

Résumé du projet DIAG-METHYL-EWS : classification des sarcomes d'Ewing par profilage épigénétique utilisant le méthylome

Rationnel

Le diagnostic des tumeurs osseuses et des tissus mous demeure difficile en raison d'un grand nombre de sous-types différents dont certains n'ont pas de biomarqueurs diagnostiques et histologiques typiques. En sus, la difficulté d'établir ce diagnostic précis est également liée à la quantité limitée de tissus disponibles dans le cadre de petites biopsies initiales. Le diagnostic a néanmoins progressé avec la détermination de nombreuses altérations moléculaires spécifiques à certaines tumeurs qui sont principalement des translocations spécifiques qui génèrent des fusions de gènes. Cependant, plus de la moitié des sarcomes n'ont pas de marqueurs moléculaires caractéristiques et parfois il est difficile avec les méthodes actuelles d'identifier de façon adéquate les mutations ou ces transcrits de fusions. Par conséquent, le développement de nouvelles approches et techniques capables d'utiliser des échantillons en paraffine préalablement fixés au formol et une quantité d'ADN ou d'ARN pouvant être extraite de ces petits spécimens est un besoin réel.

Depuis peu, une méthode basée sur les modifications de méthylation de l'ADN a été développée et publiée par les équipes d'Heidelberg du Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) permettant de classier les sarcomes (Koelsche et al., 2021). Cette technique peut refléter l'origine des cellules, ainsi que les changements acquis ultérieurement dans les cellules tumorales. Le profilage de plusieurs cancers et en particulier des tumeurs cérébrales a démontré des signatures de méthylation spécifiques en fonction du type histologique et de la mutation fondatrice à l'origine de la tumeur. Ceci a conduit à une meilleure classification et a permis de découvrir de nouveaux sous-types pertinents. Sur la base de ce contexte dans d'autres types de cancer, la même équipe a développé ces évaluations et leur validation dans des cohortes étendues de cancers des os et des tissus mous. Ils ont été notamment capables d'appliquer cette méthode de profilage aux tumeurs à petites cellules rondes permettant d'établir plus aisément le diagnostic que lors de l'analyse en séquençage d'ARN.

Par ailleurs, les mécanismes épigénétiques à l'origine de la tumorigénèse impliquant notamment la cellule mésenchymateuse ont permis de classier bon nombre de tumeurs allant des chondroblastomes aux tumeurs à cellules géantes ou encore les chondrosarcomes, les tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques, les synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes et les sarcomes d'Ewing. Pour toutes ces raisons, le développement de cette technique va améliorer rapidement nos possibilités diagnostiques et d'adapter ainsi notre traitement de façon efficace.

Nous avons acquis au laboratoire UMR CNRS 7021 ce type technologie basée sur un appareillage Illumina IScan et nous voudrions développer et valider cette technologie dans la classification des tumeurs à petites cellules rondes. Après extraction de l'ADN de prélèvements conservés en paraffine, sa conversion bisulfite et la validation de la qualité de ces ADNS bisulfités, une méthode d'étude de la méthylation utilisant les kits dits « methylationEPIC beadchip » sera effectuée. Cette technologie appelée Infinium HD array technology va permettre d'analyser dans un même temps plus de 850000 sites de méthylation tout au long du génome. Après génération des résultats sous forme de fichier.idat, l'analyse des données est réalisée par le logiciel intitulé module de méthylation GenomeStudio. Elle va apporter une quantité d'informations qui seront ensuite traitées rapidement par ce même logiciel. Ces résultats permettront une classification des tumeurs analysées basée sur un « classier » préétabli. Dans l'étude menée par le DKFZ, l'hétérogénéité des sarcomes d'Ewing avait été particulièrement soulignée et nécessite des validations de cohortes.

Dans ce cadre, nous planifions d'étudier une cohorte de 16 patients de notre centre Strasbourgeois dont le diagnostic histologique et moléculaire précis a déjà été effectué afin de les caractériser et d'étudier leur profil épigénétique à l'aide de cette technique. Nous pourrions ainsi valider la stratification épigénétique de ces tumeurs incluant à la fois des sarcomes d'Ewing typique et des tumeurs à petites cellules rondes diverses. Cela nous permettra outre la mise au point de la technique dans ces tumeurs à petites cellules rondes de pouvoir expérimenter et reclasser de façon indépendante à l'analyse ARN ces tumeurs.

Objectif : développement and optimisation de l'exploration des tumeurs à petites cellules rondes basée sur l'étude du méthylome utilisant la technique appelée « Illumina Epic array Beadchip 850k ».

Materiel:

Sélection rétrospective de 16 tumeurs au diagnostic rentrant dans le cadre des tumeurs à petites cellules rondes. Nous aurons ainsi 6 sarcomes d'Ewing caractérisés par un transcrit de fusion EWS-FLI1, 5 sarcomes à anomalie BCOR et 5 tumeurs desmoplastique malignes à petites cellules rondes.

Paramètres développés : optimisation de la conversion bisulfite de l'AND après son extraction à partir de prélèvements conservés en paraffine avec étude de la quantité de cellules tumorales nécessaire pour ces analyses et établissement de conditions optimales pour obtenir des résultats épigénétiques contributifs à la finalisation du diagnostic.

Technique :

Materiel: appareillage Illumina IScan

- 1) Extraction d'ADN dans des prélèvements conservés en paraffine afin d'obtenir entre 400 et 500 ng d'ADN final
- 2) Conversion bisulfite de ces mêmes ADNs avec travail d'optimisation de cette conversion utilisant des kits spécifiques pour restaurer les ADNs potentiellement dégradés et permettre une bonne amplification
- 3) Détermination de la méthylation de l'ADN sur l'ensemble du génome tumoral en utilisant les puces Infinium Human Methylation 850K BeadChip et une lecture rapide sur l'appareillage Iscan
- 4) Génération de fichiers .idat qui seront analysés de façon bioinformatique utilisant le logiciel et son module GenomeStudio methylation, cette analyse aboutira à la mise en évidence de scores de classification pour chaque prélèvement et une classification spécifique sera réalisée

Résultats attendus : validation de la technique et classification rétrospective qui permettra son utilisation prospective et sera ensuite étendue à toutes les tumeurs osseuses et des tissus mous au diagnostic. Dans un futur proche, cet outil sera proposé de façon systématique aux patients dont le diagnostic est difficilement établi en complément des autres techniques.

Sujet soumis par :

Pr Natacha Entz-Werlé

Pediatric Onco-hematology department – University Hospital of Strasbourg

UMR CNRS 7021 – Laboratory of Bioimaging and Pathologies – Team tumor signaling and therapeutic targets – University of Strasbourg

Dr Eric Guerin

Department of Cancer Molecular Genetics – Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology – University Hospital of Strasbourg

Dr Noelle Weingertner

Pathology department – University Hospital of Strasbourg

Budget provisionnel pour finaliser le projet: 7400 euros

Infinium™ FFPE QC Kit (384 reactions): 111,60 euros TTC

Infinium™ HD FFPE DNA Restore Kit (24 prélèvements): 2136 euros TTC

Infinium Methylation EPIC BeadChip kit pour 16 prélèvements: 5 154 euros TTC