

Existe-t-il une signature moléculaire de l'étiologie des cancers de la thyroïde?

**Sylvie Chevillard
DRF iRCM**

Facteur étiologique connu exposition à une irradiation durant l'enfance

Pour une exposition avant 15 ans:

Excès de risque relatif de 7,7 par Gray (Gy)

Significatif dès 0,1 Gy

(Ron, 1995)

Augmente linéairement avec la dose

Risque maximum 15-30 ans après irradiation

Perdure 40 ans après irradiation

88% des tumeurs de la thyroïde développées chez des enfants exposés à une dose de 1Gy sont dues à l'exposition

Cancer de la thyroïde spontané chez l'enfant très rare : 0,2 - 5 cas /10⁶

Carence en iode, en sélénium.... susceptibilité aux cancers sporadiques / radioinduits

Facteurs génétiques de radiosensibilité et/ou de susceptibilité au cancer

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs)

ATM, TP53, XRCC1...

FOXE1 (Takahashi, Human Molecular Genetics, 2010)

Spécificités des tumeurs radioinduites en comparaison des tumeurs spontanées

-sous-types histologiques : PTC ou FTA

PTC "solid variant" (Tchernobyl) : déficience en iode (Williams, 2008)

- clinique / pronostic

- altérations géniques

réarrangements RET/PTC > mutations de BRAF :

aussi observé en absence d'irradiation chez les jeunes patients / patients âgés

Excès de RET/PTC3 vs RET/PTC1

associés aux PTC « solid variant » et les latences courtes après l'exposition...

en fait signe les formes agressives

Pas de spécificités.....

**La problématique des faibles doses : essais nucléaires, Tchernobyl....
les premières plaintes**

Peut-on trouver une signature moléculaire permettant de distinguer les tumeurs spontanées des tumeurs induites par les radiations?

Impact du type d'exposition, de la dose, du débit de dose sur la signature ?

Tumeurs sporadiques (S) vs radio-induites (R)

Detours, 2005	Port, 2007	Detours, 2007	Stein, 2007	Mainhaut, 2011	Dom, 2012
Post Tchernobyl					
12 R (18 ans) 8 S (46 ans) (\bar{M} Age au diagnostic)	11R (18 ans) 41S (60 ans)	12R (24 ans) 14S (47 ans)	12R (20 ans) 14S (44 ans) S décrits par He, 2005	33R (? ans) 32S (? ans)	22R (18 ans) 23S (16 ans)
?	?	1-16 ans à IR	2 mois-14 ans à IR	?	R: nés 0-2 ans avant 1986 S: nés 1-3 ans après 1986
Pas de dosimétrie disponible pour l'analyse					
Hybridé contre N Perkin Elmer 2400 gènes analysés	Pool de 10 S vs 10 R Applied 33 000 sondes analysés	Hybridé contre N Agilent 19 000 sondes analysés	Hybridé contre N Affymetrix 20 000 sondes analysés	?	Affymetrix 50 000 sondes analysés
Analyse supervisée Non supervisée SAM	1300 gènes déregulés (au moins 5 fois)	Analyse supervisée Non supervisée SAM	Deux études séparées comparées	?	Analyse supervisée Non supervisée SAM
Pas de signature	92 gènes validés par RT-PCR 10 gènes pour séparation parfaite des groupes Pas de validation En aveugle	Signature Taux d'erreur: 8 à 42% pour S 7 à 29% pour R en fonction des méthodes Pas de validation En aveugle	Retenus 177 gènes déregulés dans R Pas de validation En aveugle	Pas de signature Différences R/S si amélioration de la méthode d'analyse ? Signature stress ox	Pas de différence entre tumeurs R et S

LEARNING

n tumeurs R

n tumeurs S

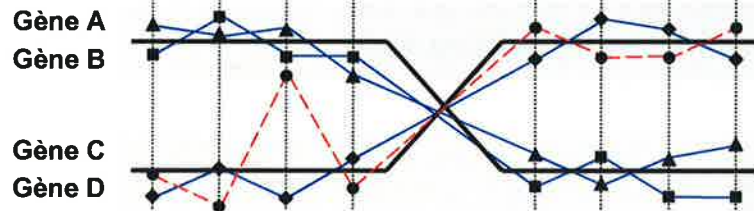
Combinatoires

4 tumeurs R

4 tumeurs S

R1 R2 R3 R4

S1 S2 S3 S4

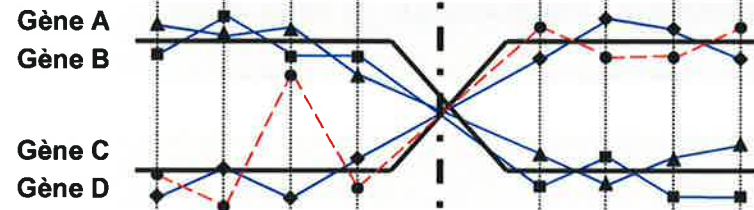


4 tumeurs R

4 tumeurs S

R5 R6 R7 R8

S5 S6 S7 S8



EMts_2PCA (Ugolin et al., PLoS One 2011)

TRAINING

Tumeurs exclues de la combinatoire 4R / 4S
Classé par la sous-signature (PCA)

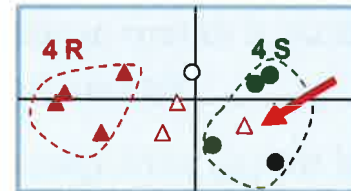
Retenu



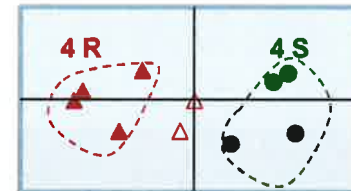
Ecarté



Ecarté



Retenu



COMPILATION

Dans les sous-signatures retenues

Gènes les plus fréquemment retrouvés, pondérés par le nombre de tumeurs de training bien classées



SIGNATURE

Classement des tumeurs du learning/training

Classement de nouvelles tumeurs en « aveugle »

57 tumeurs (PTC et FTA) de la thyroïde sporadiques (S) ou post-radiothérapie (R)

30 S: pas d' historique clinique d' exposition aux RI

27 R:

développées dans le champ d' irradiation

temps de latence

histologie différente de la première tumeur

dose individuelle reçue à la thyroïde

Learning/Training: 14 R vs 14S

Que des patients traités avant 15 ans (3-14 ans, M = 8,6 ans)

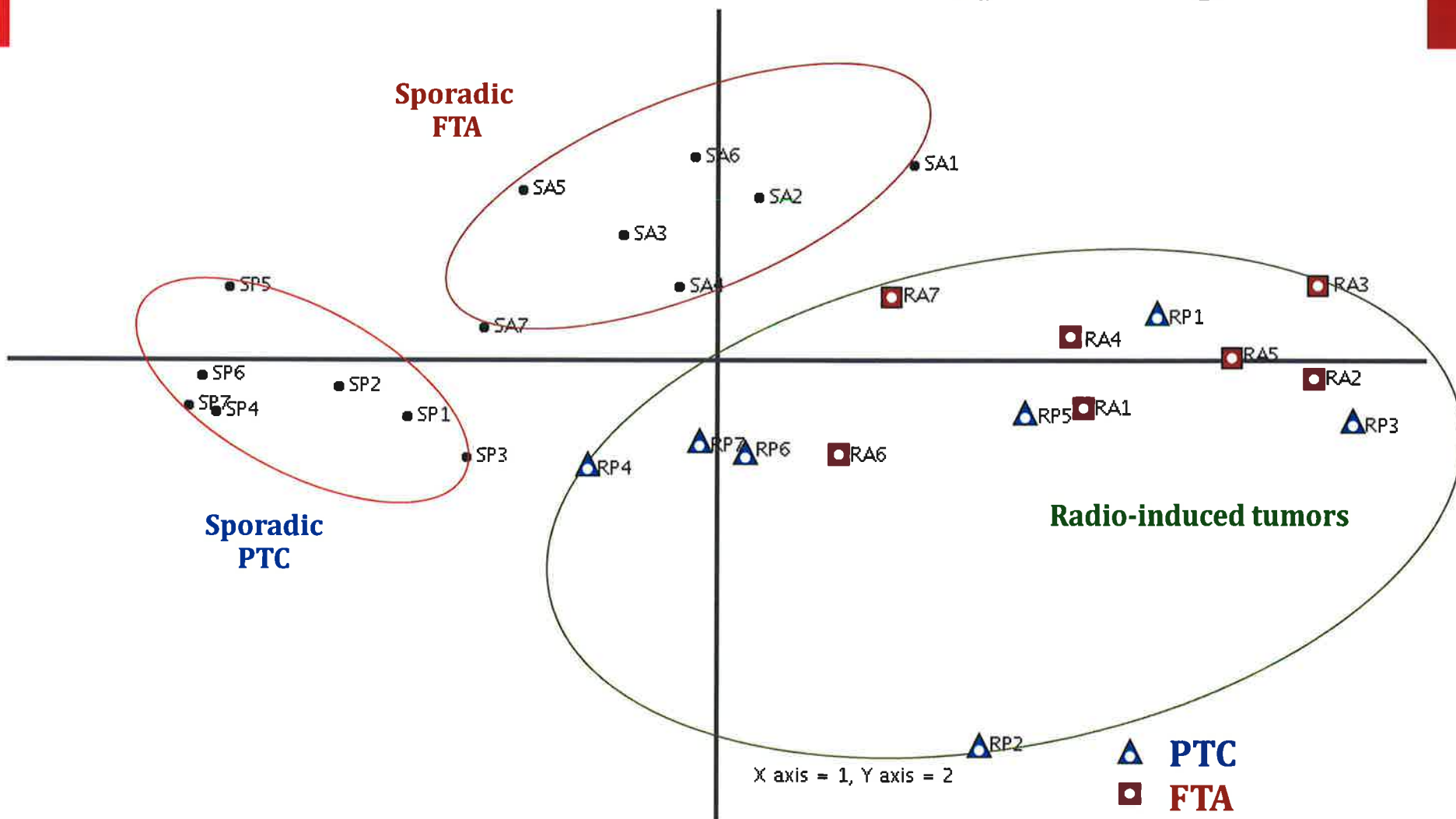
12-43 Gy reçus à la thyroïde

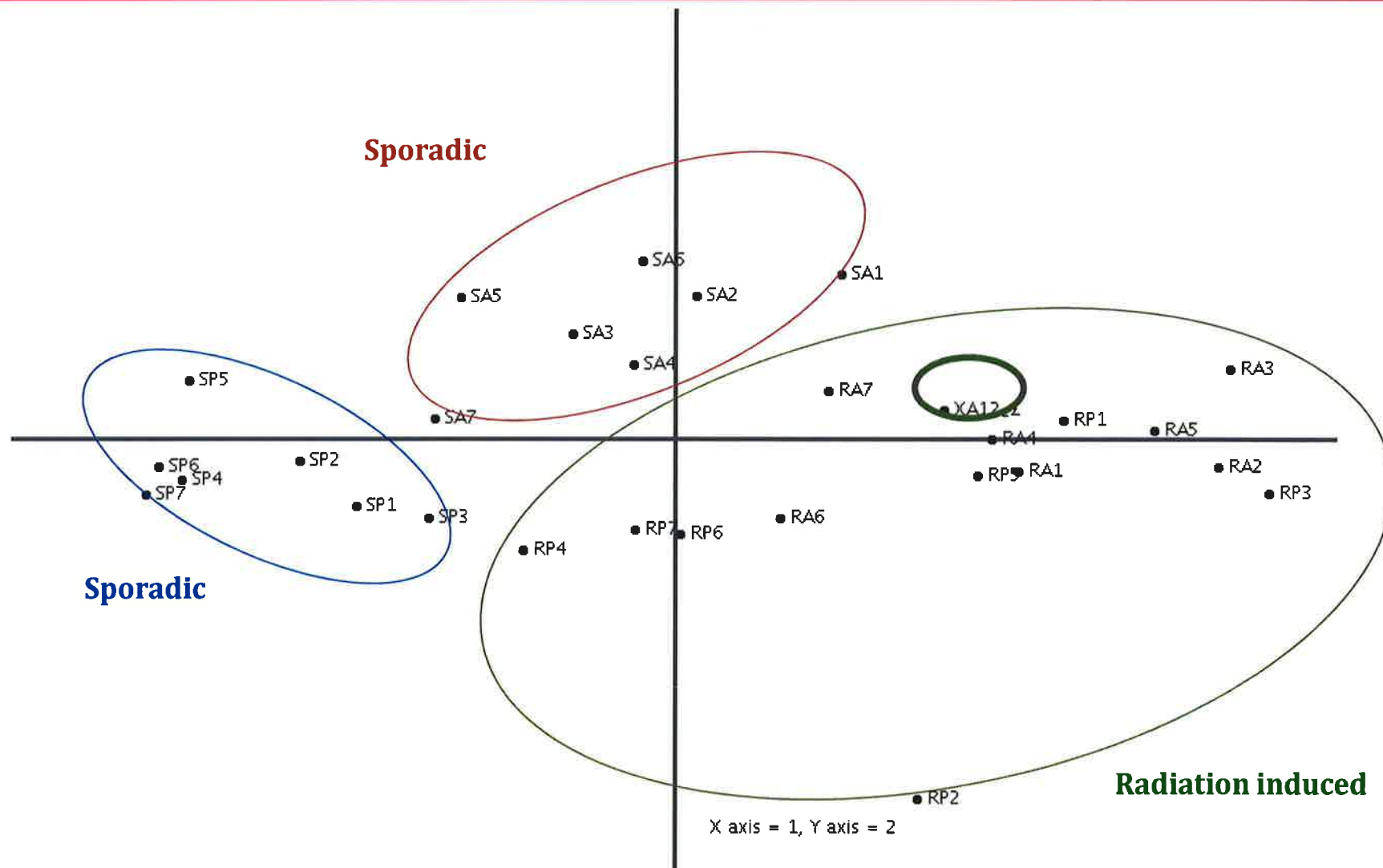
Age au diagnostic équilibré (R: 35 ans (20-56); S: 38 ans (21-63))

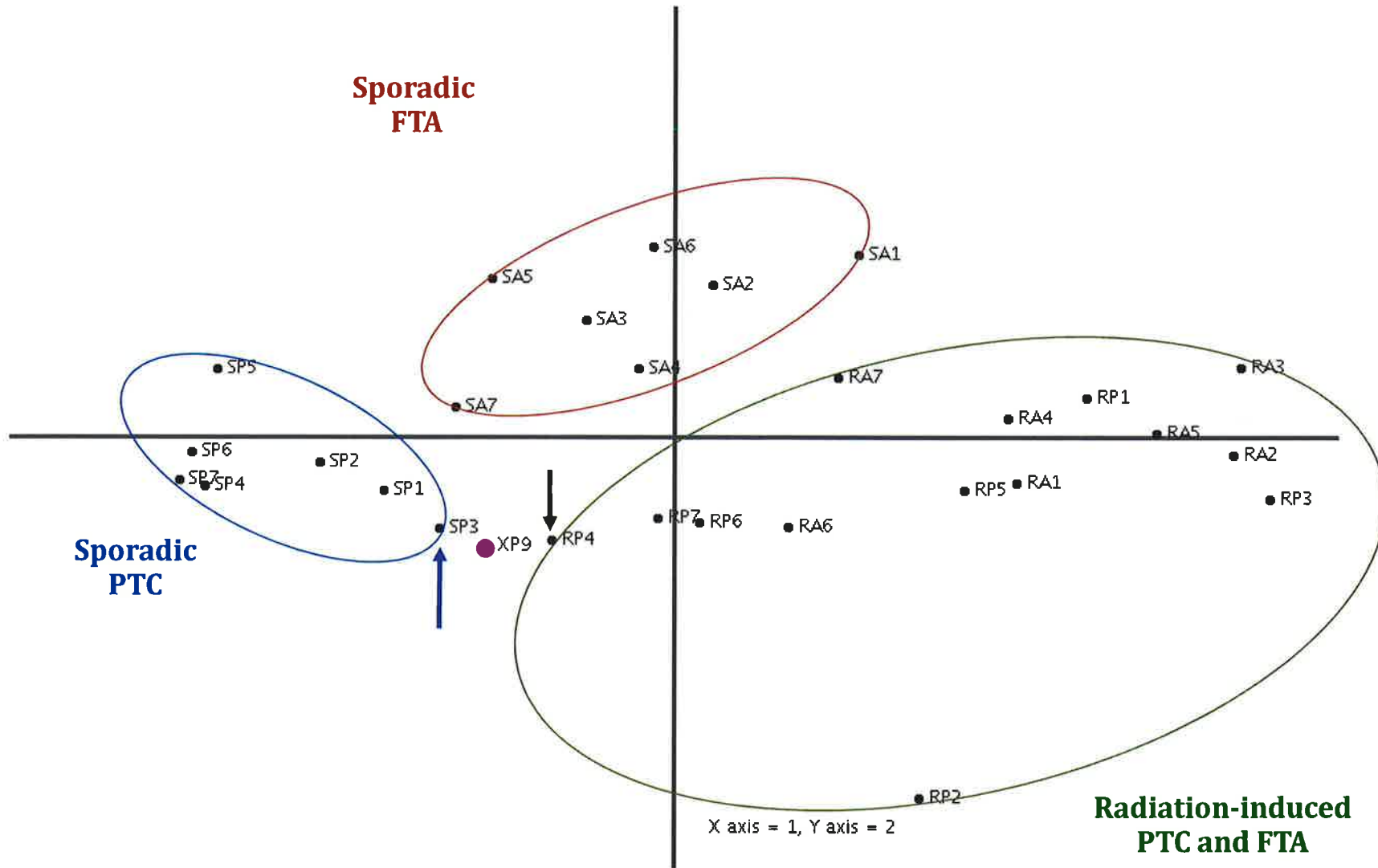
Analyse des mutations

=> Signature de 322 gènes

Classement des tumeurs d'apprentissage n=28







Validation: 29 tumeurs indépendantes: 16S, 13R

Clinique

16 S
13 R

Prédiction

14S	2R (2 FTA S mal classés)
12R	1? (1 PTC R non classé)

26 tumeurs bien prédites ; 1 indéterminée, 2 fausses

(Ory et al., Endocr Relat Cancer, 2011)

Tumeurs post-Tchernobyl

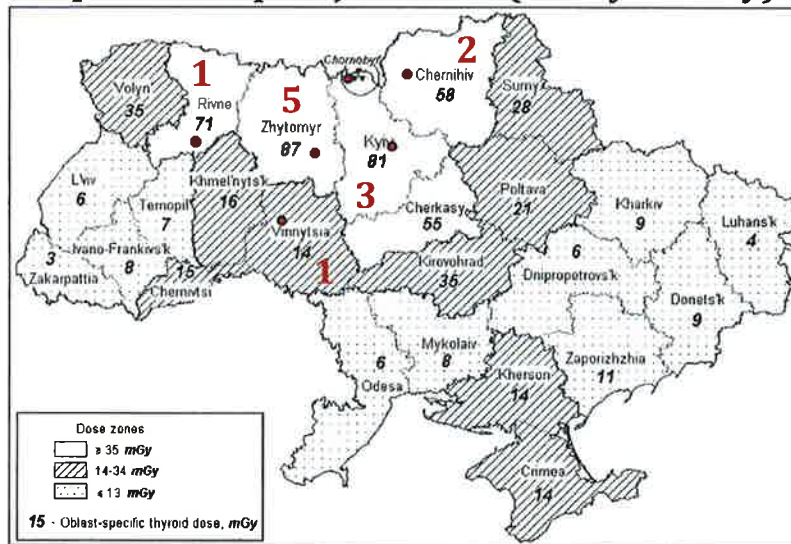
26 carcinome papillaires de la thyroïde sporadiques ou post-Tchernobyl
(série publiée (Detours, 2007))

14 S: France, pas d'historique d'exposition à l'irradiation

12 R: Que des patients exposés avant 16 ans (1-16 ans, M=8,6)

Proviennent de régions les plus fortement contaminées autour de Tchernobyl

Dosimétrie disponible depuis juin 2012 (9 mGy à 2.7Gy)



Estimation par mesure des doses reçues à la thyroïde, 20 à 40 jours après l'accident, de 99 132 enfants et adolescents (1-18 ans) (Likhtarov et al., 2005)

N = nombre de cas par région

Learning/Training: 7 PTC S vs 6 PTC R

Age au diagnostic équilibré (R: 29 ans (27-33); S: 34,6 ans (29-38))

Enfants irradiés entre 10-16 ans (M=12,6 ans)

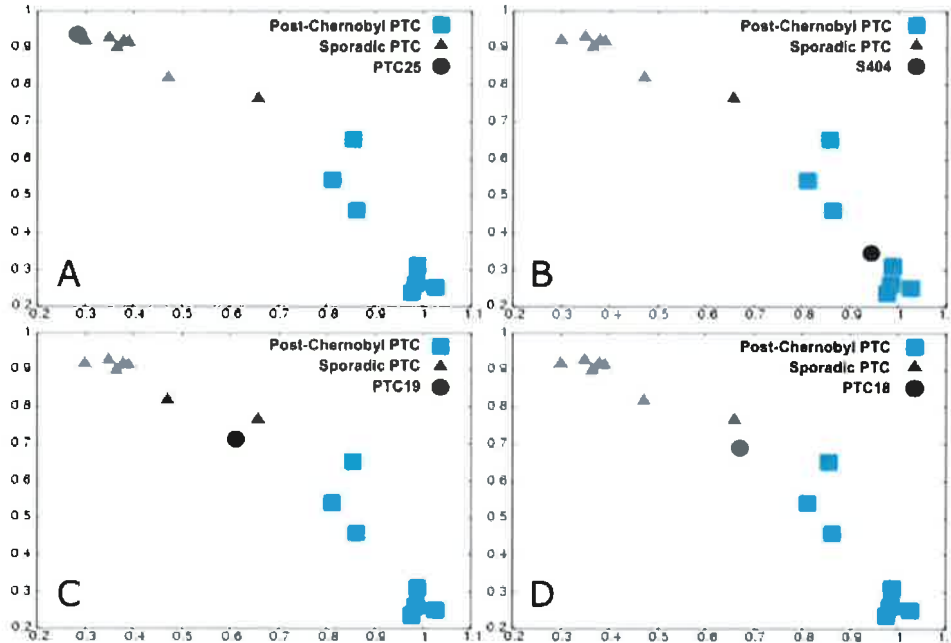
Tumeurs provenant de Chernigov, Zhytomyr, Kiev, Pripjat (9 mGy à 2.7Gy)

=> Signature de 106 gènes

(Ugolin et al., PLoS One 2011)

Tumeurs post-Tchernobyl

Validation: 7 PTC S vs 6 PTC R (20mGy à 1,6Gy)



Taux d'erreurs (%)			
	S	R	Erreur globale
GPLS	17	7	12
PAM	25	29	27
RF	33	14	23
LKSVM	25	7	15

Detours et al., 2007

Clinique

7 S
6 R

Prédiction

7S	
5R	1?

Comparaison des signatures

Signature de 322 gènes

Irradiation externe
Fort débit de dose
Forte dose (12-43 Gy)

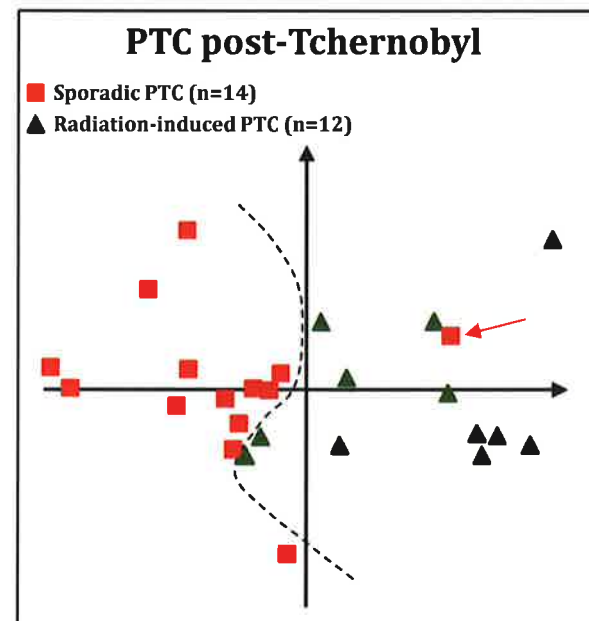
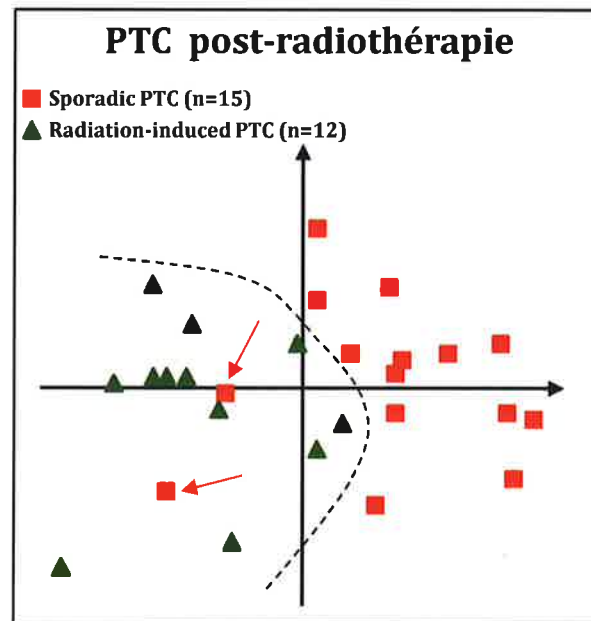
Signature de 106 gènes

Contamination par I¹³¹
Faible débit de dose
Plus faibles doses (0,6-0,9 Gy estimé)

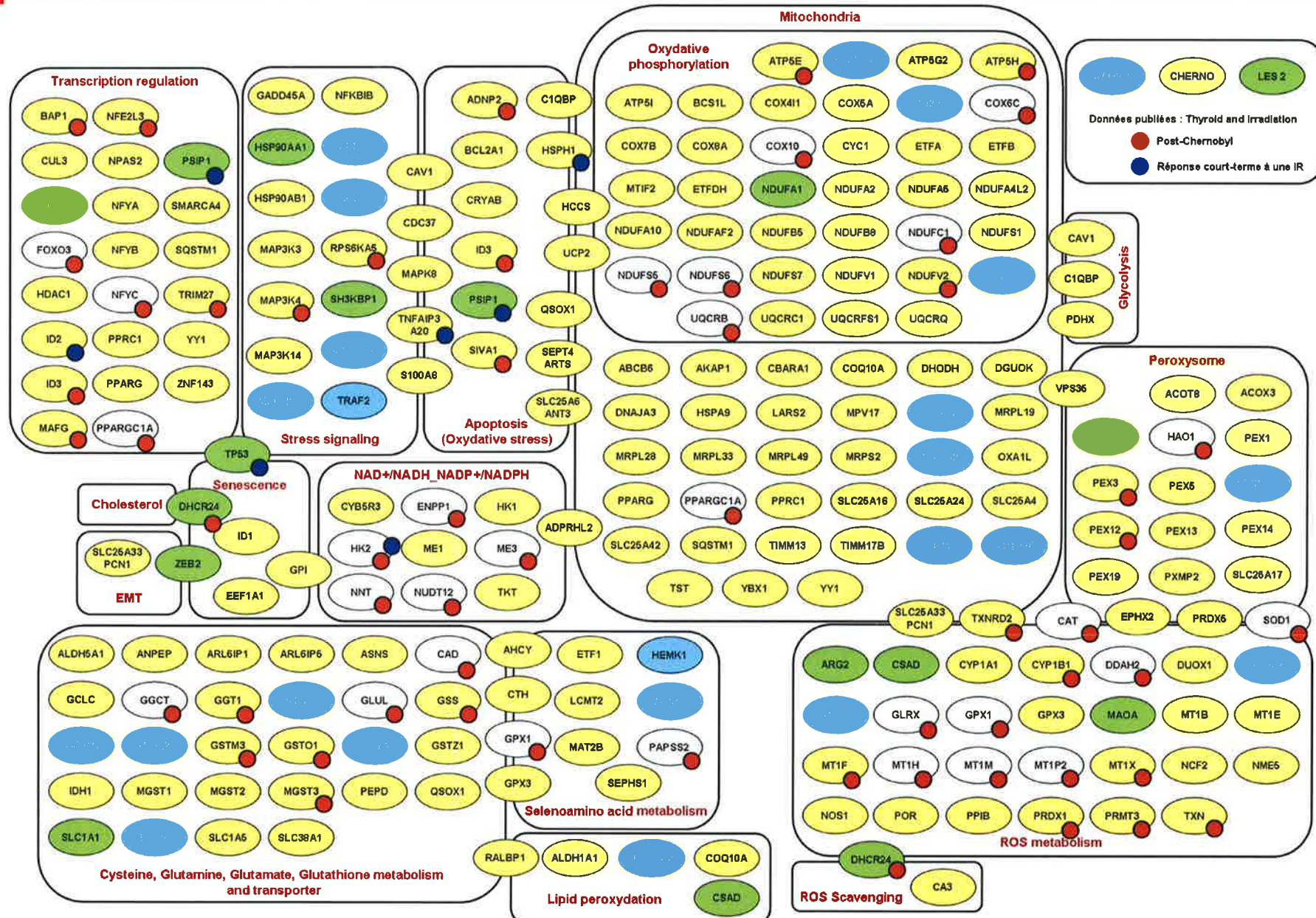
5 gènes communs entre les 2 signatures

PABPC1, SERPINE1, GTF2H2, DHCR24, CLU

Peut-on classer les deux séries avec les 5 gènes en PCA ?



Réponse / adaptation au stress oxydant



Ory et al., 2011

322 (295) Gene Signature

- In order to simplify visualization, the MEAN of the microarray data points was calculated.
- 16 RNA-seq "blind" tumor samples were then plotted along with the MEAN of the radiation induced and sporadic microarray training samples.

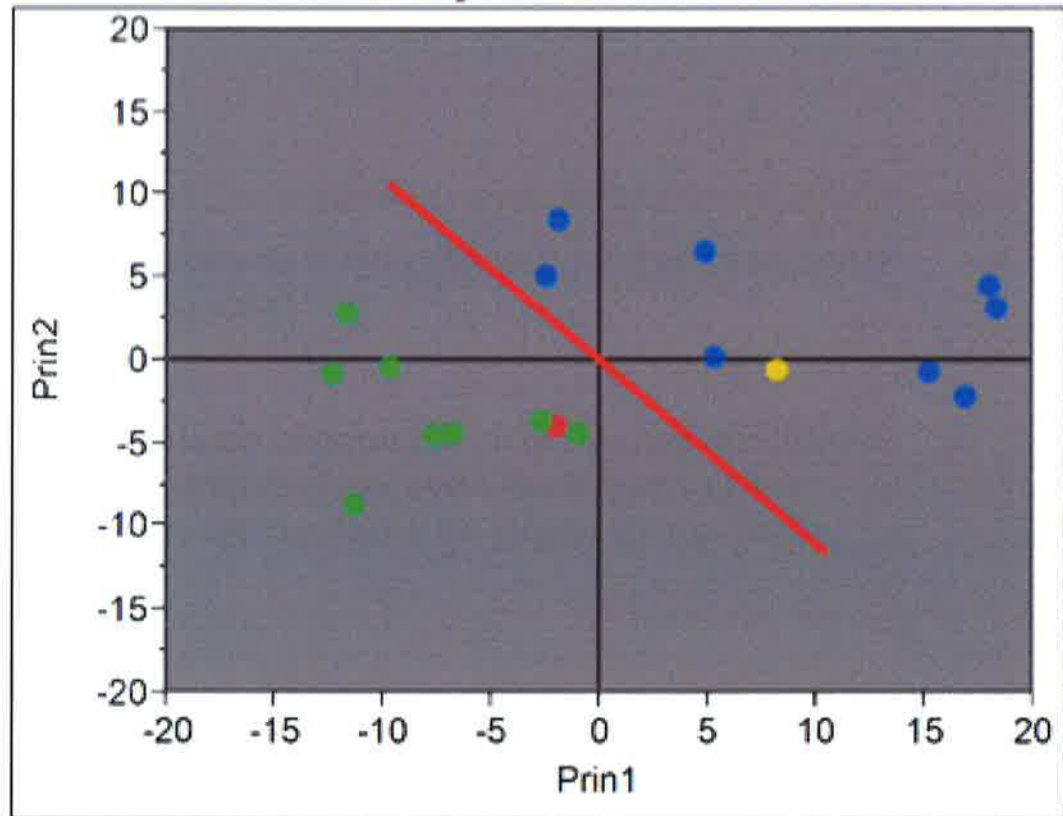
Microarray Data

- = radiation-induced
- = sporadic

RNA-seq Data

- = radiation-induced
- = sporadic

Bubble Plot of Prin2 by Prin1



Circle Size

Les échantillons

Post-radiothérapie: Cadre de l'Etude Française des Survivants à un Cancer de l'Enfance
Institut Gustave Roussy, Institut Curie et Centre Léon Bérard Lyon
Plusieurs dizaines de tumeurs radio-induites de la thyroïde attendues
(M Schlumberger)

Post-Tchernobyl: CTB (patients ukrainiens et russes)
50 tumeurs de la thyroïde (exposés avant l'âge de 2 ans) et 50 tumeurs sporadiques

Retombées des essais nucléaires Polynésie (F de Vathaire)

Dosimétrie

Analyse systématique de la tumeur et du tissu sain apparié

Les méthodes

Recherche des signatures de l' étiologie : analyse du transcriptome, miRNome, méthylome

Analyse de la susceptibilité individuelle par séquençage haut débit de l' ADN constitutionnel

Analyse des altérations géniques ciblées (RAS, BRAF, RET) et non ciblées par CGH

Empreintes dose et débit de dose?

Empreinte exposition? Carcinogènèse

Prédisposition génétique?

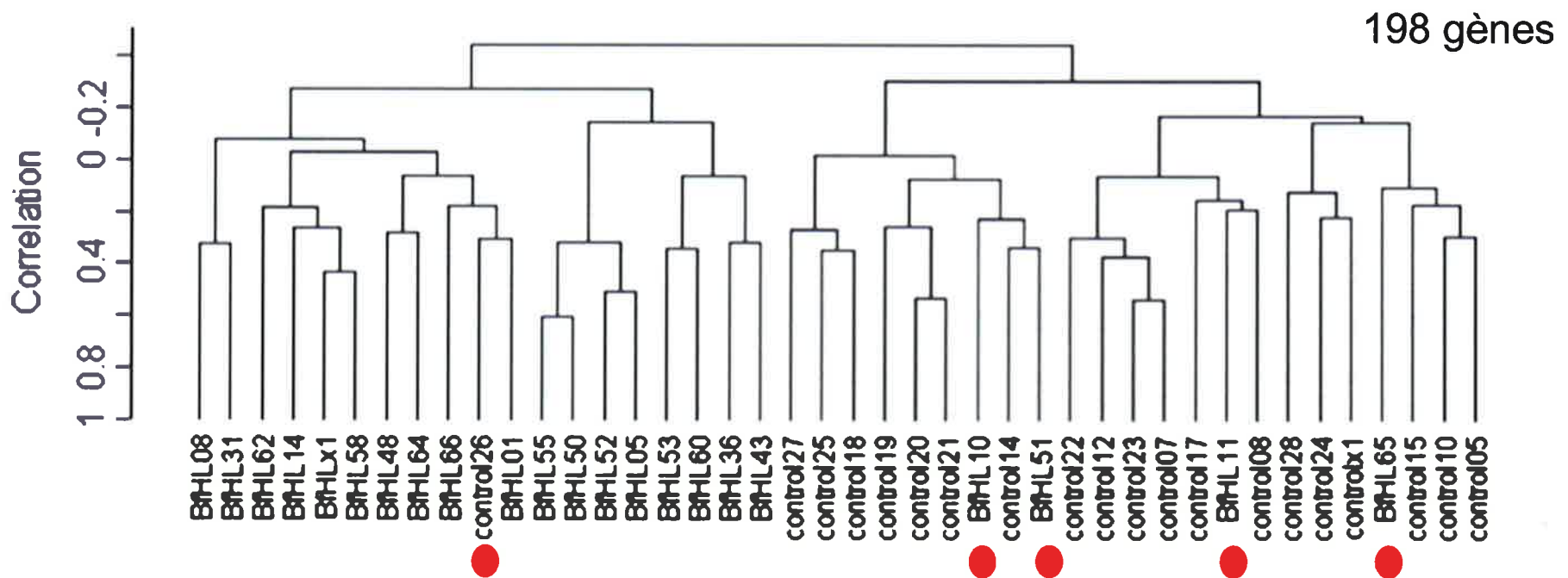
Empreintes et types de tumeurs?

Tumeurs radioinduites autres que thyroïde

BIOLOGY CONTRIBUTION

**RADIATION-ASSOCIATED BREAST TUMORS DISPLAY A DISTINCT GENE
EXPRESSION PROFILE**

ANNEGIEN BROEKS, PH.D.,* LINDE M. BRAAF, B.S.,* LODEWYK F. A. WESSELS, PH.D.,†‡
MARC VAN DE VIJVER, M.D., PH.D.,§ MARIE L. DE BRUIN, PH.D.,¶ MARILYN STOVALL, PH.D.,||
NICOLA S. RUSSELL, M.D., PH.D.,** FLORA E. VAN LEEUWEN, PH.D.,¶
AND LAURA J. VAN 'T VEER, PH.D.*§



Validation 22 : 20 bien classées, 2 non classées mais pas mal classées!

44 gènes

Ugolin et al., PLoS One 2011

A transcriptome signature distinguished sporadic from postradiotherapy radiation-induced sarcomas

Nabila-Sandra Hadj-Hamou^{1,2,3}, Nicolas Ugolin⁴,
Catherine Ory⁴, Nathalie Britzen-Laurent^{1,2,3,6},
Xavier Sastre-Garau⁵, Sylvie Chevillard⁴ and
Bernard Malfroy^{1,2,3,*}

application of an empirical signature elaborated from previously published oxidation stress-specific signatures was able to roughly discriminate sporadic from post-Chemobyl tumours (7). In addition, the relative abundance of a few proteins made it possible to distinguish post-Chemobyl from sporadic papillary thyroid cancers, although this

Radiation-induced sarcomas (12 R and 12 S)

24 sarcomas Signature 135 genes

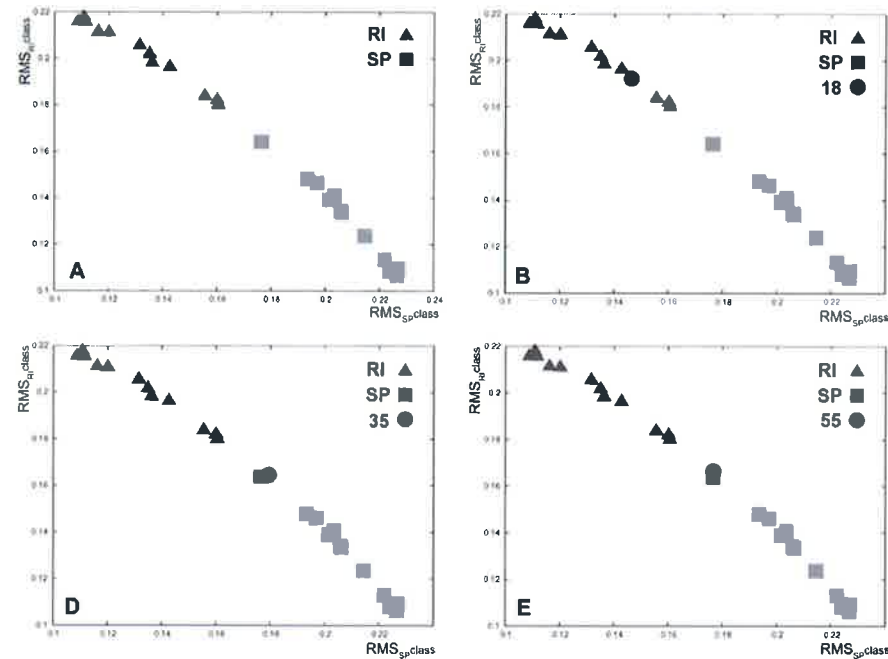
Validation on a series of 36 sarcomas

After the code break

30 well classified

5 ?

1 miss-classified



CEA

- K ory
- N Ugolin,

IGR

- M Schlumberger
- L Lacroix
- F de Vathaire

Hôpital Pasteur Nice

- P Hofman

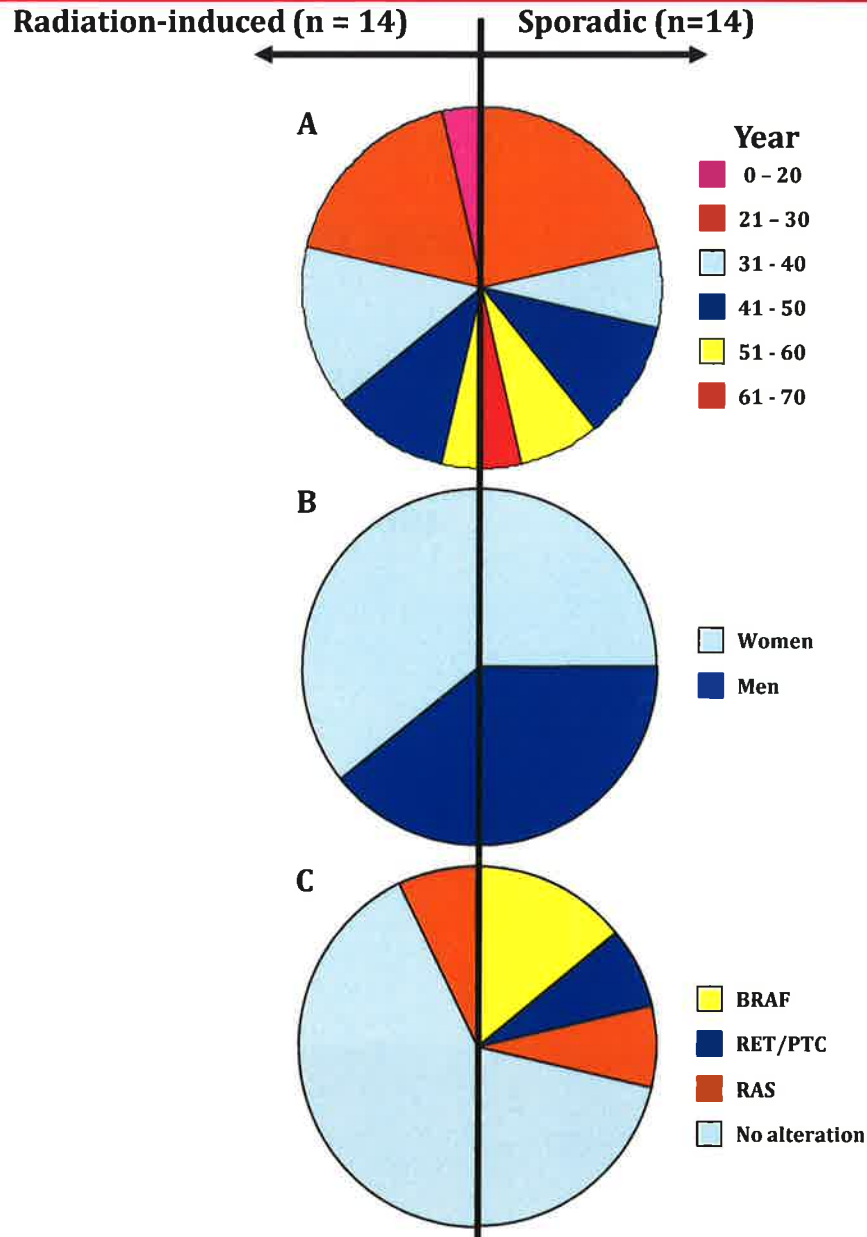


Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE
ANR



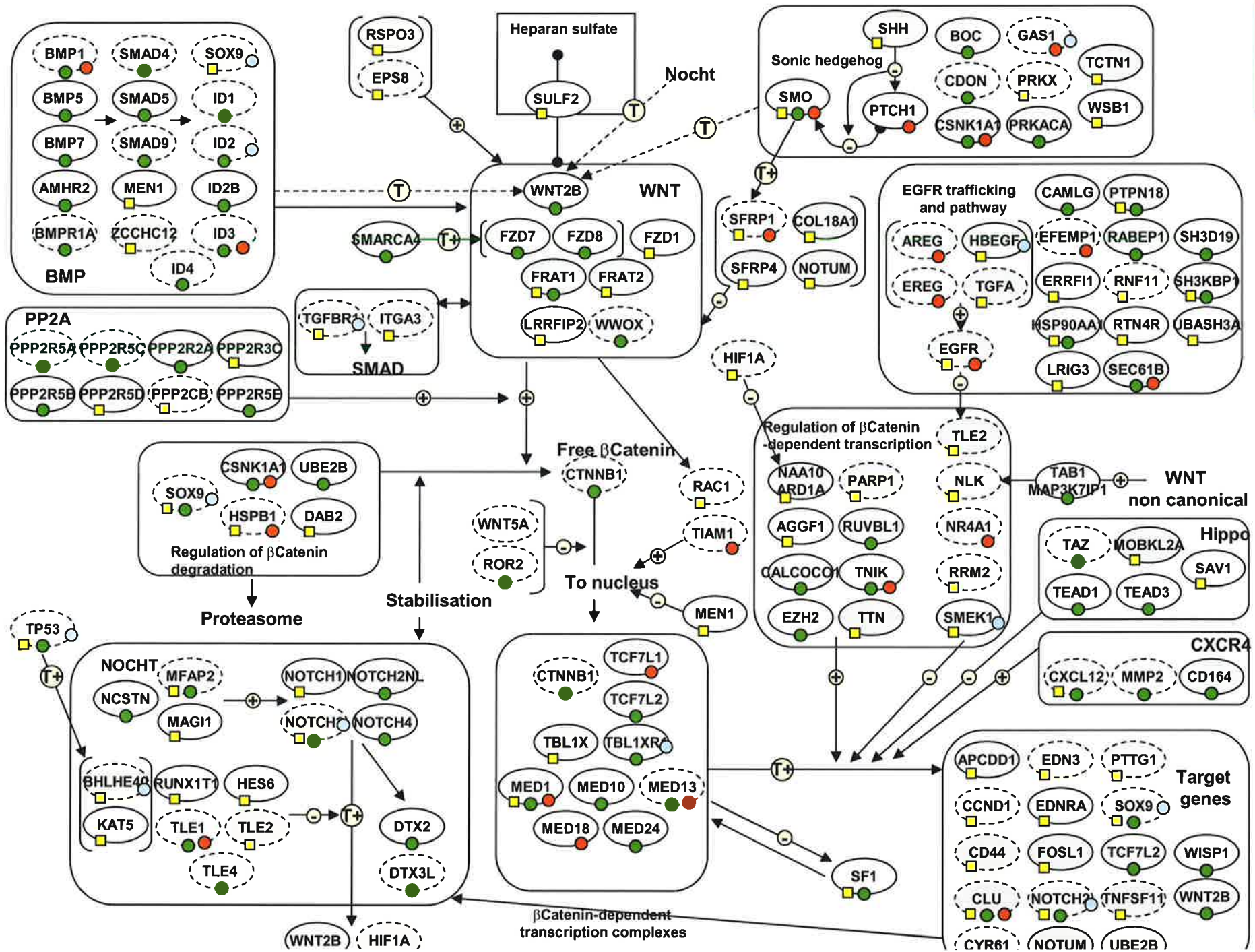
As function of :

Mean age
Age **35 years old for R tumors**
 37 years old for S tumors

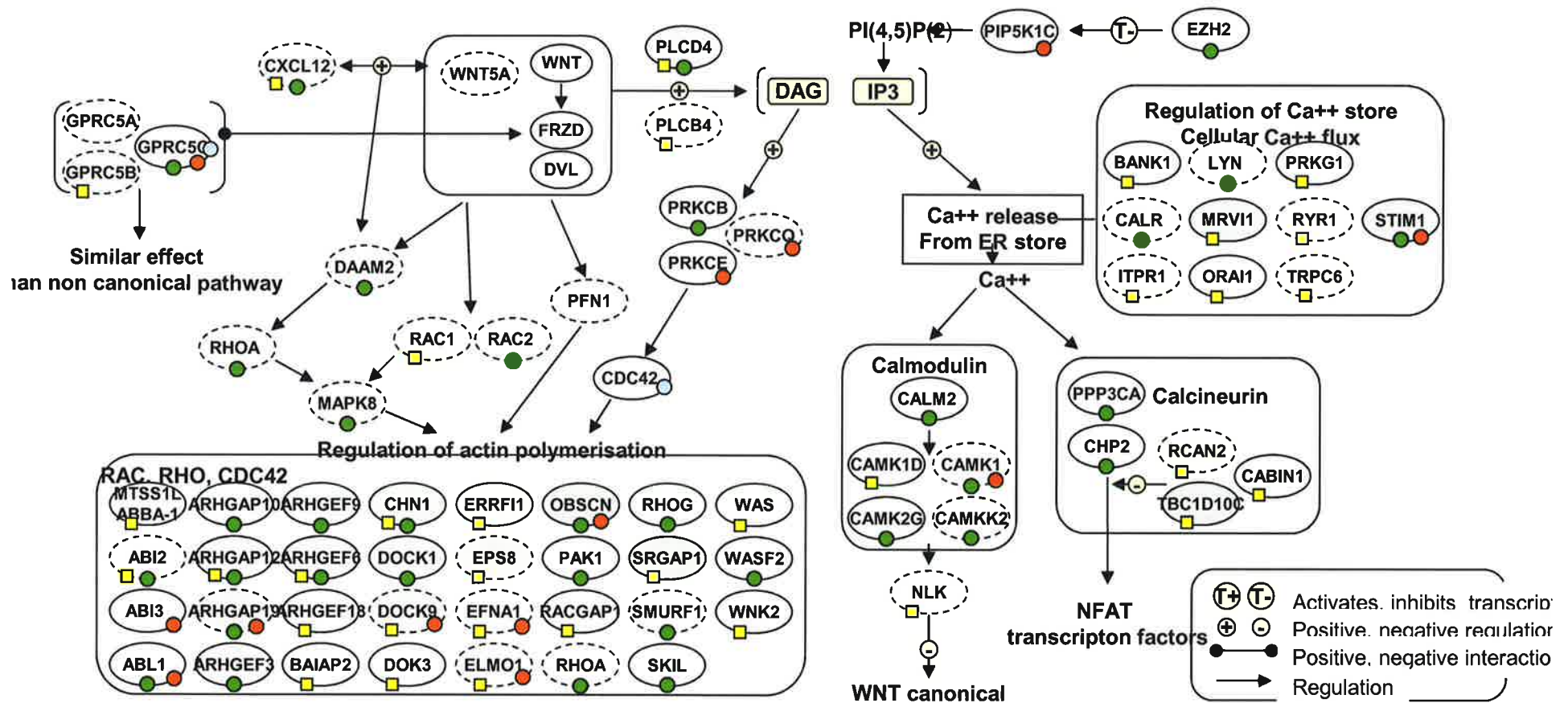
2 groups were matched histology, TNM, sex, ethnicity and age at tumor diagnosis
Gender

No bias when comparing the two subgroups

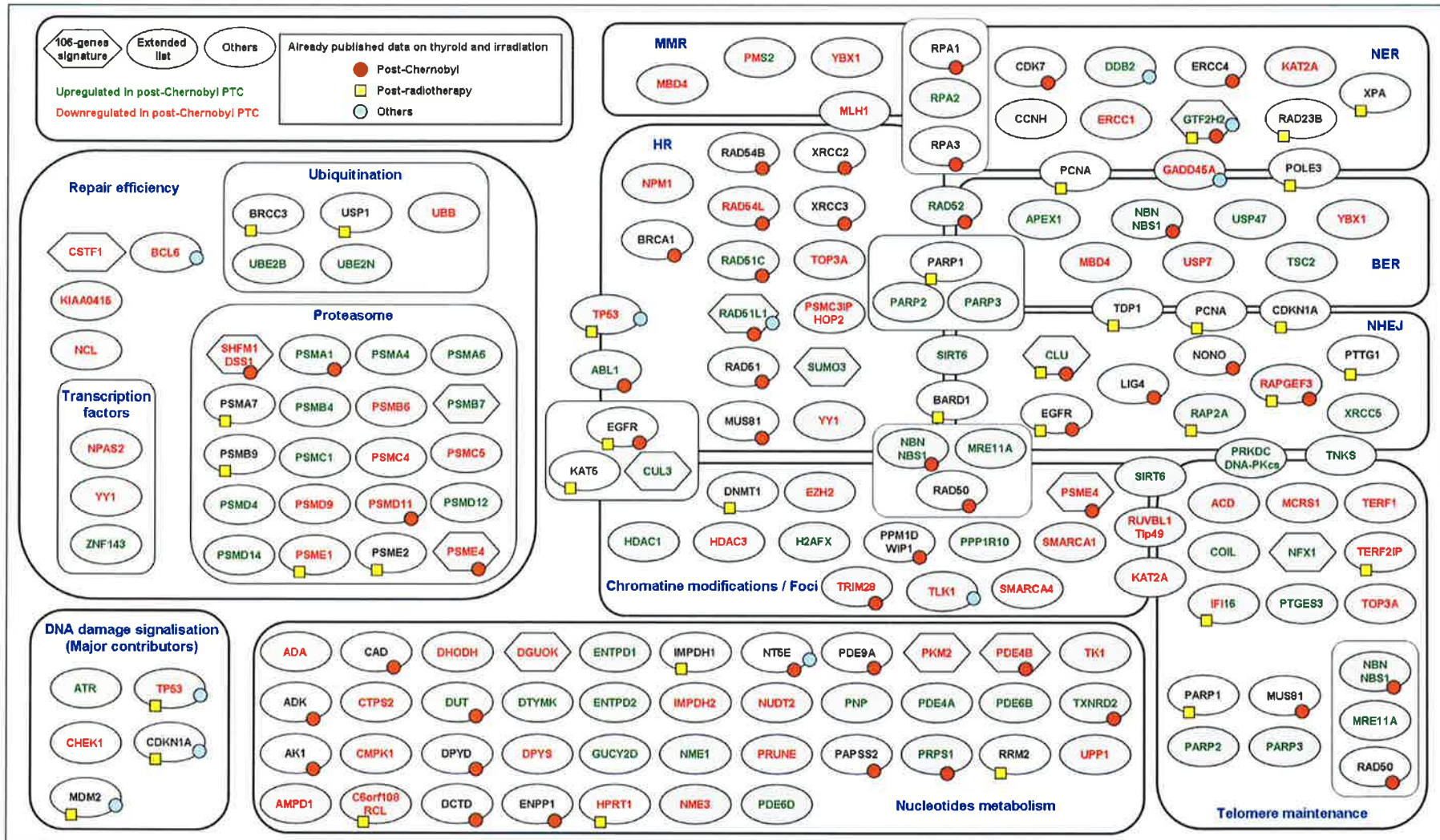
Gene mutations



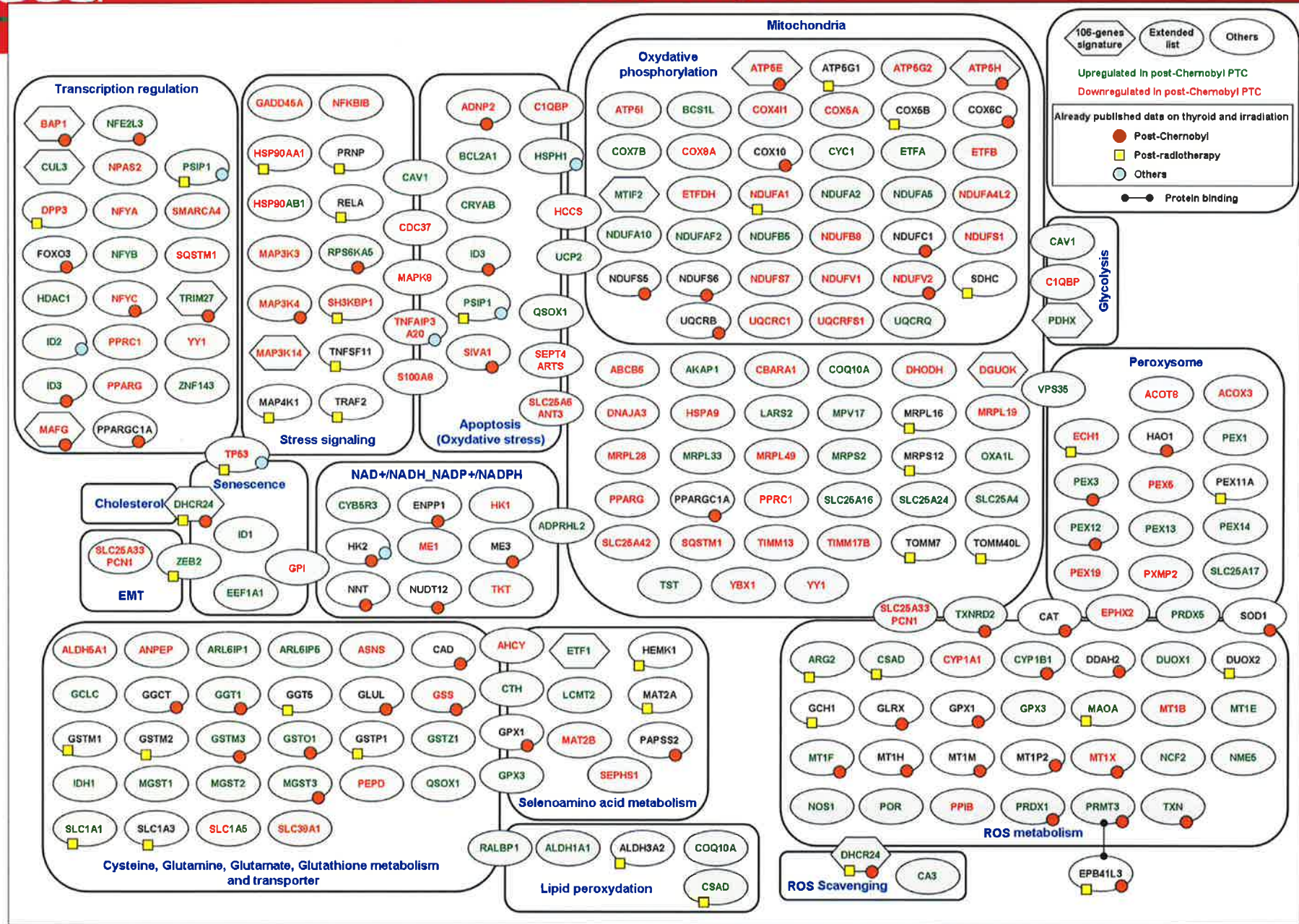
La voie WNT non canonique



La réparation des dommages de l'ADN et le contrôle de la stabilité génique



Reponse au stress oxydant



mTOR / stress du reticulum endoplasmique

