DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE CYTOMETRIE EN FLUX POUR PRECISER LE CARACTERE PATHOGENE DES MUTANTS D'*ARMC5* DANS L'HYPERPLASIE MACRONODULAIRE BILATERALE DES SURRENALES

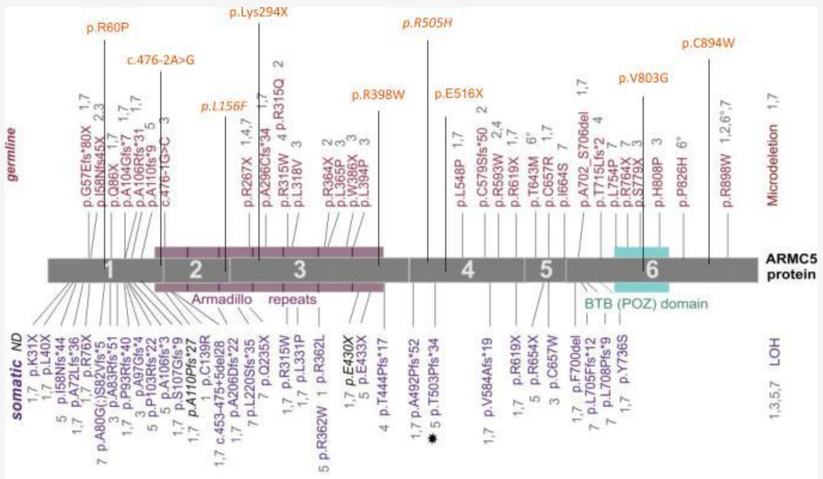
A. Vaczlavik*, L. Drougat* (Dr), S. Espiard*(Dr), K. Perlemoine*, B.Ragazzon* (Dr), M. Rizk-Rabin* (Dr) et J. Bertherat* (Pr)
***Equipe Tumeurs endocrines et signalisation, Institut Cochin, INSERM U1016** & CNRS UMR8104, Paris, France

Contexte

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale primitive des surrénales (HMBPS) est une cause d'hypercortisolisme caractérisée par le développement de nodules supra-centrimétriques de la cortico-surrénale.

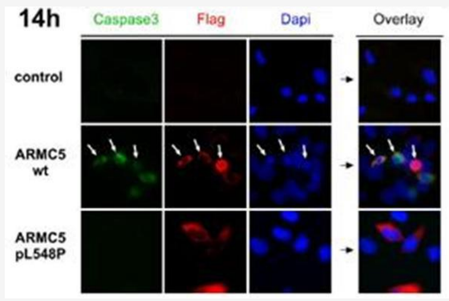
Les techniques actuelles d'analyse pan génomique ont permis l'identification de **mutations inactivatrices d'*ARMC5*** dans cette pathologie[1]. A ce jour, la prévalence des mutations chez les patients atteints d'HMPBS est de 25% [2] et plus de 70 mutations inactivatrices ont été mises en évidences [1-9] (Fig.1); le tiers de ces évènements sont des variants faux-sens dont le caractère pathogène doit être précisé à l'aide d'outils informatiques et étudié expérientalement.

Fig.1: **Altérations génétiques identifiées à ce jour dans *ARMC5*.** *D'après Drougat, EJE 2015*[3]



Les altérations génétiques, en accord avec le modèle de Knudson, ainsi que les études menées *ex vivo* (Fig.2) suggèrent le rôle suppresseur de tumeur d'*ARMC5*.

Fig.2: **Rôle pro-apototique d'*ARMC5* dans la lignée cellulaire HeLa: expériences d'immunofluorescence**. La colocalisation dans les cellules HeLa des fluorescences verte (caspase 3) et rouge (*ARMC5*-Flag) après 14h de surexpression d'*ARMC5* sauvage suggère l'implication d'*ARMC5* sauvage dans la mort cellulaire. Ce processus n'est pas observé après surexpression du variant pathogène p.L548P. *D'après Assie, NEJM, 2013* [1].



Objectif: Développer un protocole de cytométrie en flux étudiant ce phénomène d'apoptose sur cellules vivantes afin de caractériser les variants faux-sens d'*ARMC5*

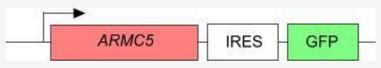
Matériel et méthodes

1.Lignée cellulaire et protocole de transfection

La technique de cytométrie en flux vise à comparer l'apoptose dans 2 populations de cellules HEK293 surexprimant soit *ARMC5* sauvage soit l'un de ses variants faux sens pathogène: p.L548P.

Le protocole de transfection transitoire utilise la Lipofectamine 2000® selon les instructions du fabricant. Les vecteurs d'expression sont étiquetés EGFP afin de repérer et d'étudier les cellules transfectées (Fig.3). 1µg d'ADN est utilisé pour chaque condition (250.000 cellules).

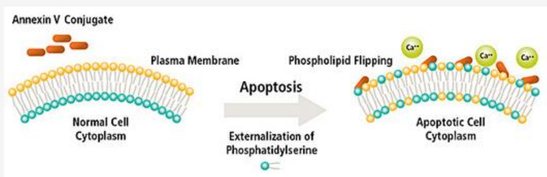
Fig.3 : Vecteur d'expression pIRES-EGFP2 *ARMC5*



2. Etude de l'apoptose

L'AnnexineV conjuguée à un fluorochrome rouge Alexa_647nm (LifeTecnologies®) est utilisé pour distinguer les cellules apoptotiques (Fig.4). Chaque échantillon de 250.000 cellules est marqué avec 0,5µl d'AnnexineV dans 50µl du tampon calcium du fabricant.

Fig.4 : Principe du marquage à l'AnnexineV. L'AnnexineV se lie aux résidus phosphatidylsérine exposés au feuillet externe de la membrane cellulaire lors de l'apoptose.



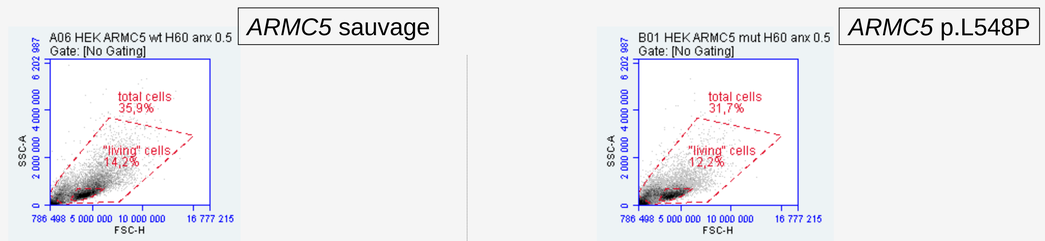
3. Acquisition des données de cytométrie en flux

Les échantillons sont lus sur un Accuri C6 (plateforme CYBIO, Institut Cochin).

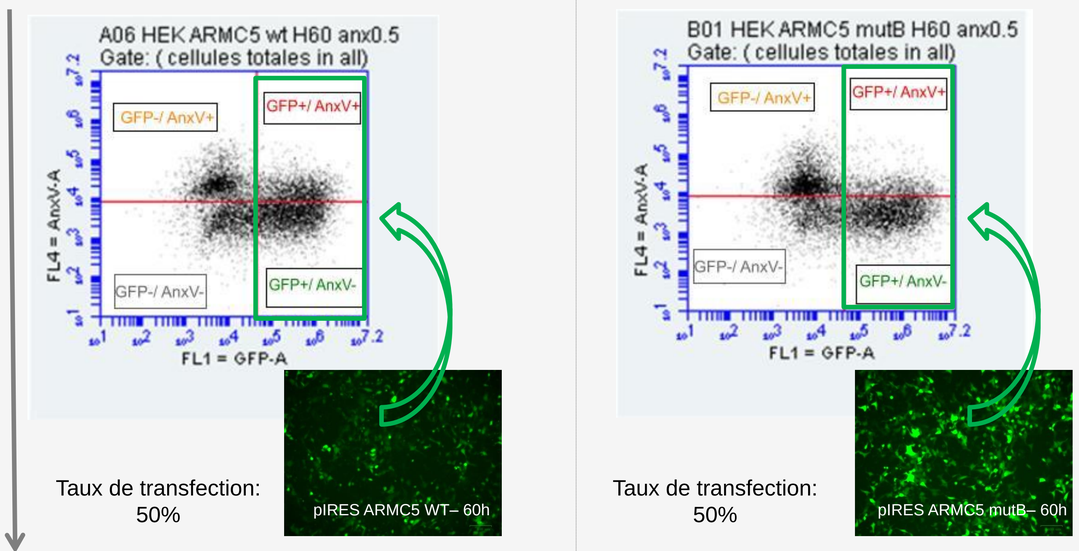
Resultats

L'apoptose dans les cellules surexprimant *ARMC5* sauvage ne survient pas avant 48h de transfection. Une différence entre les taux d'apoptose dans les cellules surexprimant *ARMC5* sauvage ou son variant pathogène p.L548P a pu être mise en évidence à 60h de la transfection.

1. Identification des cellules parmi les évènements acquis en utilisant leur taille (FSC, en abscisse) et leur granularité (SSC, en ordonnée)



2. Distribution des cellules selon leur fluorescence GFP (axe des abscisses) et leur signal AnnexinV_647nm (axe des ordonnées)



Taux de transfection: 50%

Taux de transfection: 50%

3. Calcul du taux d'apoptose dans les cellules surexprimant *ARMC5* = cellules positives à l'AnnexineV parmi les cellules exprimant la GFP

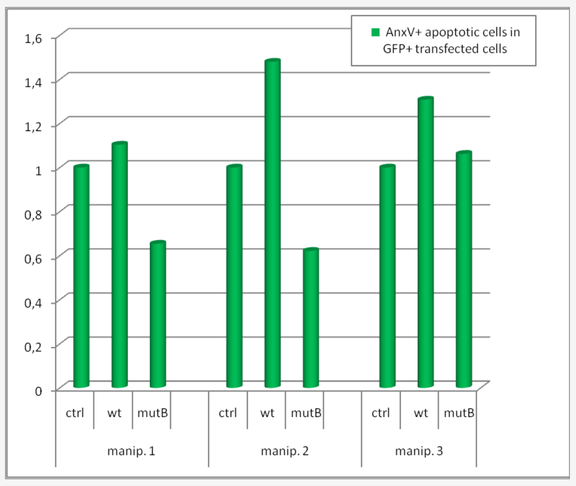
Cellules AnnexinV+ parmi les cellules *ARMC5* sauvage – GFP = **35%**

>

Cellules AnnexinV+ parmi les cellules *ARMC5* p.L548P – GFP = **21%**

Le taux d'apoptose estimé par cette approche est à plusieurs reprise supérieur dans le groupe *ARMC5* sauvage *vs ARMC5* p.L548P à 60h de leurs surexpressions respectives dans les cellules HEK293 (Fig.5).

Fig.5: **Pourcentage de cellules fixant l'AnnexineV parmi les cellules exprimant la GFP et donc soit *ARMC5* sauvage soit son mutant p.L548P.** Taux d'apoptose exprimés après standardisation avec 1 défini comme le taux d'apoptose dans des cellules exprimant un vecteur EGFP seul. Cette tendance se confirme au cours de 3 expériences indépendantes.



Conclusion

Après 60h de transfection dans les cellules HEK293, cette approche permet de mettre en évidence un défaut d'apoptose des cellules surexprimant le variant pathogène d'*ARMC5* p.L548P par rapport à celles surexprimant *ARMC5* sauvage. Cette technique doit être validée sur d'autres variants d'*ARMC5* déjà caractérisés avant d'être appliquée à de nouveaux variants faux-sens.

References

(1) Assié, G. *et al.* ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **369,** 2105–2114 (2013). (2) Espiard, S. *et al.* ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100,** E926–935 (2015). (3) Drougat, L., Espiard, S. & Bertherat, J. Genetics of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a model for early diagnosis of Cushing's syndrome? *Eur. J. Endocrinol.* **173,** M121–131 (2015). (4) Alencar, G. A. *et al.* ARMC5 mutations are a frequent cause of primary macronodular adrenal Hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E1501–1509 (2014). (5) Gagliardi, L. *et al.* ARMC5 mutations are common in familial bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E1784–1792 (2014). (6) Faucz, F. R. *et al.* Macronodular adrenal hyperplasia due to mutations in an armadillo repeat containing 5 (ARMC5) gene: a clinical and genetic investigation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99,** E1113–1119 (2014). (7) Elbelt, U. *et al.* Molecular and clinical evidence for an ARMC5 tumor syndrome: concurrent inactivating germline and somatic mutations are associated with both primary macronodular adrenal hyperplasia and meningioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100,** E119–128 (2015). (8) Zilbermint, M. *et al.* Primary Aldosteronism and ARMC5 Variants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100,** E900–909 (2015). (9) Correa, R. *et al.* The ARMC5 gene shows extensive genetic variance in primary macronodular adrenocortical hyperplasia. *Eur. J. Endocrinol.* **173,** 435–440 (2015).