d'outils moléculaires polyvalents: les TASQs ; et finalement, (III) en combinant les applications des TASQs avec l'optimisation d'une méthode de purification par affinité des G4s d'ARN (G4RP), j'ai validé la capacité du PhpC à déstabiliser les G4s *in cella*, contribuant ainsi à la valorisation de ce composé dont les applications en recherche et en thérapie sont extrêmement prometteuses.

Title: Methods and tools for the study of G-quadruplex DNA and RNA in human cells

Keywords: Nucleic acids, G-quadruplex, G4-destabilizer, optical imaging, affinity purification

Abstract: G-quadruplexes (G4s) are nucleic acids (DNA and RNA) alternative structures identified since 1988. Thanks to a panel of experimental methods belonging to the biophysical and biochemical techniques on the one hand, and to the use of (bio)molecular G4 tools (*e.g.*, chemical G4 ligands, G4-specific antibodies) on the other hand, precise insights into the biological roles that these guanine (G)-rich high-order structures play have been gained: notably, G4s are involved in the regulation of gene expression, of replication and transcription in telomere maintenance and DNA repair, etc. G4s are thus key players in critical cellular processes. These roles, combined with both a high genomic and transcriptomic density and a series of dysfunctions related to the proteins in charge of their unwinding in cells (G4 helicases) led us to consider G4s as key effectors of (and thus, key targets for) genetic diseases.

In this context, the identification of compounds able to modulate these G4 structures in human cells appears to be a useful strategy not only for better delineating their cellular roles but also for the development of potential treatments for G4-associated diseases.

During my PhD project, (I) I identified a reliable G4-destabilizer small molecule named PhpC *via* the development of new *in vitro* assays; (II) I studied the relationship between G4s and DNA damage by optical imaging using home-made G4-specific multivalent molecular tools, the TASQs; and finally (III) combining the application of the TASQs with the optimization of a cellular G4 RNA purification method (G4RP), I validated the G4 RNA-destabilizing properties of PhpC *in cella*, thus contributing to the development of a molecule with possibly tremendous applications for G4-associated diseases.