

Caractérisation de la méthylation de l'ADN des corticosurrénales par digital-droplet PCR



J. Sakat^{a,d} (M.), M. Neou^a (M.), S. Diry^a (Mlle), J. Nectoux^b (Dr), S. Garinet^a (M.), F. Letourneur^c (Dr), S. Gaujoux^d (Pr), B. Dousset^d (Pr), J. Bertherat^a (Pr), G. Assie^a (Pr)



^a INSERM U1016 Institut Cochin, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris., Paris, FRANCE ; ^b Laboratoire de Biologie moléculaire, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris., Paris, FRANCE ; ^c Laboratoire de Genomique, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris., Paris, FRANCE ; ^d Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris., Paris, FRANCE

* julien.sakat@inserm.fr L'auteur n'a pas transmis de conflit d'intérêt.



Abstract

Introduction : La méthylation de l'ADN est un facteur pronostique majeur des corticosurrénales. L'objectif est de mettre au point une mesure ciblée de la méthylation de l'ADN par digital-droplets-PCR (ddPCR), car peu coûteuse et facile à utiliser en routine.

Méthode : Le dessin des sondes de ddPCR s'appuie sur l'analyse de séquences de 14 régions riches en CpG, séquencées en NGS après traitement par bisulfite (les cytosines non méthylées sont transformées en thymidine, alors que les cytosines méthylées restent des cytosines). La ddPCR est réalisée sur QX100 (BIORAD). L'analyse Bio-informatique programmée en R.

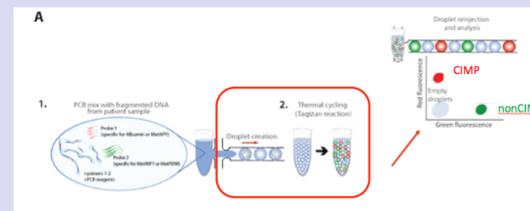
Résultats : Après séquençage NGS, l'analyse des brins d'ADN (allèles) montre que le statut méthyl d'un CpG n'est pas forcément lié à celui des CpG suivants sur le même brin. Hors, pour la ddPCR il est essentiel de trouver des CpG consécutifs qui varient toujours ensemble sur un même brin, car on utilise deux sondes, l'une spécifique des allèles méthylés, l'autre des allèles non méthylés. A partir des données de NGS, nous avons pu identifier des régions sur les 14 îlots CpG avec une co-variation de la méthylation des CpG supérieures à 70%. Un deuxième critère de sélection pour créer les sondes est la valeur discriminante entre les groupes hyperméthylés et non hyperméthylés. Nous avons identifié des sondes avec une discrimination supérieure à 60%. Sur l'ensemble des 374 sondes de 15 à 29 bases possibles, 4 sondes vérifient ces deux critères. Seul trois sondes sur quatre ont permis d'avoir des résultats. La corrélation entre les résultats de ddPCR et de MS-MLPA (technique de référence) était de 0.83, pour une p-value de 2.2 E-16.

Conclusion : Cette analyse bio-informatique montre qu'il est possible de dessiner des sondes de ddPCR analysant le statut de méthylation de régions spécifiques du genome, et ouvre la voie d'un test de méthylation des corticosurrénales en PCR utilisable en routine.

La digital-droplets PCR

La ddPCR est une technique de quantitative PCR :

- elle permet une meilleure sensibilité que la qPCR
- les réactions de PCR sont indépendantes et ont lieu en émulsion
- chaque gouttelette est lue individuellement et sa fluorescence mesurée
- On obtient la quantification absolue du nombre de gouttelettes contenant des copies hyperméthylées, et celles contenant les copies non hyperméthylées.



Bisulfite de l'ADN



C'est une réaction chimique agissant sur un double brin d'ADN et modifie sa séquence.

- Les cytosines méthylées (C^m) demeurent inchangées dans la séquence des bases
- Les cytosines non méthylées (C) sont transformées en Uracile (U). Lors de l'amplification ultérieure, on obtient des séquences où les C sont transformées en Thymidine (T).

- Après bisulfite la mesure de la méthylation de l'ADN se calcul comme la proportion de cytosines restantes.

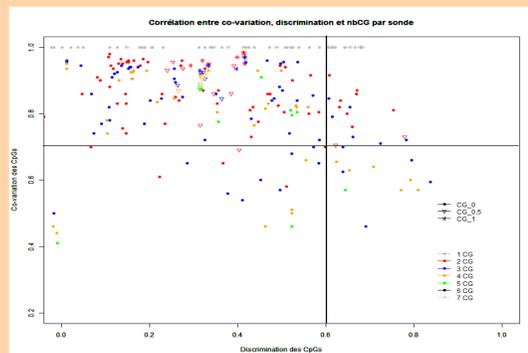
$$\text{Méthyl} = \frac{\text{Nombre de C}}{\text{Nombre de C} + \text{T}}$$

Dessin des sondes de ddPCR

Pour mettre au point nos sondes fluorescentes nous avons utilisé des données de séquençage par NGS ciblé d'ADN bisulfite de corticosurrénales. Le séquençage couvrait 14 régions riches en CpG ou îlots CpG.

- pour chaque séquence possible de sonde (15 à 29 bases) parmi les séquences des îlots CpG (374 sondes possible) nous avons étudié la co-variation du statut de méthylation des CpG au sein de la sonde. En effet une sonde reconnaît un allèle méthylé (C^mxC^mxC^m) et une autre sonde reconnaît le même allèle non méthylé (CxCxC). Il faut donc pour optimiser la probabilité d'hybridation des sondes, que tous les CpG au sein d'un brin d'ADN reconnu par une paire de sonde aient le même statut de méthylation et que ces statuts de méthylation varient ensemble.

- pour chaque séquence de sonde possible, nous avons également calculé son pouvoir discriminant entre les groupes hyperméthylés (CIMP) et non hyperméthylés (nonCIMP). C'est-à-dire la capacité d'une sonde (association de CpG) à représenter la méthylation globale de l'ADN. La référence était les valeurs de méthylation de MS-MLPA



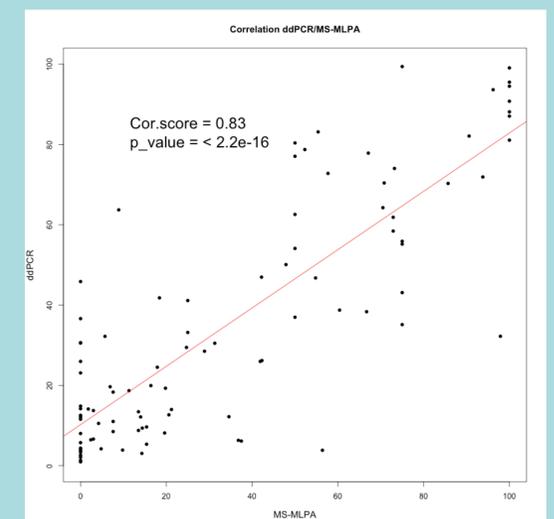
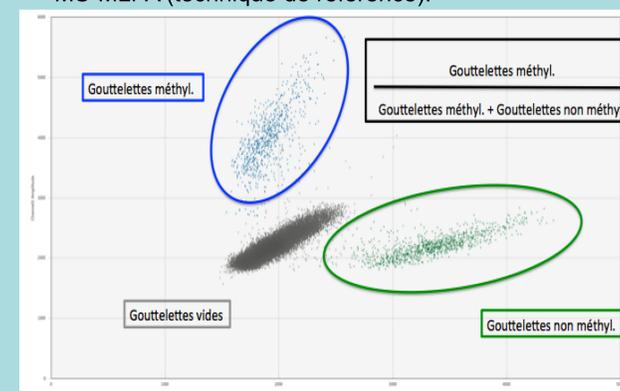
- Figure représentant pour les 374 sondes, les valeurs de co-variation en ordonnée et les valeurs de discrimination en abscisse.

- Nous avons sélectionné les sondes avec une co-variation supérieure ou égale à 70% et une discrimination supérieure ou égale à 60% → 29 sondes.

- Parmi les 29 sondes nous avons sélectionné 4 sondes présentes sur 4 chromosomes différents pour augmenter la couverture du design.

Résultats de ddPCR

Seul 3 sondes sur 4 avaient une hybridation et une émission de fluorescence satisfaisante. On obtient une bonne corrélation entre les résultats de ddPCR et de MS-MLPA (technique de référence).



Conclusions

- Nous avons démontré la preuve de la faisabilité de la ddPCR comme méthode de mesure ciblée de la méthylation de l'ADN des corticosurrénales.
- Nous avons proposé une méthode innovante pour dessiner des sondes de PCR quantitative en utilisant les données de séquençage et l'analyse bio-informatique.
- La caractérisation de la méthylation de l'ADN a un intérêt pronostique chez les ACC.
- La ddPCR est une technologie facilement reproductible et à faible coût, pertinente pour le transfert à la pratique clinique courante