



HAL
open science

Analyse de la méthylation d'ADN sur puces : étude comparative d'échantillons de tissus congelés et tissus FFPE

Badreddine Mohand Oumoussa, Abiba Doukani, Cassandra Gaspar, Franck Bielle

► To cite this version:

Badreddine Mohand Oumoussa, Abiba Doukani, Cassandra Gaspar, Franck Bielle. Analyse de la méthylation d'ADN sur puces : étude comparative d'échantillons de tissus congelés et tissus FFPE. 10eme Assises de Génétique Humaine et Médicale, Jan 2020, Tours, France. hal-02539624

HAL Id: hal-02539624

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02539624>

Submitted on 10 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

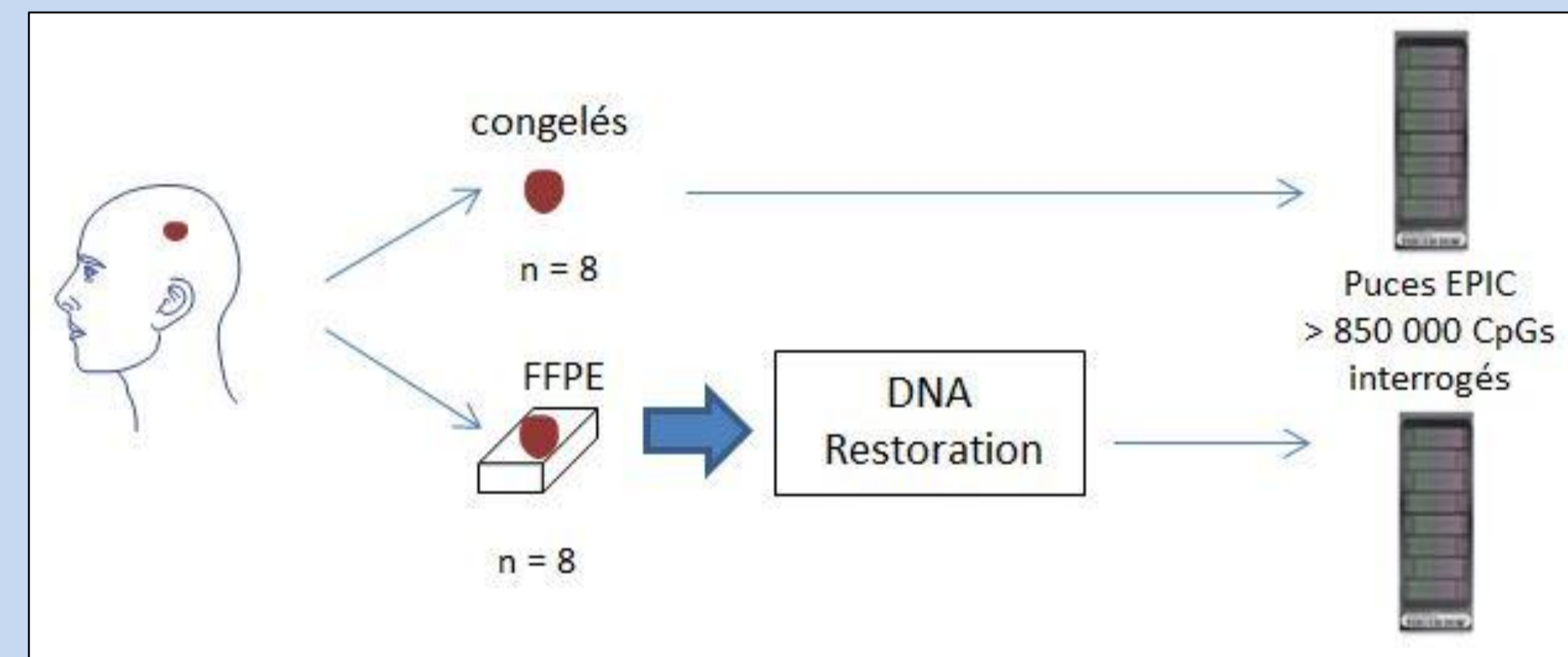
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Introduction

La méthode d'inclusion dans la paraffine et la fixation dans le formol (FFPE) représente un moyen incontournable de conservation des biopsies. L'étude du méthylome à partir des ADN extraits de tissus FFPE, souvent dégradés en raison des conditions de fixation et d'inclusion des tissus, reste un défi.

Plusieurs techniques d'analyse de méthylation ont été développées pour mesurer les niveaux de méthylation des sites CpG. Cependant la technologie de BeadArray conçue par Illumina reste la méthode la plus largement utilisée afin d'interroger les sites de méthylation à l'échelle du génome. En 2015, Illumina a commercialisé la nouvelle puce Infinium Methylation EPIC (850K) permettant d'analyser 850 000 sites de méthylation répartis sur l'ensemble du génome humain.

Afin de rendre l'ADN extrait de les biopsies FFPE compatible avec les puces Illumina, une optimisation de protocole a été introduite permettant d'améliorer la qualité des ADN FFPE et par conséquent la reproductibilité de la méthode. Il s'agit de l'étape de « restauration » dont le but est de réparer les ADN et générer des fragments de tailles appropriées pour l'étape d'analyse par puces EPIC.



Dans cette étude pilote, nous avons comparé par puce Illumina EPIC (850 K), le méthylome de 8 paires de tumeurs cérébrales congelées et en blocs de paraffine.

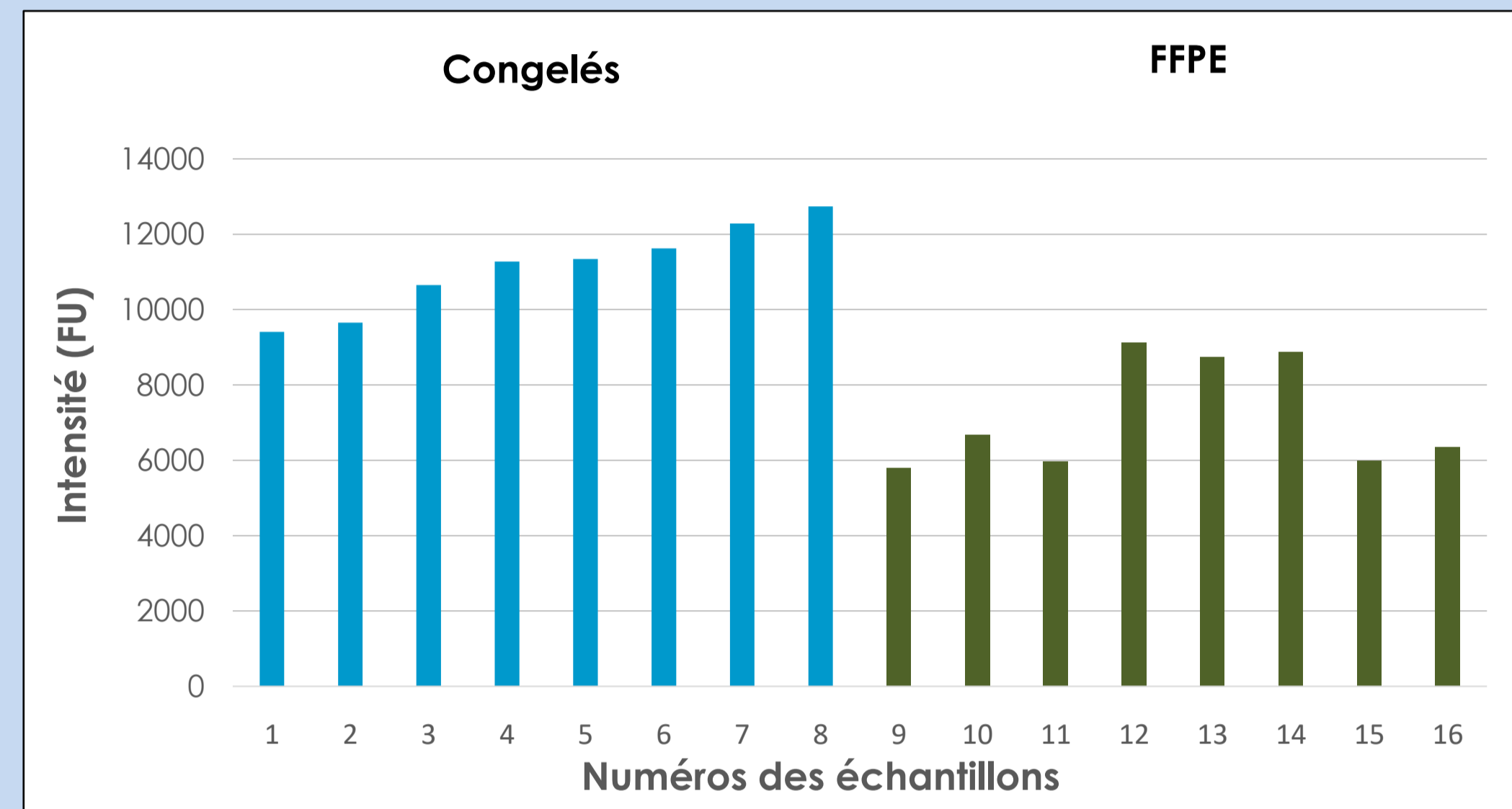
Méthodes

Les niveaux de méthylation des sites CpG sont mesurés par génotypage quantitatif grâce aux puces Illumina Infinium Methylation EPIC (850K) après une étape de conversion bisulfite. Le protocole est réalisé en 5 jours, à partir d'une quantité d'ADN génomique non amplifié de 500 ng mesurée par dosage fluorimétrique.

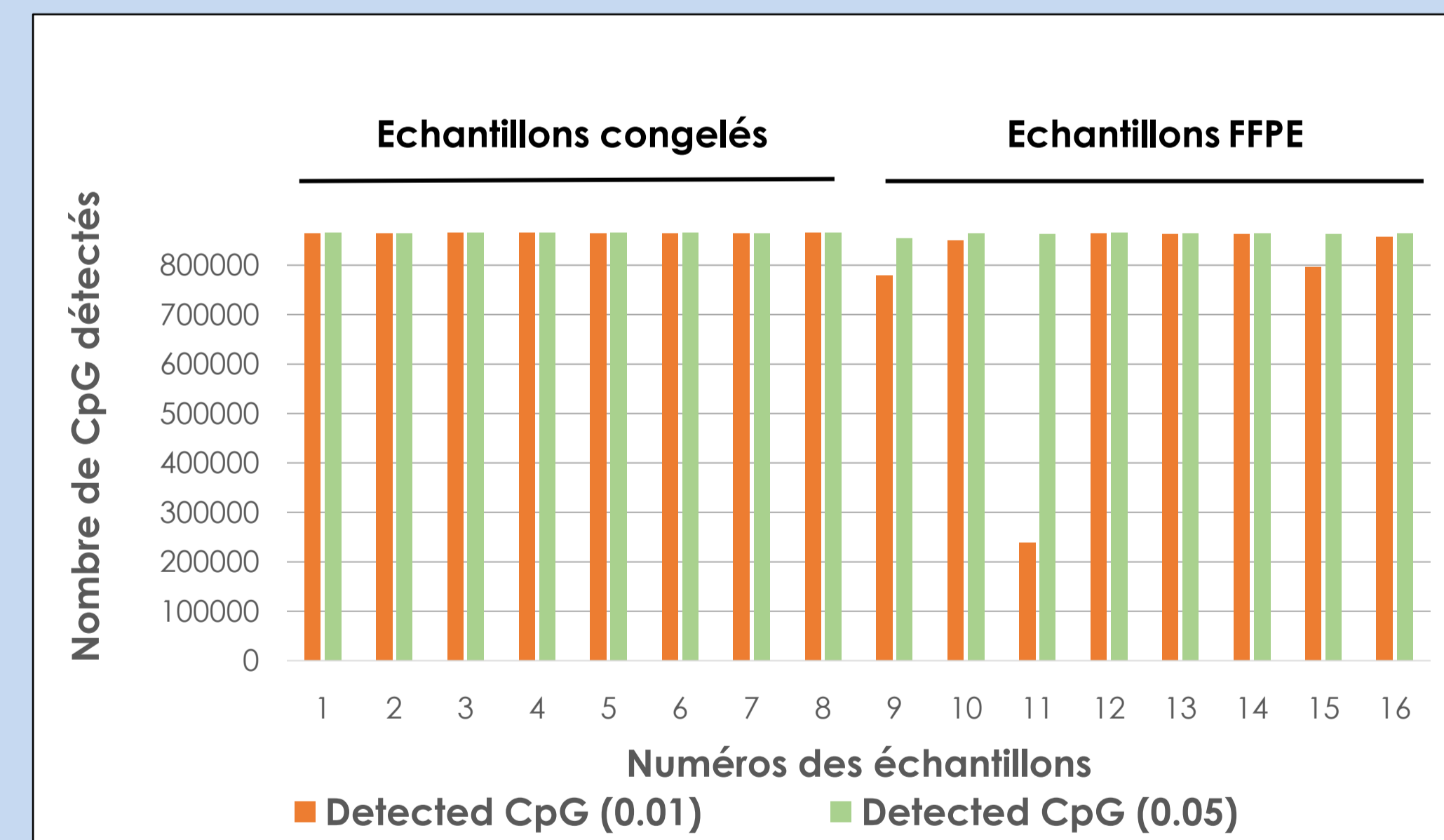
Dans le cas des échantillons FFPE, deux étapes supplémentaires sont ajoutées, le contrôle qualité des ADN par qPCR et une étape de restauration.

Résultats

L'ADN dégradé des échantillons FFPE se traduit par des intensités inférieures, cependant celles-ci restent acceptables pour l'analyse de la méthylation. Cela est corrélé avec un pourcentage de sites CpGs correctement détectés (P value < 0,01) égal en moyenne à 99% (99,85 %-99,90 %) dans le cas tissus congelés et à 96 % (89,85 % - 99,78 %) pour les tissus FFPE.



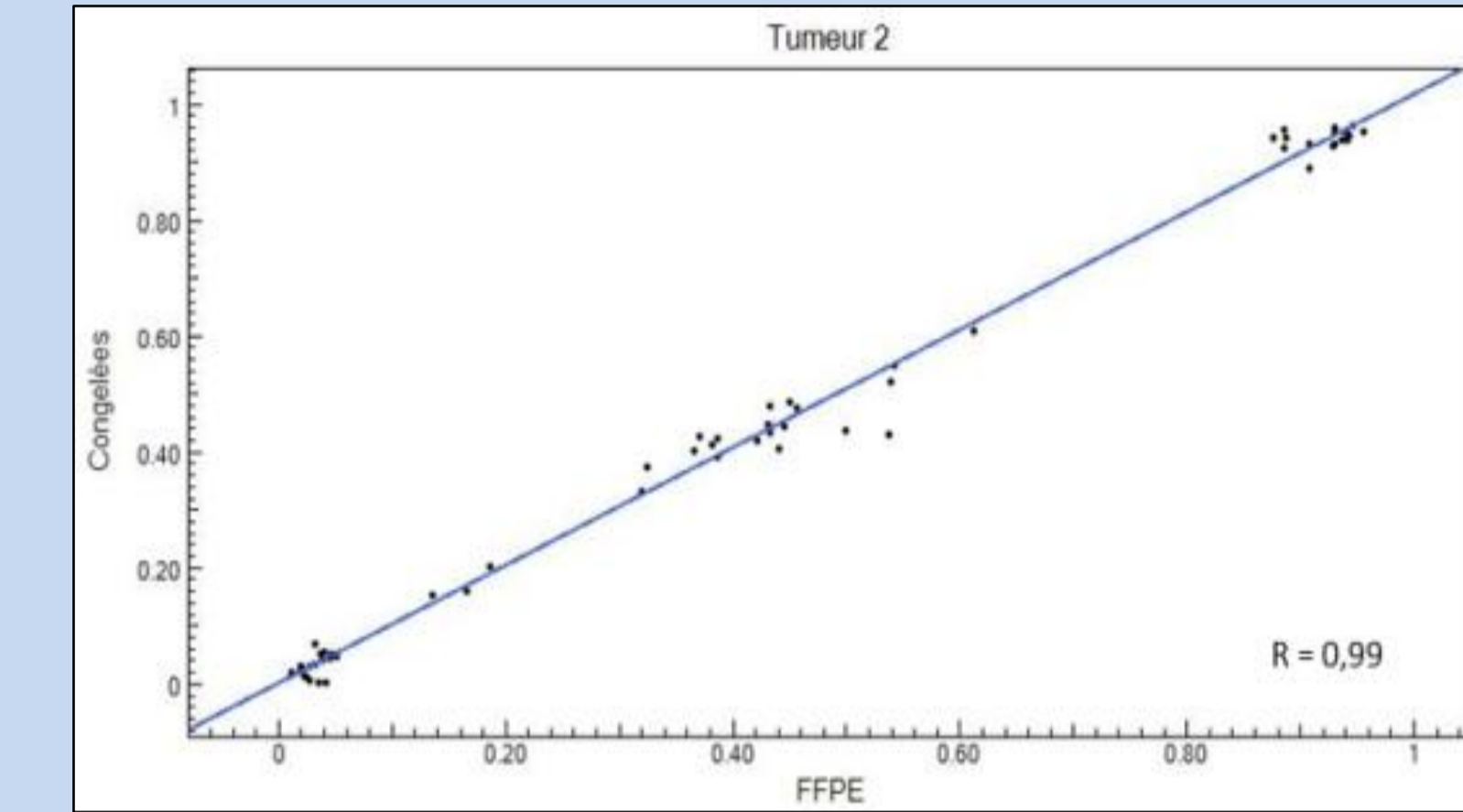
Histogramme des intensités mesurées des échantillons congelés et FFPE



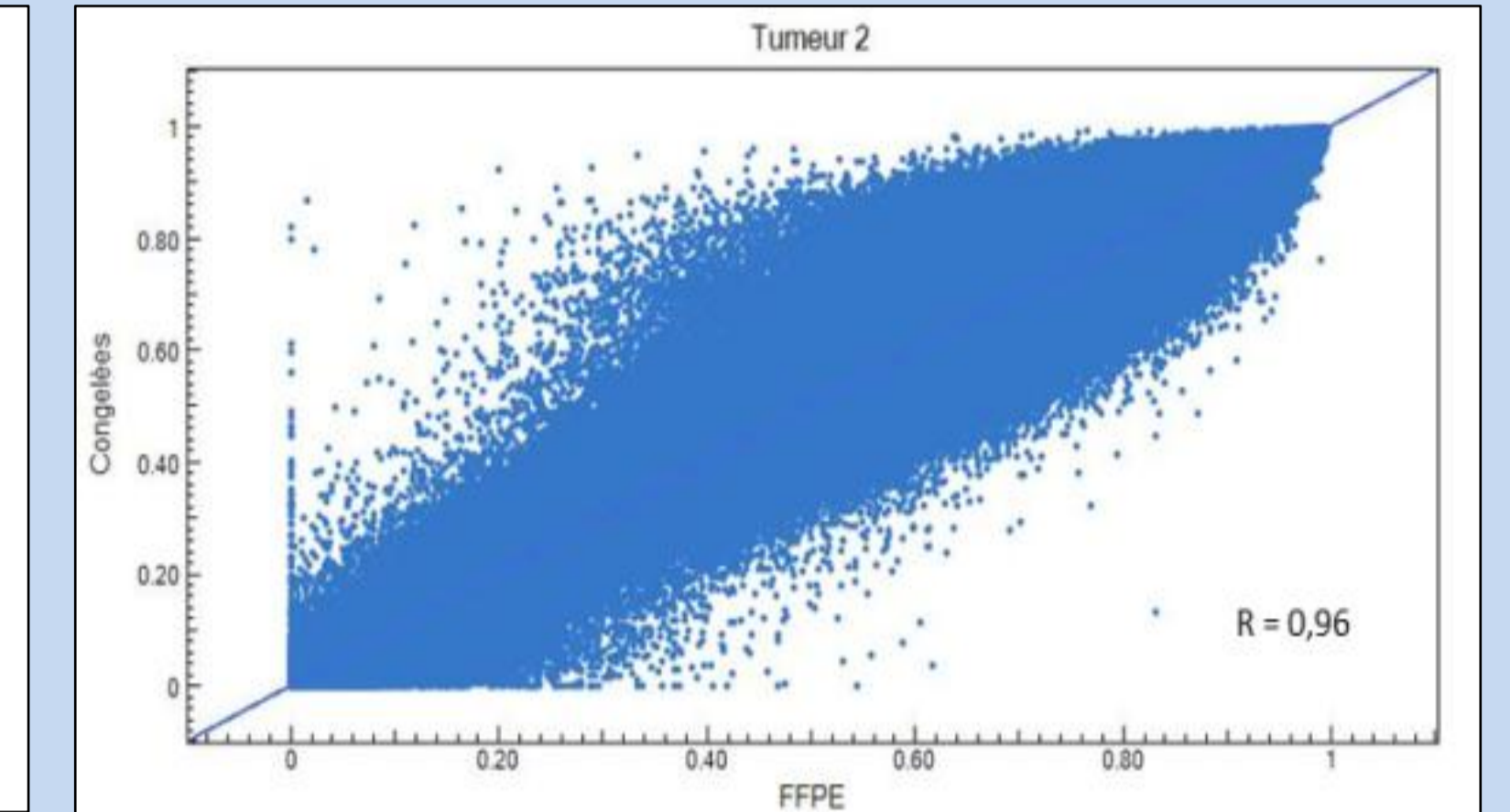
Histogramme du nombre de CpG détectés des échantillons congelés et FFPE

Le taux de détection (% détection CpGs) des sondes est défini par le pourcentage de détection des 865 000 sondes de chaque échantillon dont le signal est discernable du bruit de fond avec une P-value à 0,01

La comparaison des valeurs β des sondes de polymorphisme SNP montre une bonne corrélation entre individus appariés avec un coefficient de corrélation moyen $R = 0.96$ (0.93 -0.99). Cette comparaison a aussi permis de valider l'appartenance au même sexe des échantillons appariés sur la base des intensités des sondes qui s'hybrident sur le chromosome Y.

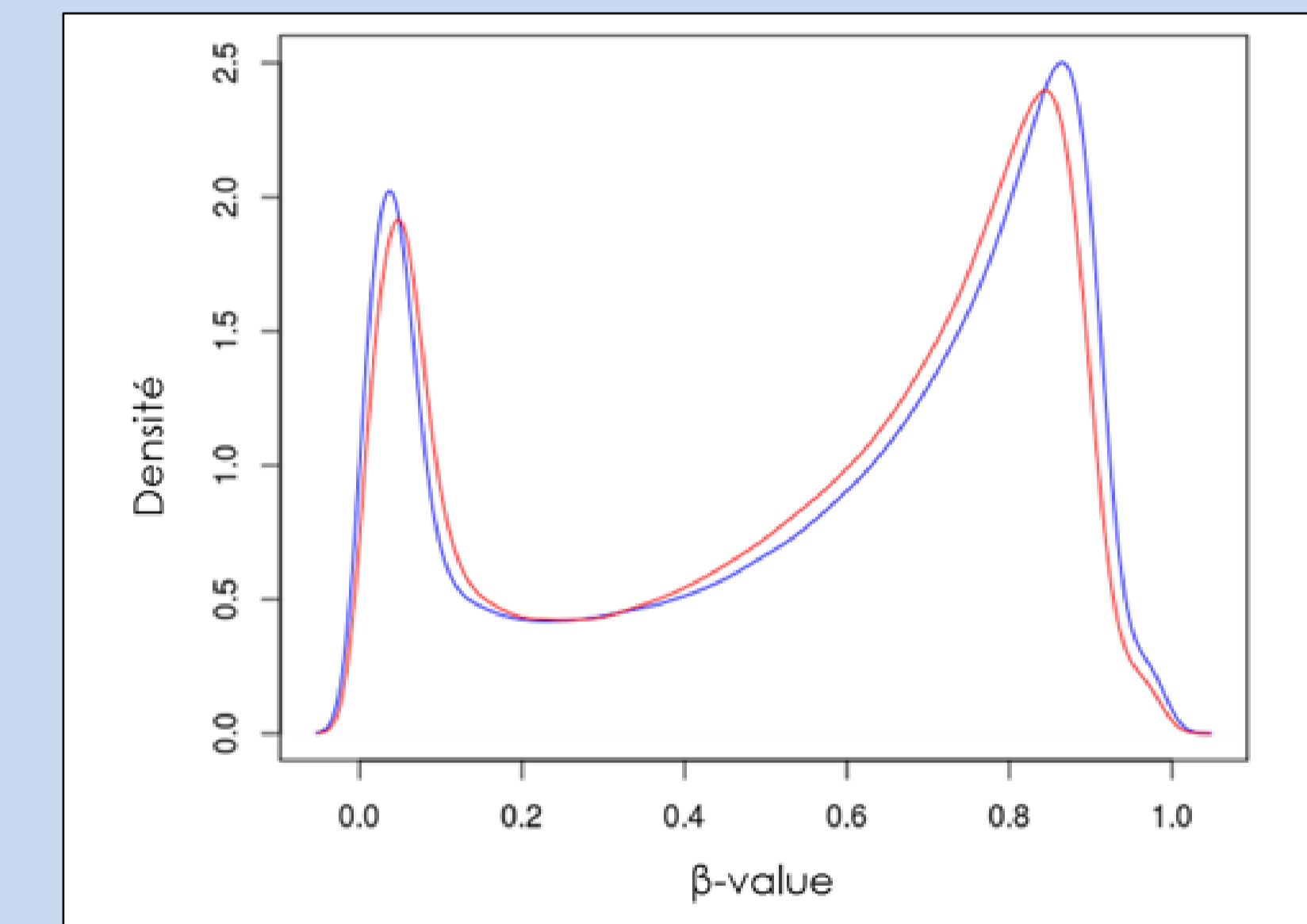


Corrélation de la β value de la tumeur 2 congelée et FFPE (données filtrées sur les SNPs)



Corrélation de la β value de la tumeur 2 congelée et FFPE (données filtrées sur les CpGs)

Une distribution similaire des valeurs β entre les tissus congelés et FFPE reflète une répartition des niveaux de méthylation comparable entre ces deux types de tissus.



Distribution des valeurs β de 8 échantillons FFPE (Rouge) et 8 échantillons congelés (Bleu)

La valeur β correspond au niveau de méthylation des sites CpGs

Conclusion

Ce projet collaboratif validé par le Dr Franck Bielle montre que les tissus FFPE donnent des résultats comparables aux tissus congelés. Ces résultats suggèrent que les tissus FFPE peuvent être utilisés, après la réalisation du protocole de restauration d'Illumina, dans l'analyse de la méthylation des tumeurs cérébrales par puces EPIC. Ainsi, la plateforme P3S propose en prestation l'analyse de la méthylation à partir d'ADN de tissu FFPE.