



HAL
open science

Modification d'une phase stationnaire de carbone graphitique poreux (PGC) pour l'analyse robuste à haut débit de marqueurs épigénétiques chez l'Homme par HPLC-MS/MS

Quentin Vandoolaeghe, Poppy Evenden, Isabelle Vaudorne, Valérie Bouchart, Matthieu Meryet-Figuère, Pierre Lebailly, Raphaël Delépée

► To cite this version:

Quentin Vandoolaeghe, Poppy Evenden, Isabelle Vaudorne, Valérie Bouchart, Matthieu Meryet-Figuère, et al.. Modification d'une phase stationnaire de carbone graphitique poreux (PGC) pour l'analyse robuste à haut débit de marqueurs épigénétiques chez l'Homme par HPLC-MS/MS. 15ème Congrès de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, Mar 2023, Paris, France. hal-04056052

HAL Id: hal-04056052

<https://normandie-univ.hal.science/hal-04056052>

Submitted on 3 Apr 2023

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.

Modification d'une phase stationnaire de carbone graphitique poreux (PGC) pour l'analyse robuste à haut débit de marqueurs épigénétiques chez l'Homme par HPLC-MS/MS.

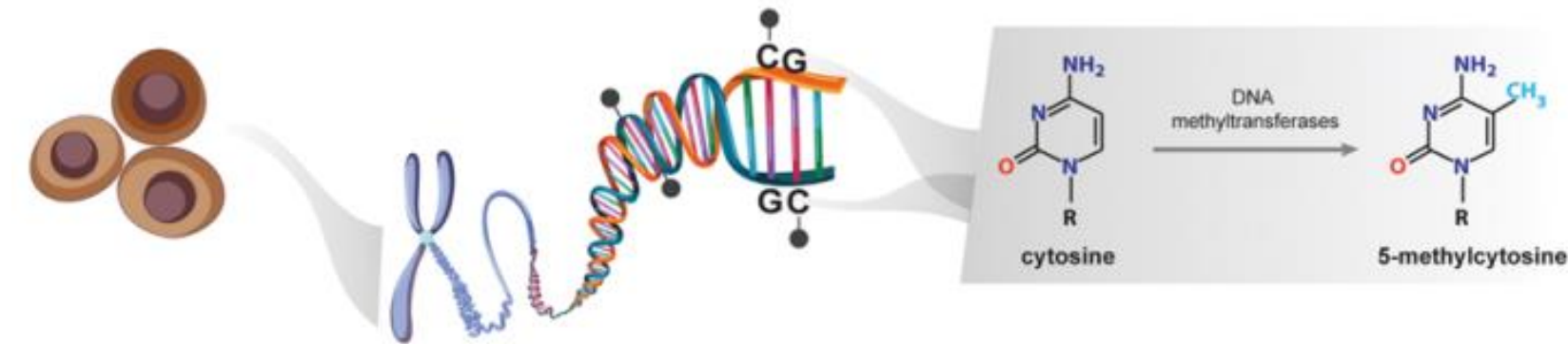
Q. Vandoolaeghe^{1,2,3}, P. Evenden^{1,2,3}, I. Vaudorne^{3,4}, V. Bouchart^{1,4,5}, M. Meryet-Figuière^{1,2,3}, P. Lebailly^{1,2,3}, R. Delépée^{1,2,3,4}

*quentin.vandoolaeghe@unicaen.fr

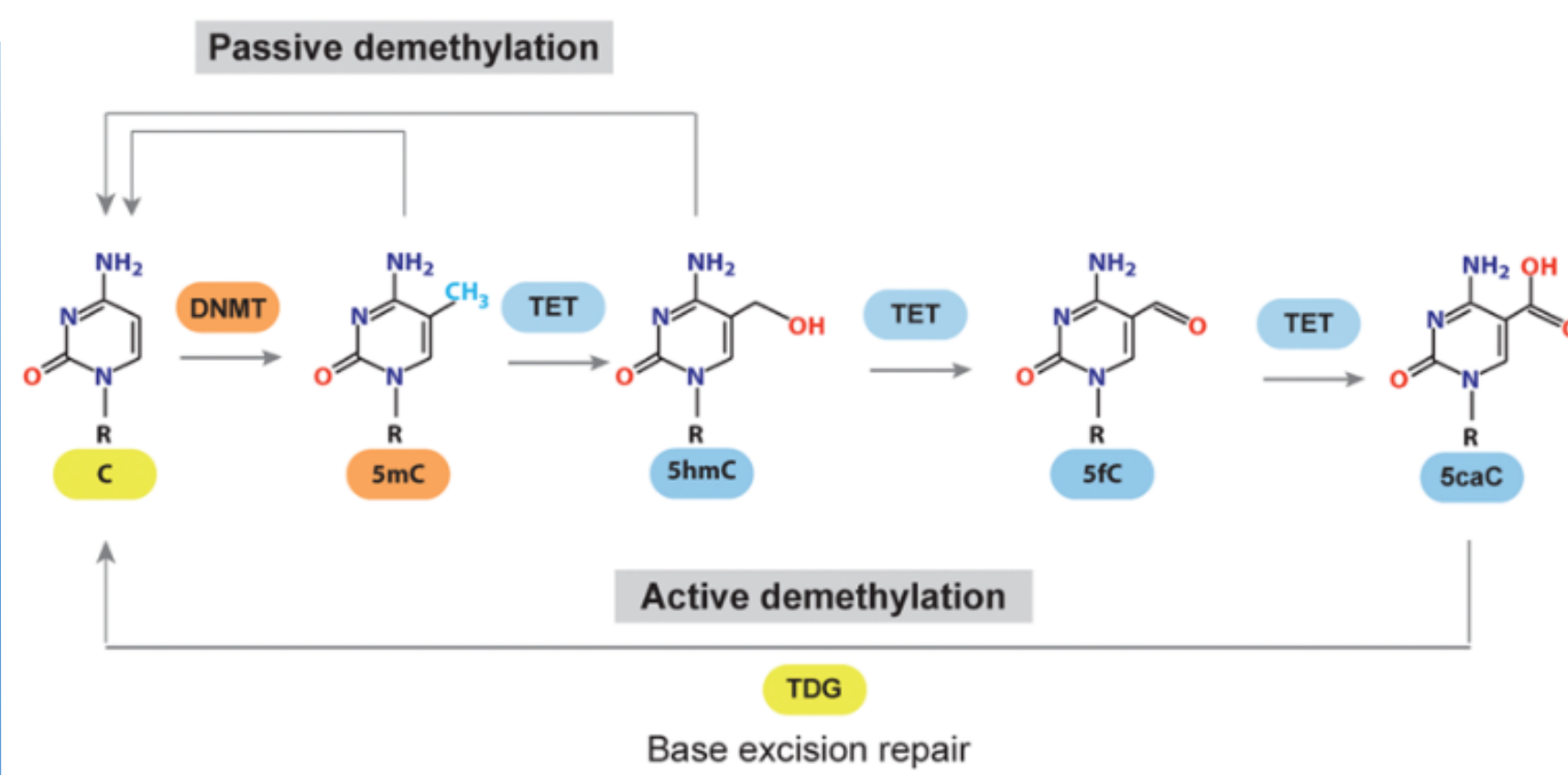
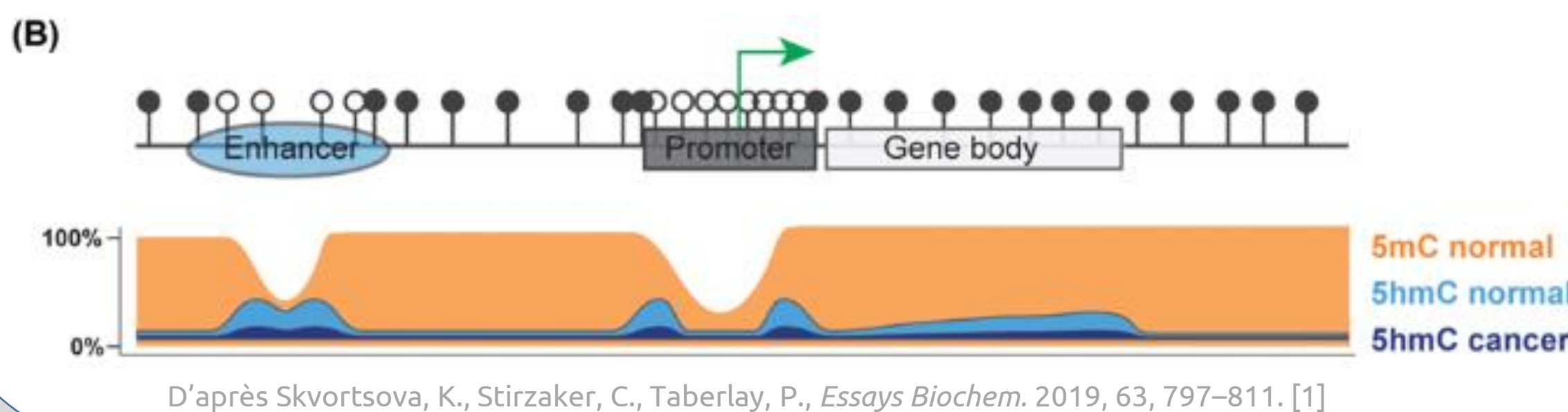
1 – INSERM UMR1086 ANTICIPE, Caen, 2 – Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Caen, 3 – Université de Caen Normandie, Caen, 4 – Plateforme PRISMM, US PLATON, UNICAEN, CLCC François Baclesse, Caen, 5 – LABÉO, pole recherche développement et innovation, Caen

Epigénétique et modification de la cytosine

Modification de la cytosine par ajout d'un groupement méthyle.



La méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN sont associés à la survenue de maladies, dont certains cancers.



Analyse de la 5 méthylcytosine (5mC) comme marqueur d'effet d'expositions professionnelles non génotoxique.

La 5 hydroxyméthylcytosine (5hmC), intervenant dans le cycle de déméthylation de l'ADN, est également analysée.



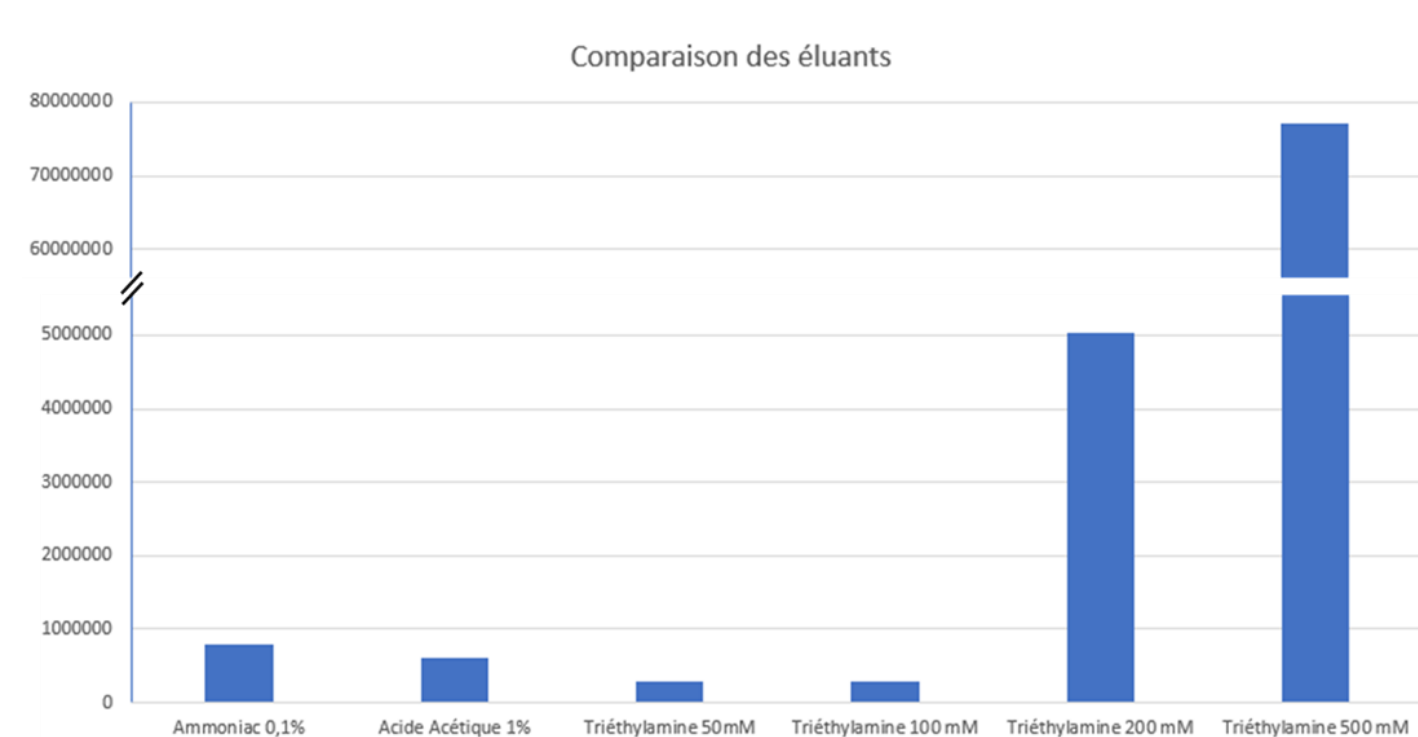
Application de la méthode sur cohorte

Utilisation de la méthode d'analyse sur des échantillons issus d'une cohorte d'affiliés à la MSA afin d'évaluer l'impact des paramètres généraux, des habitudes de vie et des expositions professionnelles agricoles

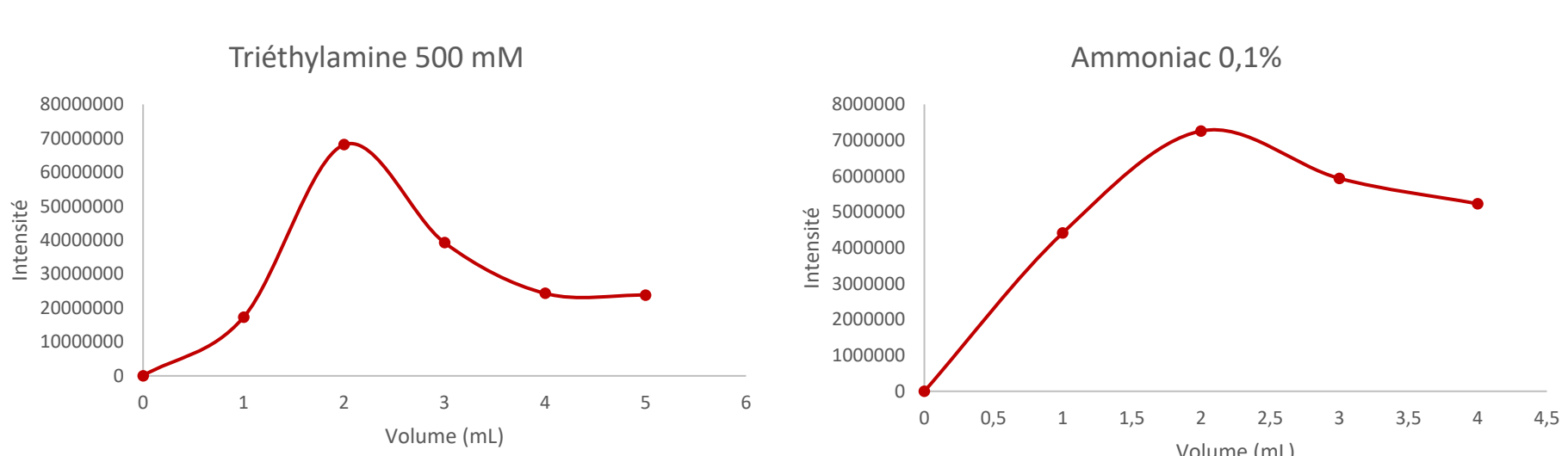
Caractéristiques	Totale n = 532	Hommes n = 295	Femmes n = 237
Sexe (% de Femmes)	45%		
Age median [min - max]	45 [17 - 76]	44 [17 - 76]	46 [19 - 73]
Classe d'IMC			
Sous poids	2%	1%	3%
Normale	49%	43%	56%
Surpoids	38%	46%	29%
Obésité	10%	10%	9%
Obésité morbide	2%	1%	3%

Développement de la méthode

Tests préliminaires en SPE



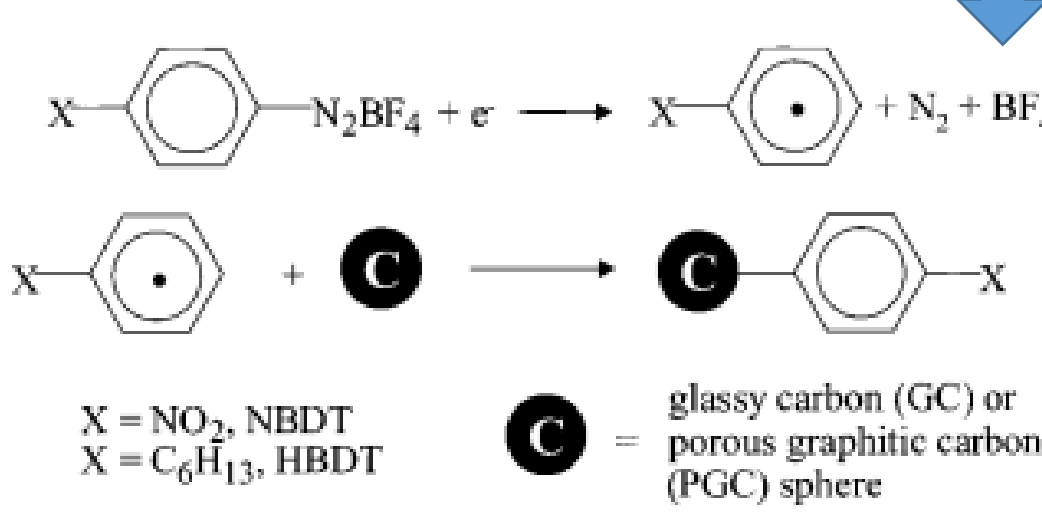
Elution d'adduits à l'ADN sur une cartouche SPE de carbone graphite. L'utilisation d'une phase contenant de la triéthylamine permet une élution très efficace des composés.



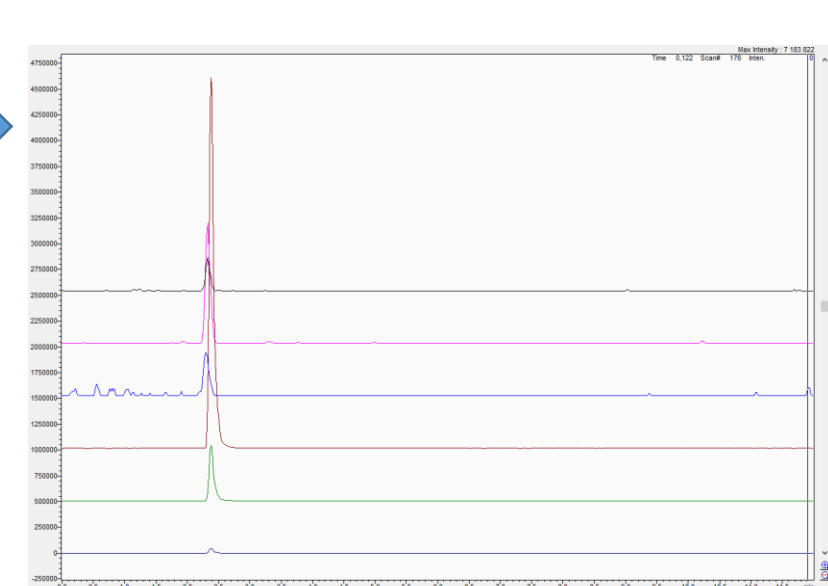
Comparaison de deux phases pour l'élution d'adduits à l'ADN sur une colonne SPE de carbone graphite. L'utilisation de triéthylamine permet une récupération avec un volume plus faible d'éluant.

Modification de la colonne

Première injection d'ADN hydrolysé sur une colonne de type Hypercarb neuve. La 5mC reste accrochée sur la colonne.

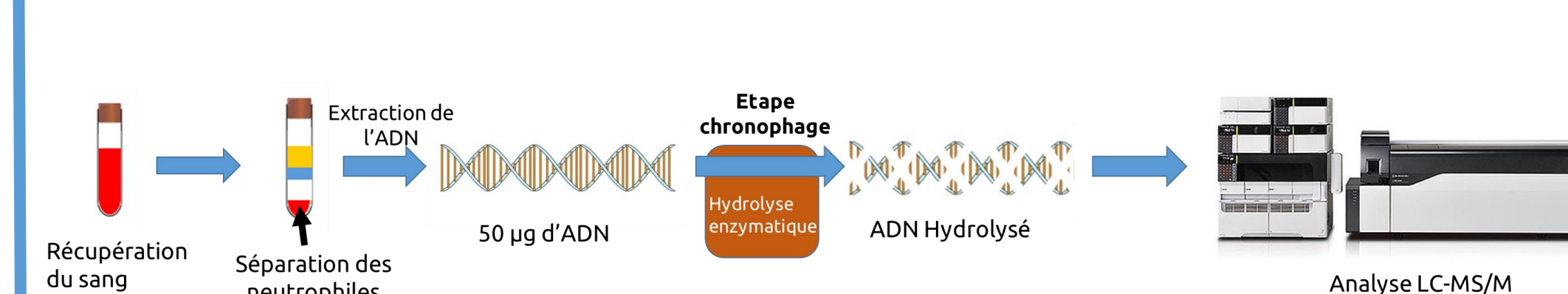


Modification de la phase stationnaire avec de la triéthylamine. La triéthylamine se comporte comme modificateur électronique [4]

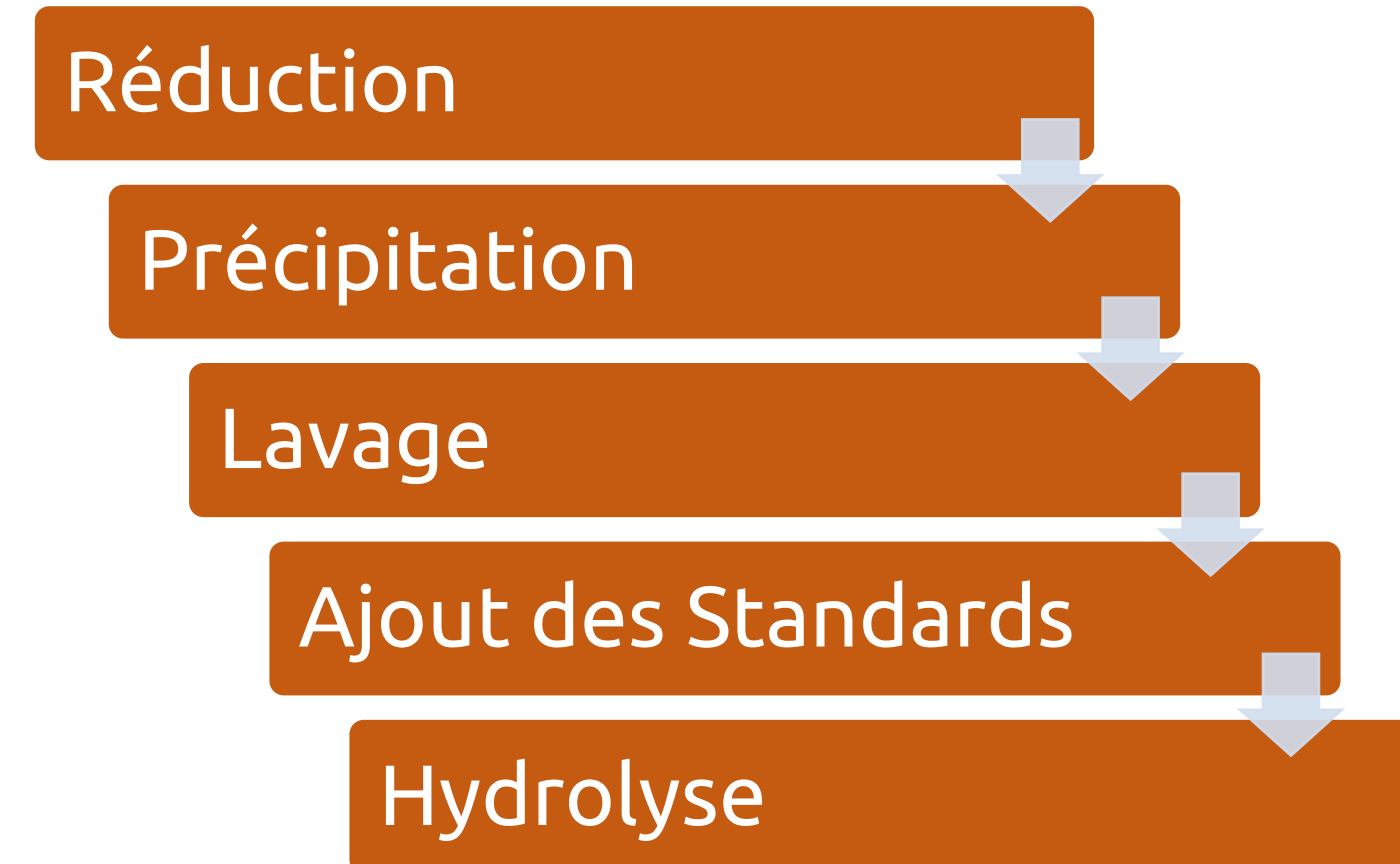


Injection d'ADN sur la colonne après modification de la phase stationnaire. Obtention d'une bonne séparation.

Préparation d'échantillons



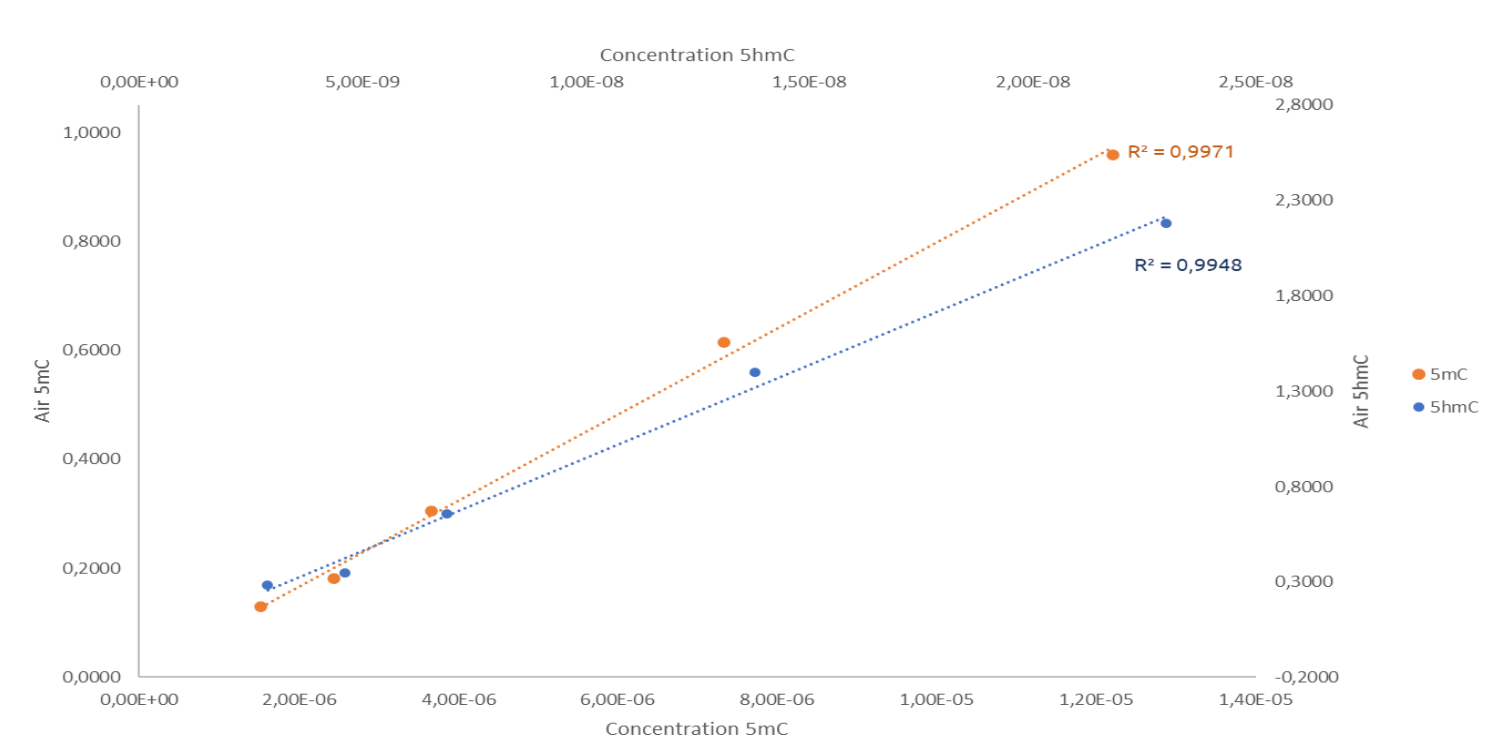
Hydrolyse enzymatique



Automatisé pour la préparation de 96 échantillons simultanément.

Résultats

Gammes d'étalonnage



Coefficient de variation < 5% entre les différentes injections du QC bas sur une série de 130 injections.

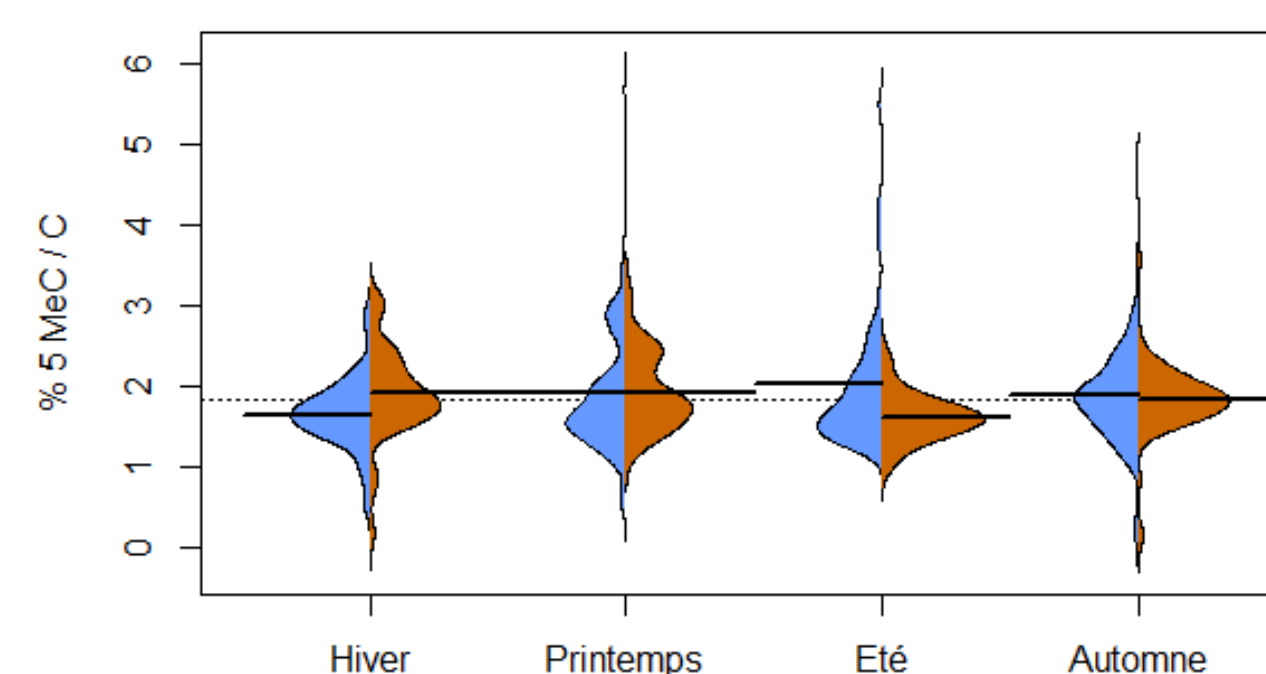
- Transitions Utilisées
- 5mC : 242,1 → 126,1
 - 5mC marquée : 249,1 → 129,1
 - 5hmC : 258,1 → 124,1
 - 5hmC marquée : 261,2 → 127,2

Application

Application de la méthode sur 532 échantillons issus d'une cohorte d'agriculteurs du Calvados, utilisation d'outils statistiques pour évaluer l'impact des habitudes de vies sur la méthylation / hydroxyméthylation de l'ADN.

Paramètre	5mC		5hmC		Rapport		Population	
	p-value	Fold	p-value2	Fold2	p-value3	Fold3	Exposés	Non Exposés
Indice de masse corporel	0,085		0,068		0,289		9/259/204/52/8	
Consommation alcool	0,107		0,086		0,691		69/220/84/121/31	
Statut tabagique	0,836	1,012	0,175	0,959	0,005	0,955	352	180
Consommation de somnifères	0,489	/	0,061	/	0,488	/	475/34/15	
Temps depuis le dernier vaccin	0,799	rho = -0,0133	0,017	rho = 0,124	0,003	rho = 0,153	370	
Saison Météorologique de prélèvement	0,011		0,031		0,022		157/109/111/149	

Résultats des tests statistiques sur les habitudes de vie (Wilcoxon pour les populations avec deux niveaux, Kruskal Wallis pour les populations avec plus de trois niveaux, Spearman pour les corrélations).



Description de la distribution de la méthylation totale du génome chez les hommes (Bleue) et chez les femmes (Orange) en fonction de la saison de prélèvement. Le trait noir représente la médiane de la population observée.

Perspectives

- Association des données de méthylation et hydroxyméthylation avec l'utilisation des produits phytopharmaceutiques
- Analyse de nouveaux marqueurs d'effets liés au stress oxydant

[1] Skvortsova, K., Stirzaker, C., Taberlay, P., The DNA methylation landscape in cancer. *Essays in Biochemistry* 2019, 63, 797–811.

[2] Harnisch JA et al., Chemical modification of carbonaceous stationary phases by the reduction of diazonium salts. *Anal Chem.* 2001 Aug 15;73(16):3954-9.

[3] West, C., Elfakir, C., Lafosse, M., Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 3201–3216.

[4] Thermo Scientific, Method Development guide for Hypercarb Columns,