

## Détection de la maladie résiduelle dans le tissu ovarien et le tissu testiculaire humain, applicable aux enfants prépubères atteints d'un sarcome d'Ewing

L. Chaput,<sup>a</sup> V. Grèze,<sup>b,c,d</sup> J. Kanold,<sup>b,c,d</sup> P. Halle,<sup>d</sup> N. Robin,<sup>e,f</sup> B. Pereira,<sup>g</sup> A. Tchirkov,<sup>h,f</sup> L. Véronèse,<sup>h,f</sup> M. Canis,<sup>a</sup> AS. Grémeau,<sup>a</sup> JL. Pouly,<sup>a</sup> et F. Brugnon.<sup>a,f</sup>

### • Introduction

Le sarcome d'Ewing est une tumeur solide avec un haut potentiel métastatique et un risque majeur d'infertilité secondaire au traitement. Pour préserver la fertilité, la cryoconservation de tissu ovarien (TO) ou de tissu testiculaire (TT) est proposée. Se pose alors la question du risque de réintroduire des cellules cancéreuses lors de leur utilisation ultérieure.

→ L'objectif de ce travail est la validation d'une technique sensible et spécifique de détection de la maladie résiduelle dans les TO et les TT, en vue d'une application clinique.

### • Matériels et Méthodes

- 10 TO entourant des kystes bénins de l'ovaire (Age moyen:  $31 \pm 8$  ans).
- 11 TT restant après extraction des spermatozoïdes de biopsies testiculaires (Age moyen:  $37 \pm 5$  ans).
- Cryoconservation** des TO et TT par **congélation lente** ou « **à sec** » dans de l'azote liquide.
- Après décongélation, **contamination** des tissus avec une quantité croissante (10, 100 et 1000) de **cellules immortalisées de sarcome d'Ewing (RD-ES)**.
- RT-qPCR** : Détection du transcript de fusion spécifique du sarcome d'Ewing (**EWS-FLI1 type 2**).
- Coculture** de TO avec cellules RD-ES (14 jours) suivie d'une analyse **histologique** standard et **FISH** **tissulaire**.

### • Résultats

-Les quantités d'ARN extrait à partir des tissus n'étaient pas significativement différentes, quelle que soit la méthode de congélation utilisée.

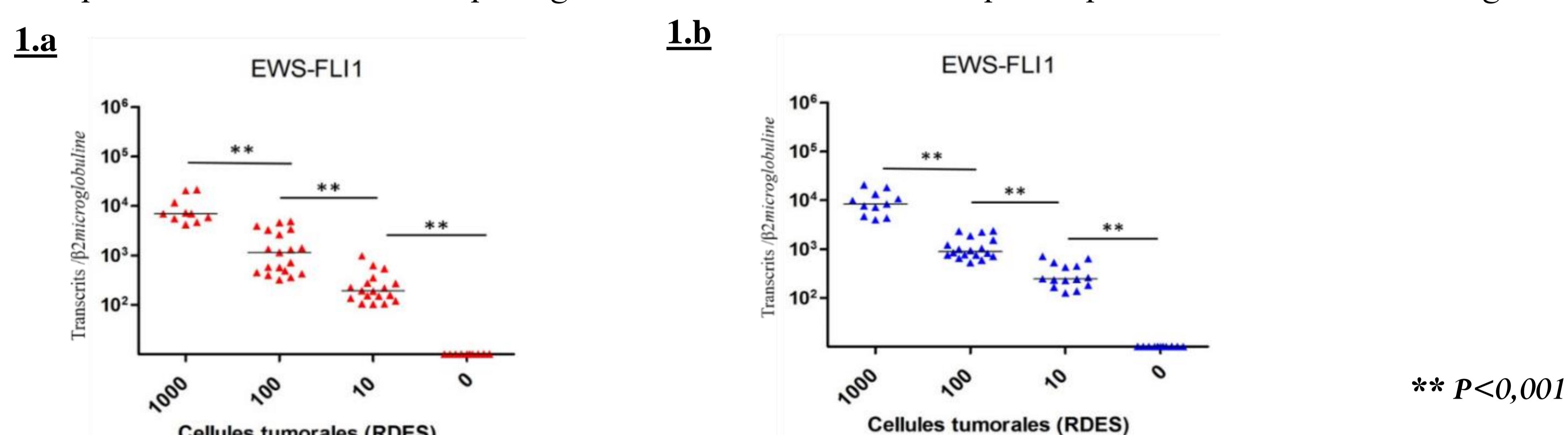
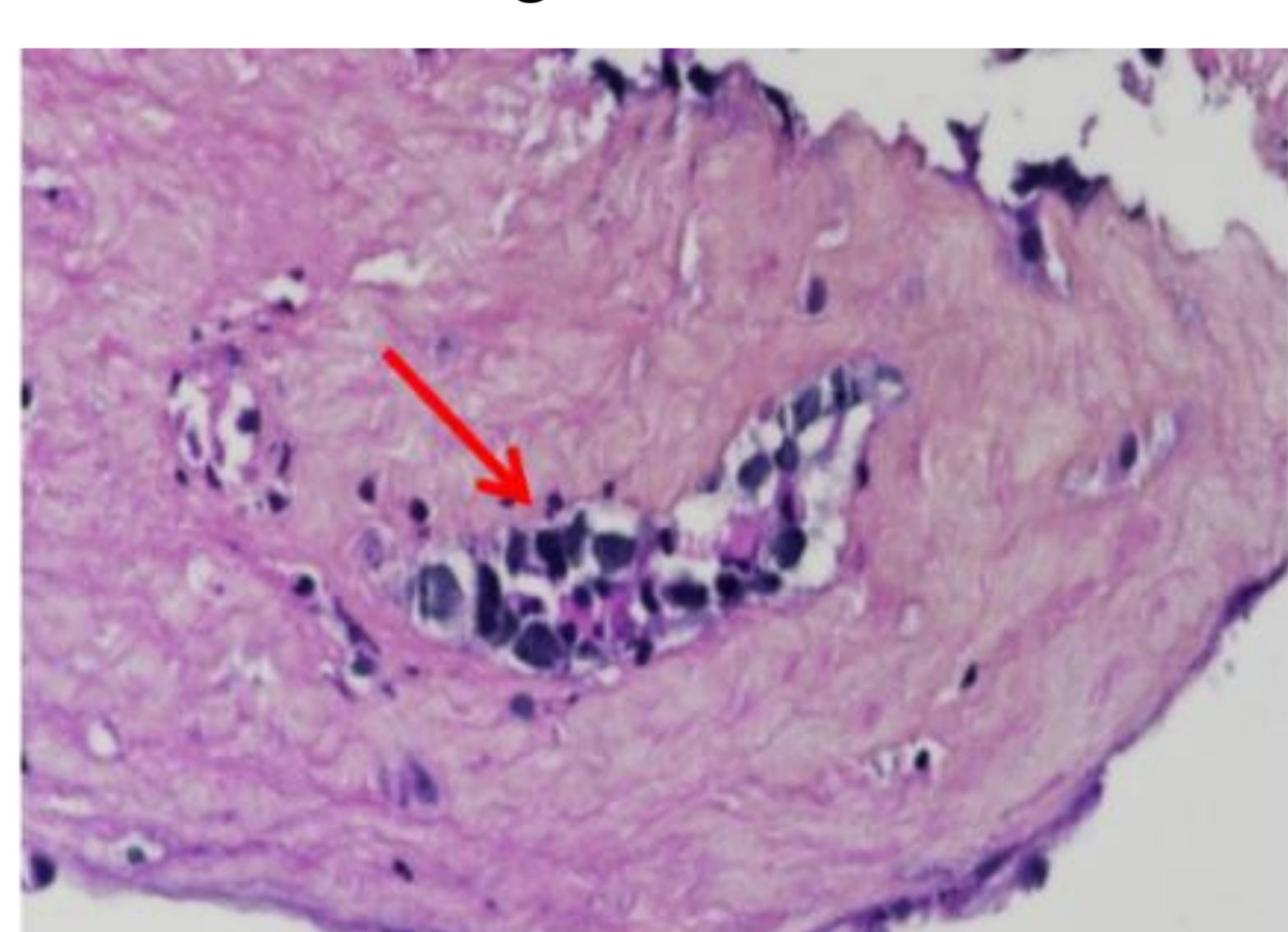


Figure 1: Détection par RT-qPCR du transcript **EWS-FLI1** dans les tissus ovariens (n=10) (1.a) et dans les tissus testiculaires (n=11) (1.b)

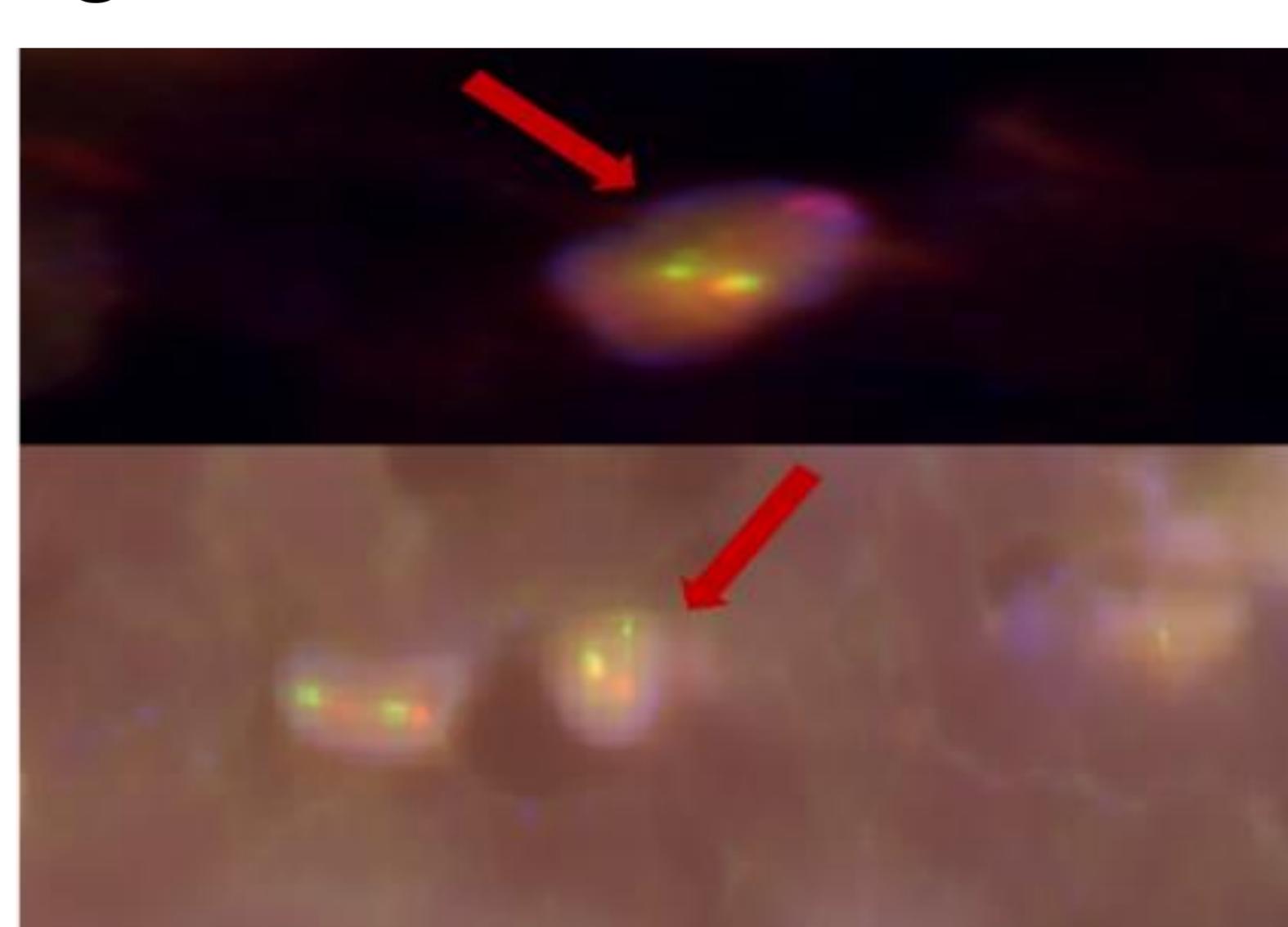
-Dès la présence de **10 cellules RD-ES**, l'expression du transcript **EWS-FLI1 (type 2)** a été détectée par RT-qPCR dans les TO et les TT (Figure 1) et n'a jamais été retrouvée dans le tissu non contaminé.

-L'expression du transcript est proportionnelle à la quantité de cellules tumorales présentes ( $p < 0,001$ ) dans le TO (Figure 1.a) et le TT (Figure 1.b) **sans différence significative selon la méthode de congélation**.



Coupe de cortex ovarien à J14 après co-culture avec cellules RD-ES, coloration HES (x 40).

Figure 2: Analyse histologique



Analyse par FISH (sonde EWSR1) de coupes de cortex ovarien à J14 de co-culture avec cellules RD-ES.

Figure 3: FISH tissulaire

Les analyses **histologiques** (Figure 2) et **FISH** (Figure 3) ont mis en évidence des **cellules RD-ES** (symbolisées par les flèches rouges) présentes **dans les TO** après coculture.

### • Conclusion/Discussion

Nous avons pu valider une méthode de **détection sensible et spécifique** de la **maladie résiduelle** du sarcome d'Ewing pour les **tissus germinaux** déjà congelés et ceux à venir. En perspective, ces résultats préliminaires devront être validés par l'analyse des tissus germinaux de patient(e)s présentant un sarcome d'Ewing.