

Détermination du Statut d'Hyperméthylation des Corticosurréalomes par Séquençage Haut Débit

B. de La Villéon^{a,b,c}, M. Neou^a, A. Jouinot^{a,d}, W. Luscap^a, F. Letourneur^e, K. Perlemoine^a, F. Rene-Corail^a, B. Doussel^b, S. Gaujoux^{a,b}, J. Bertherat^{a,d}, G. Assié^{a,d}

a. Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS 8104, Université Paris Descartes ; b. Service de chirurgie digestive et endocrinienne, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris ; c. Service de chirurgie digestive, Hôpital d'Instruction des Armées du Val de Grâce, Paris ; d. Service d'Endocrinologie, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris ; e. Institut Cochin, plate-forme de séquençage et génomique

Introduction

- Les corticosurréalomes (CCS) sont de mauvais pronostic
- La méthylation a un rôle clef dans la tumorigénèse¹
- La méthylation des îlots CpG est un marqueur pronostique^{2,3,4}
- La méthylation est mesurable par des méthodes complexes et/ou indirecte⁵

Patients, Matériel et Méthodes

- 51 CCS étudiés par puce méthylome (Illumina 27K)²
- 2 groupes pronostiques identifiés en fonction du statut de méthylation
 - Non-CIMP (Non Hyperméthylé)
 - CIMP (CIMP-Low : faiblement hyperméthylé / CIMP-High : fortement hyperméthylé)
- ADN tumoral traité par bisulfite puis amplifié (amorces bisulfite-spécifique et méthyl-insensibles créées par MethPrimmer)
- Séquençage Haut Débit Ciblé sur les promoteurs d'anti-oncogènes
- Codage d'un aligneur spécifique et alignement des séquences
- Test du protocole sur 5 échantillons tumoraux

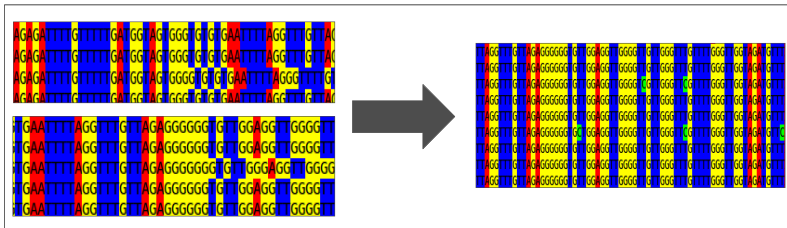


Figure 2 – L'aligneur spécifique permet de récupérer le décalage de cadre de lecture – Après traitement des données seules les Cytosines méthylées diffèrent des Thymines remplaçant les Cytosines non méthylées

Discussion

- La génomique occupe une place diagnostique et pronostique de plus en plus importante en cancérologie
- Le séquençage ciblé haut débit permet d'obtenir les mêmes résultats que la méthode de référence avec un coût et un temps moindre
- Possibilité d'amélioration de l'analyse : optimisation des amorces⁶, choix d'une enzyme spécifique⁷, couplage à d'autres analyses moléculaires^{2,3}
- Il reste à concevoir un outil unique regroupant l'étude des mutations, des anomalies chromosomiques et de la méthylation par NGS ciblé

Références

- 1 - Jones PA et al. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3: 415-28.
- 2 - Assié G et al. The 'omics' of adrenocortical tumours for personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10: 215-228.
- 3 - Assié G et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet.* 2014; 46: 607-612.
- 4 - Barreau O et al. Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas. *J.CEM.* 2013; 98: 174-84.
- 5 - Lee E-J et al. Analyzing the cancer methylome through targeted bisulfite sequencing. *Cancer Lett.* 2013 Nov 1; 340: 171-178.
- 6 - Fusco A, et al. Disclosing bias in bisulfite assay: MethPrimers underestimate high DNA methylation. *PLoS One.* 2015 Jan; 10: e0118318.
- 7 - Millar D et al. A polymerase engineered for bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res.* Accepted July 2015.

Objectif

- Montrer que la méthylation est mesurable par Séquençage Haut débit Ciblé **Direct**

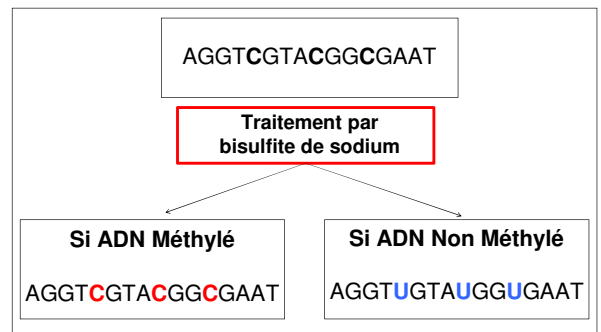


Figure 1 – Résultat du traitement d'une séquence d'ADN par bisulfite selon son statut de méthylation

Résultats

- 55 couples d'amorces bisulfite-spécifiques in silico
- 8 couples d'amorces permettent l'amplification des séquences cibles avec information de méthylation différentielle
- Dans 50% des séquences alignées, l'aligneur spécifique codé lisse un décalage de cadre de lecture
- L'information de méthylation obtenue pour l'ensemble d'un échantillon est équivalente à celle obtenue par la puce méthylome

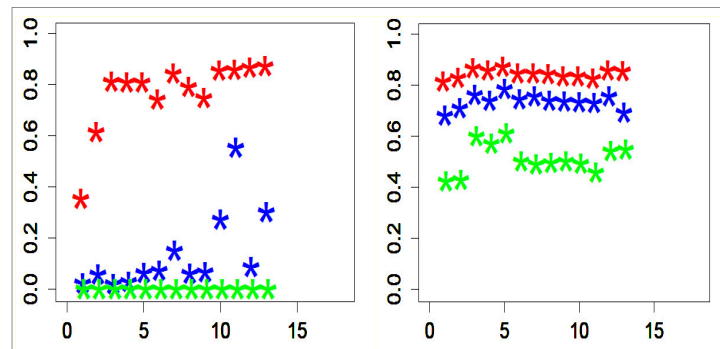


Figure 3 – Amorces 6 et 8 explorant les CpG des échantillon H/L1/N1 – la classification est retrouvée par NGS : Fortement Hyperméthylé en rouge, Faiblement Hyperméthylé en bleu et Non Hyperméthylé en vert

Conclusion

- Méthylation analysable par séquençage ciblé haut débit **direct** : preuve établie.
- Création d'un outil moléculaire diagnostique et pronostique en cours analysant la méthylation, les anomalies chromosomiques et les mutations.
- Transfert de la recherche en génomique à la routine clinique. Outil fiable, peu coûteux, rapide et performant