

# Quoi de neuf ? Biologie des sarcomes des tissus mous

**Frédéric Chibon**  
GBS - INSERM U1218  
Institut Bergonié  
Bordeaux

**Hélène Antoine-Poirel**  
Centre de Génétique Humaine  
Cliniques univ saint-Luc - UCL  
Bruxelles

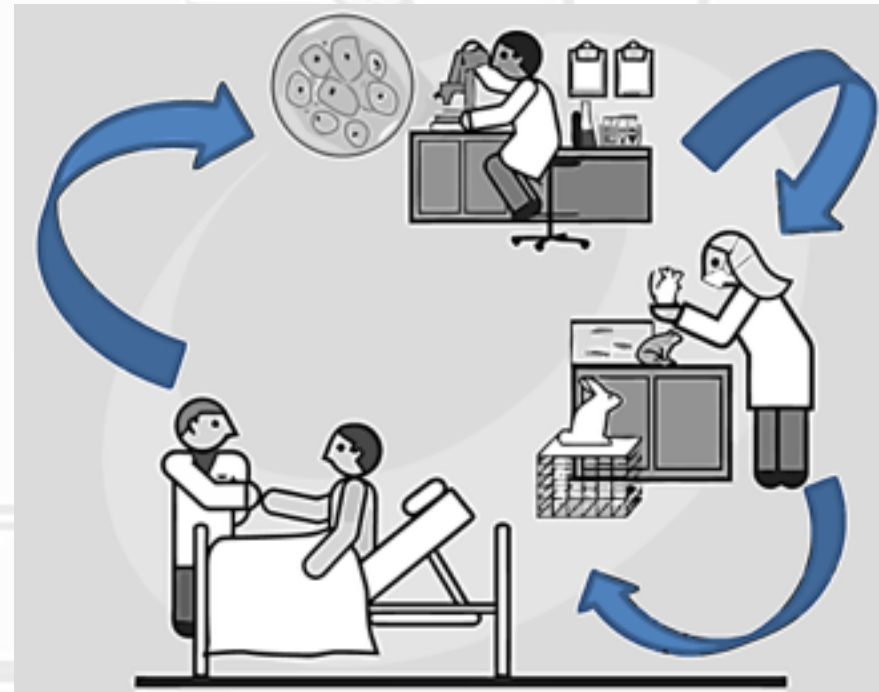


Cliniques universitaires  
**SAINT-LUC**  
UCL BRUXELLES

# Quoi de neuf ?

## Biologie des sarcomes des tissus mous

- Pas de grand scoop
- Progrès dans la compréhension des mécanismes physiopathogéniques utiles pour la prise en charge des patients
  - Classification diagnostique
  - Score pronostique
  - Cibles thérapeutiques



# Plan

- **STS & RNASeq**
  - [Lesluyes T et al, Europ J Cancer 2016]
- **STS & génomique**
  - [Kanohia D et al, Oncotarget 2015]
- **STS & MDM2**
  - [Riscal R et al, Mol Cell 2016 Accepted]
- **STS & épigénétique**
  - [Keung EZ et al, JCI 2015]
  - [Nielsen TO et al, Cancer Discovery 2015]
  - [Nakazawa MS et al, Nat Communications 2015]
- **STS & approche intégrée analyse génétique & épigénétique**
  - [Seki M et al, Nat Communications 2015]
- **STS & cellule souche mésenchymateuse**
  - [Guarnerio J et al, Cancer Discovery 2015]



## ORIGINAL RESEARCH

## RNA sequencing validation of the Complexity INDEX in SARComas prognostic signature



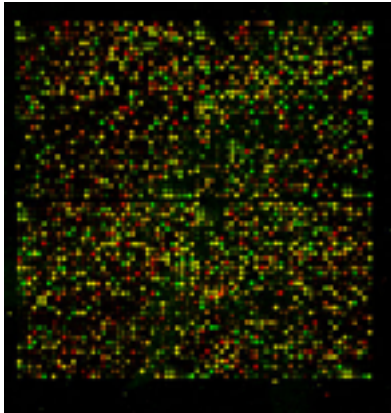
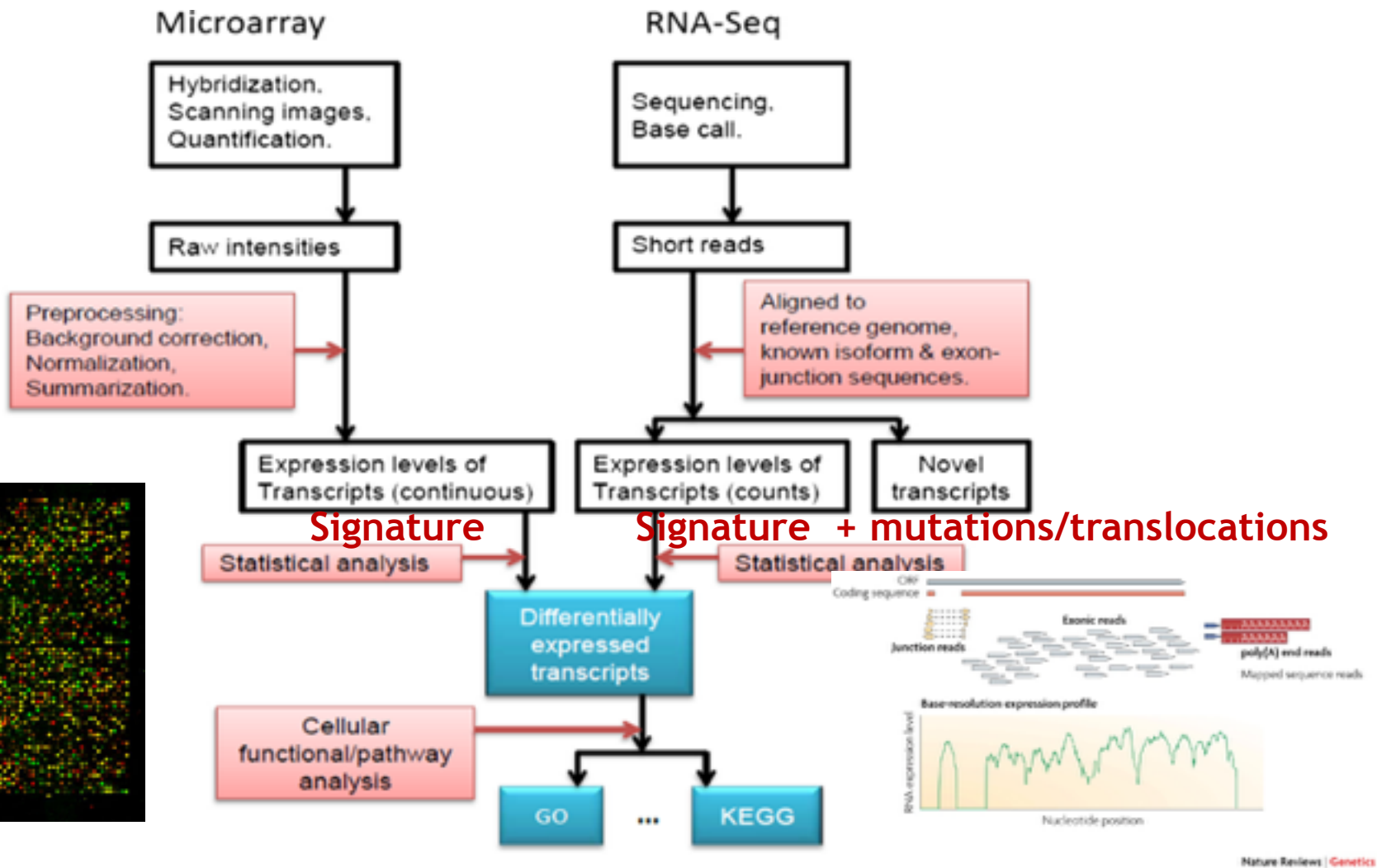
Tom Lesluyes <sup>a,b,c</sup>, Gaëlle Pérot <sup>a,d</sup>, Marine Roxane Largeau <sup>a,b</sup>,  
 Céline Brulard <sup>a</sup>, Pauline Lagarde <sup>a</sup>, Valérie Dapremont <sup>d</sup>,  
 Carlo Lucchesi <sup>a,c</sup>, Agnès Neuville <sup>a,d</sup>, Philippe Terrier <sup>c</sup>,  
 Dominique Vince-Ranchère <sup>f</sup>, Maria Mendez-Lago <sup>g</sup>, Marta Gut <sup>g</sup>,  
 Ivo Gut <sup>g</sup>, Jean-Michel Coindre <sup>a,d,h</sup>, Frédéric Chibon <sup>a,d,\*</sup>

## Contexte

- Prédiction de la survenue de métastases dans les sarcomes tissus mous de l'adulte : limite de la stratification thérapeutique reposant sur le type histologique et le grade FNCLCC
- **Valeur prédictive** de la signature pronostique Complexity Index in SARComas (CINSARC) dans les sarcomes avec **génétique complexe**, GIST, sarcomes synoviaux, carcinomes du sein, lymphomes [*Chibon F et al, Nat Med 2010*]
  - Profil d'expression d'un set de 67 gènes impliqués dans la complexité génomique (contrôle mitotique et intégrité chromosomique)

**Test** ➤ Technique micro-array sur tissu congelé

- **Transfert technologique** (technique & matériel) : évaluation du profil d'expression des 67 gènes par une technique NGS (RNA-seq) sur tissu FFPE



Rétrospectif

Biais de sélection (sonde)

Pb transcriptome de référence

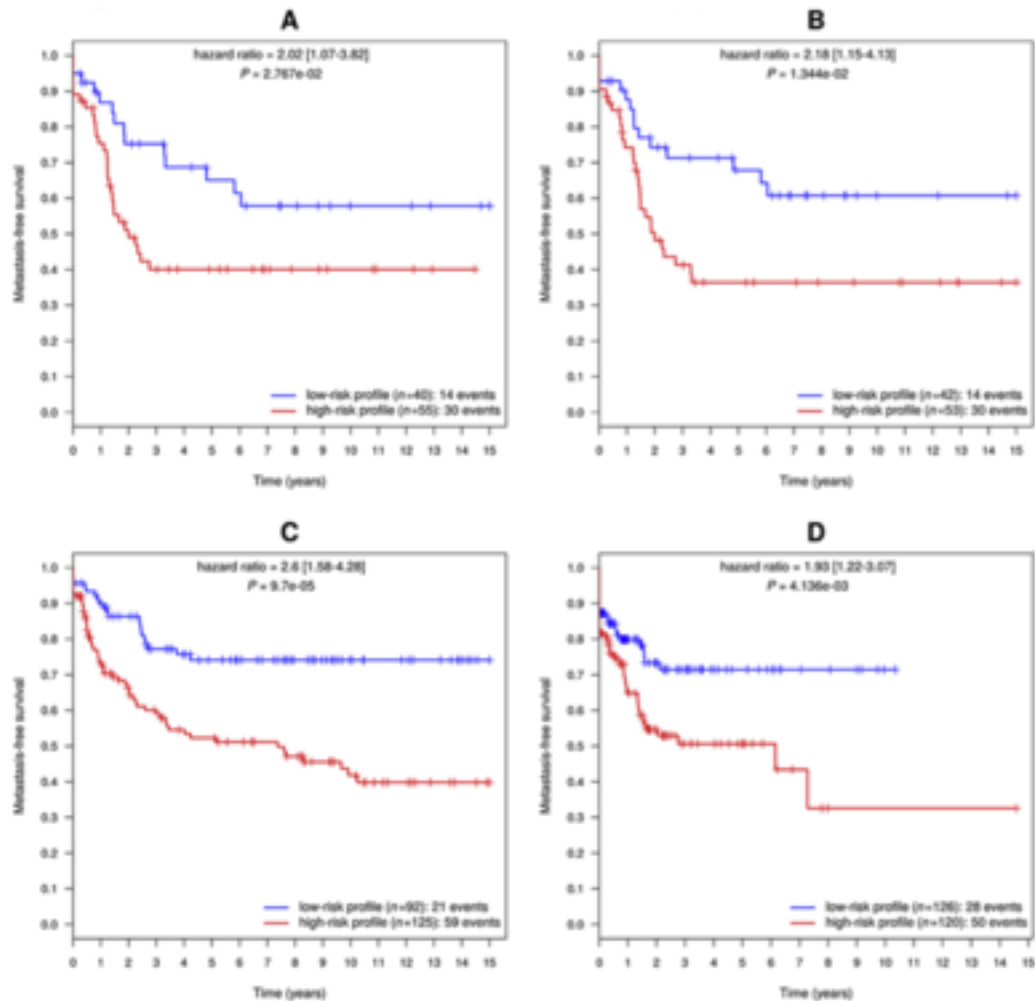
Prospectif

Non

Non

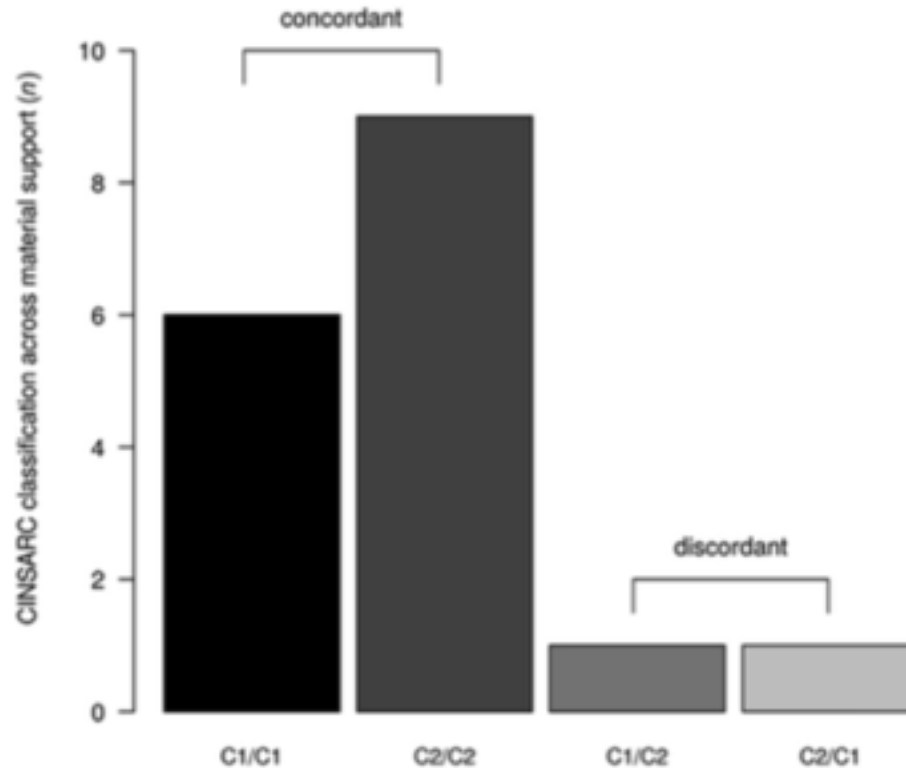
Meilleure reproductibilité

- Bonne corrélation des profils d'expression des 67 gènes du panel CINSARC ( $r=0,84$ )
- La signature CINSARC reste un facteur pronostique significatif pour la survenue de métastases par les 2 techniques
- Avec une classification similaire des groupes à risque (77%)



➤ Tissus FFPE vs congelés :

Concordance (88%) pour les qualités d'ARN FFPE 3 & 4 sur une échelle de 1 à 4



➤ Pour l'utilisation clinique :

- Optimisation technique (cf extraction ARN,...)
- Validation dans 2 essais cliniques européens en cours



Published in final edited form as:

*Cancer Discov.* 2015 April ; 5(4): 396–409. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1022.

## **A genetic platform to model sarcomagenesis from primary adult mesenchymal stem cells**

Jlenia Guarnerio<sup>1</sup>, Luisa Riccardi<sup>1</sup>, Riccardo Taulli<sup>1</sup>, Takahiro Maeda<sup>2</sup>, Guocan Wang<sup>1</sup>, Robin M. Hobbs<sup>1</sup>, Min Sup Song<sup>1</sup>, Paolo Sportoletti<sup>1</sup>, Rosa Bernardi<sup>3</sup>, Roderick T. Bronson<sup>4</sup>, Mireia Castillo-Martin<sup>5</sup>, Carlos Cordon-Cardo<sup>5</sup>, Andrea Lunardi<sup>1,6,\*</sup>, and Pier Paolo Pandolfi<sup>1,\*</sup>

## Hypothèses

- Initiation de l'oncogénèse des sarcomes dans une cellule souche mésenchymateuse (MSC) adulte
- Dérégulation combinée de gènes impliqués dans :
  - prolifération / apoptose
  - régulation de la différenciation des cellules souches

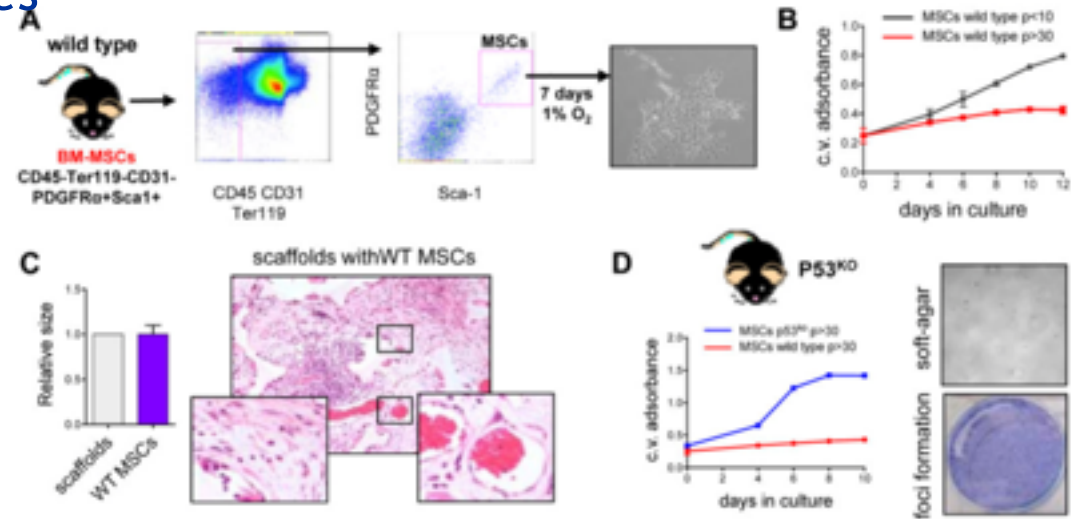
## Test

- Plateforme de génétique fonctionnelle in vitro et in vivo d'étude des sarcomes indifférenciés de l'adulte

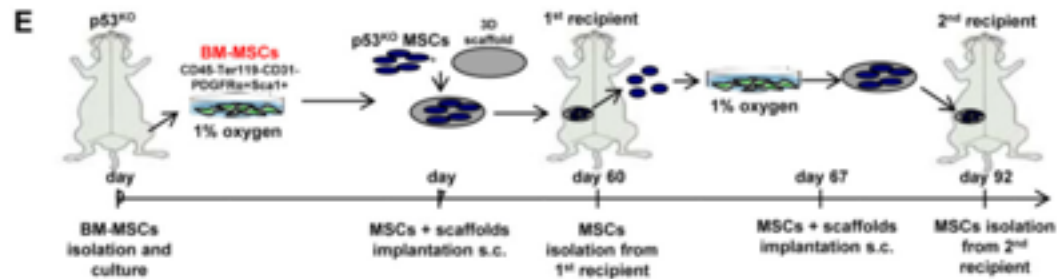


# Modèle cellulaire

➤ Isolement d'une population enrichie en MSC à partir de cellules médullaires murines



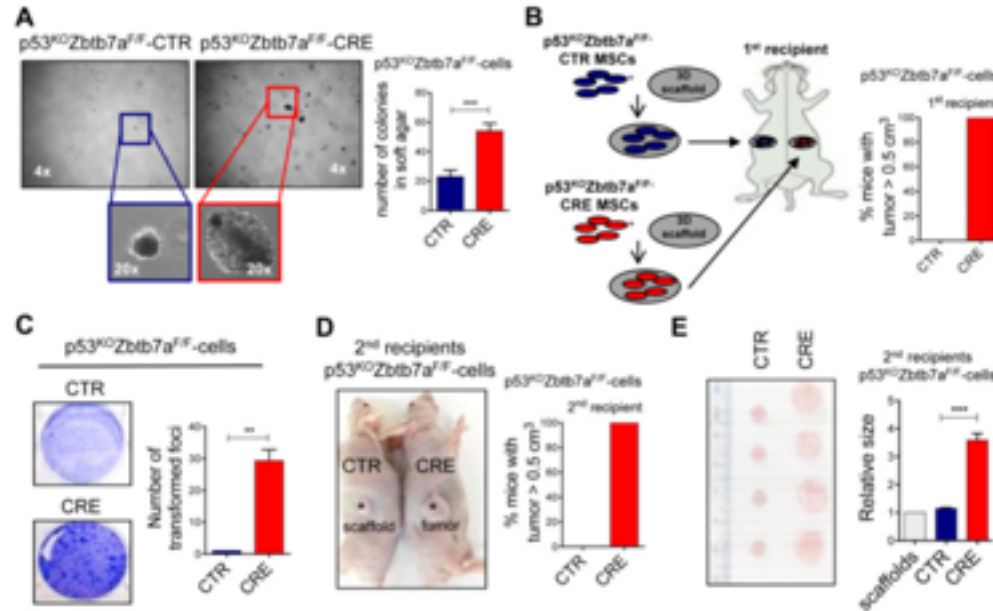
➤ Culture in vitro dans des conditions hypoxiques (cf environnement médullaire naturel) empêchant leur transformation spontanée



➤ La perte de p53 seul n'entraîne pas le développement de tumeurs

# Test du modèle de sarcomagenèse

➤ LRF (gène *ZBTB7A*) : régulateur de la différenciation de cellules souches



➤ Le KO de LRF induit la formation de sarcomes

➤ LRF joue son rôle suppresseur de tumeur par régulation de la différenciation des MSC via la répression transcriptionnelle de *DKL1*

➤ Et dans les vraies tumeurs humaines ?

➤ Caractérisation fonctionnelle des nouvelles altérations géniques

➤ Test de l'efficacité de nouveaux traitements ciblés

## Genomic landscape of liposarcoma

Deepika Kanojia<sup>1</sup>, Yasunobu Nagata<sup>2</sup>, Manoj Garg<sup>1</sup>, Dhong Hyun Lee<sup>3</sup>, Aiko Sato<sup>2</sup>, Kenichi Yoshida<sup>2</sup>, Yusuke Sato<sup>2</sup>, Masashi Sanada<sup>2,4</sup>, Anand Mayakonda<sup>1</sup>, Christoph Bartenhagen<sup>5</sup>, Hans-Ulrich Klein<sup>5</sup>, Ngan B. Doan<sup>6</sup>, Jonathan W. Said<sup>6</sup>, S. Mohith<sup>1</sup>, Swetha Gunasekar<sup>1</sup>, Yuichi Shiraishi<sup>7</sup>, Kenichi Chiba<sup>7</sup>, Hiroko Tanaka<sup>8</sup>, Satoru Miyano<sup>7,8</sup>, Ola Myklebost<sup>9,10</sup>, Henry Yang<sup>1</sup>, Martin Dugas<sup>5</sup>, Leonardo A. Meza-Zepeda<sup>9</sup>, Allan W. Silberman<sup>11</sup>, Charles Forscher<sup>3</sup>, Jeffrey W. Tyner<sup>12</sup>, Seishi Ogawa<sup>2,\*</sup> and H. Phillip Koeffler<sup>1,3,13,\*</sup>

## Contexte

### ➤ Liposarcome (LPS) :

- |  |   |
|--|---|
| 1. Atypical Lipomatous tumor / Well Differentiated LPS | } Amplification<br>MDM2, CDK4 / 12q13-<br>15<br>EWS/ EWSR1-DDIT3<br>Mut TP53, RB1, NF1<br>Mut PIK3CA, KIT |
| 2. DeDifferentiated LPS                                |   |
| 3. Myxoid LPS  |   |
| 4. Pleomorphic LPS                                     |   |
| 5. Mixed-type LPS                                      |   |

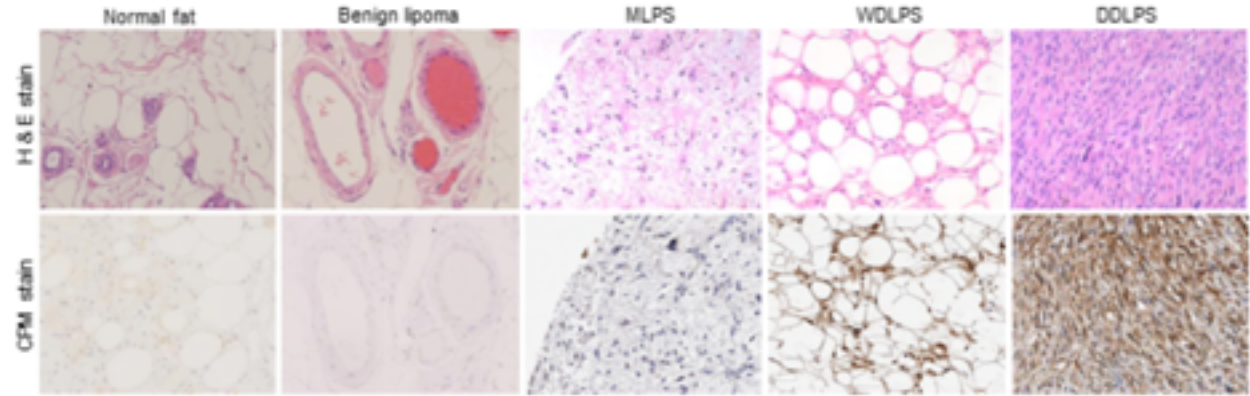
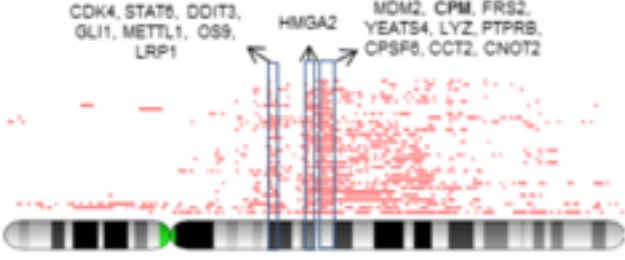
### ➤ absence d'alternatives thérapeutiques efficaces à la chirurgie

## Test

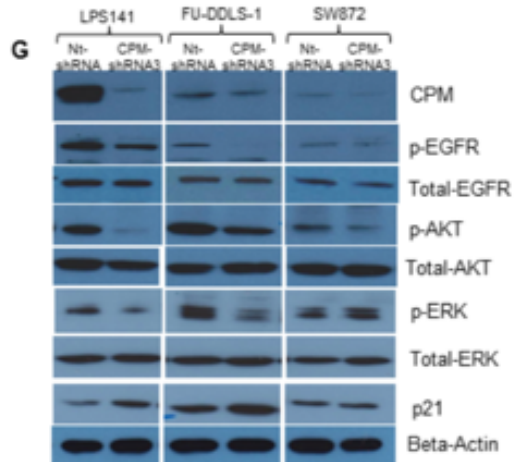
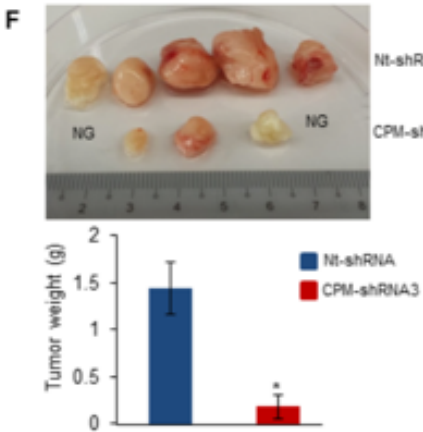
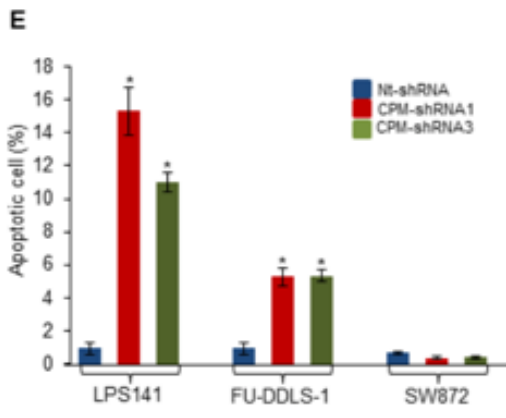
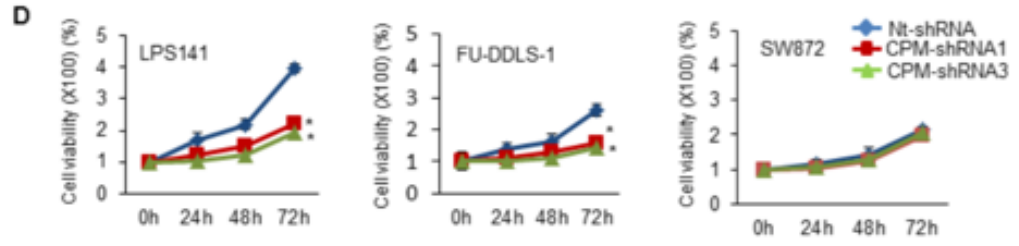
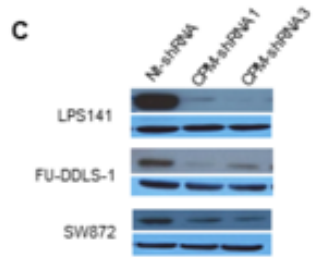
- Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans les différents types de LPS par une approche intégrée :
  - Déséquilibres génomiques (SNP-array)
  - Séquençage NGS pan-exomique & exomique ciblé
- 86 LPS et 13 lignées cellulaires

# 1/ SNP-array :

➤ Amplifications du gène **CPM** (Carboxypeptidase)/12q15 dans 78% des WD/DDLPS

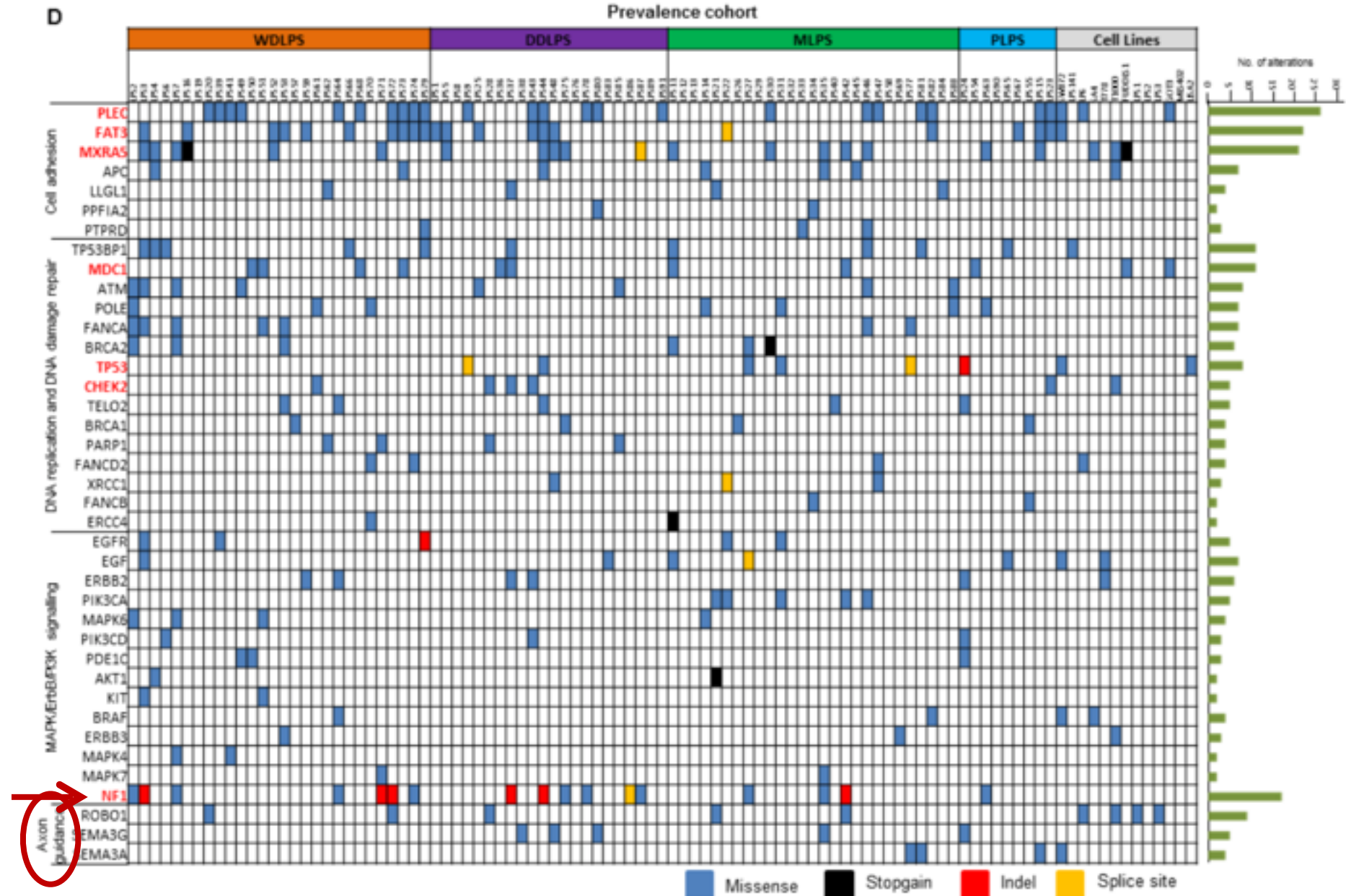


➤ CPM → rôle oncogénique via la voie de signalisation EGFR ?

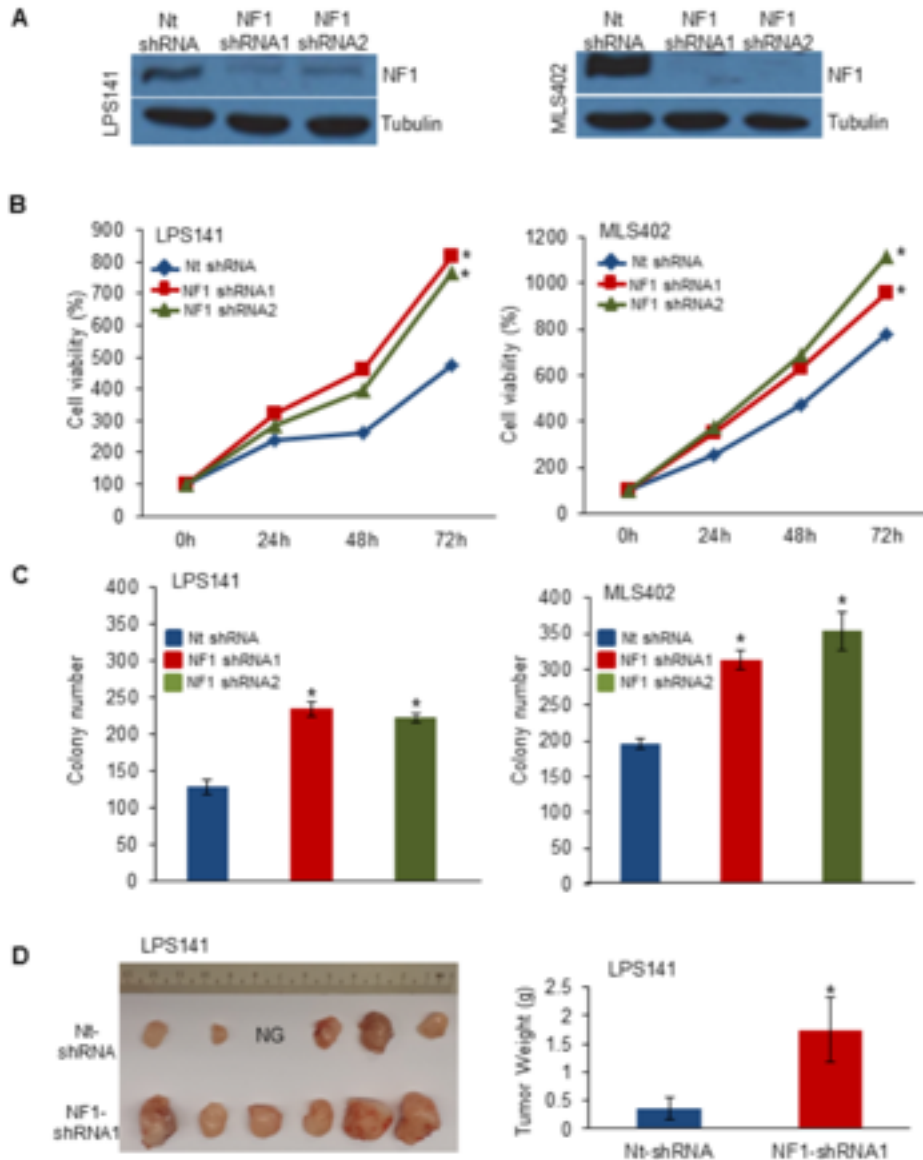


## 2/ Séquençage exomique :

➤ Hétérogénéité génétique des LPS, absence d'anomalies « spécifiques »



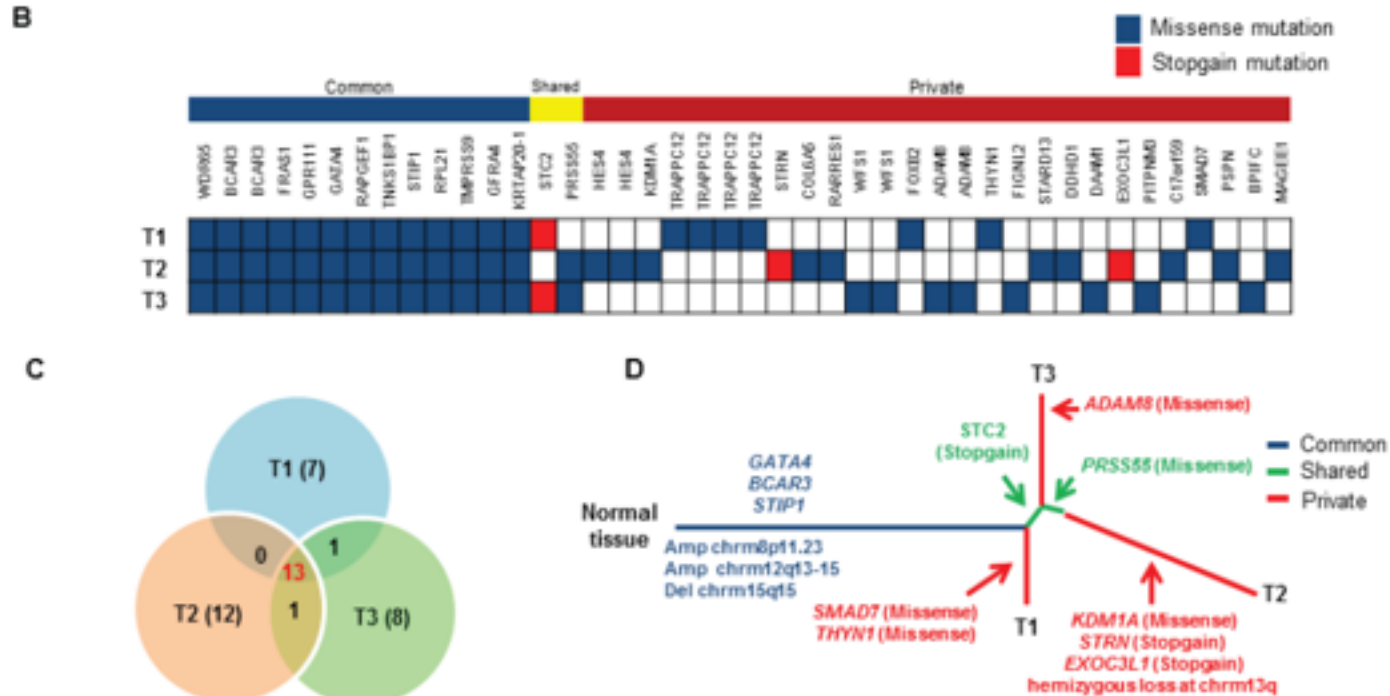
# ➤ Mutations du gène NF1 dans 20% des LPS



➤ **NF1** → rôle de suppresseur de tumeur qui participerait à la progression tumorale

# Hétérogénéité intratumorale :

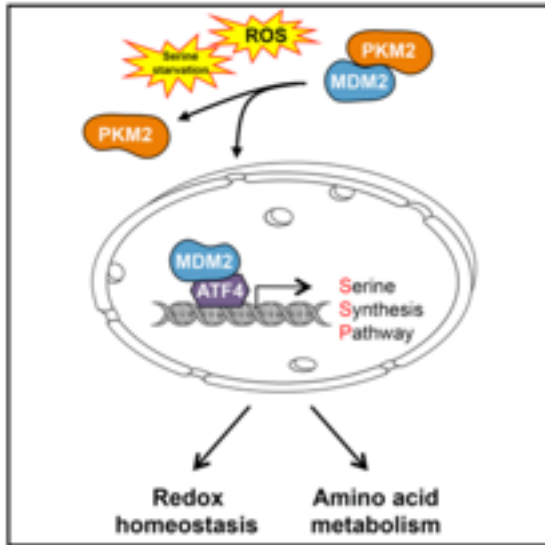
➤ 3 biopsies d'une même tumeur : 31% de mutations communes



➔ Représentativité d'une biopsie en 1 seul site ?

## Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53

### Graphical Abstract



### Authors

Romain Riscal, Emilie Schrepfer, Giuseppe Arena, ..., Jean-Emmanuel Sarry, Laurent Le Cam, Laetitia K. Linares

### Correspondence

laurent.lecam@inserm.fr (L.L.C.), laetitia.linares@inserm.fr (L.K.L.)

### In Brief

Riscal et al. show that the proto-oncogene MDM2 is recruited to chromatin through direct binding to ATF4 but independently of its well-known partner, p53. Chromatin-bound MDM2 regulates a transcriptional program involved in amino acid metabolism and redox homeostasis that contributes to cancer cell proliferation and tumor growth.



BIOSARC 2015  
Paris

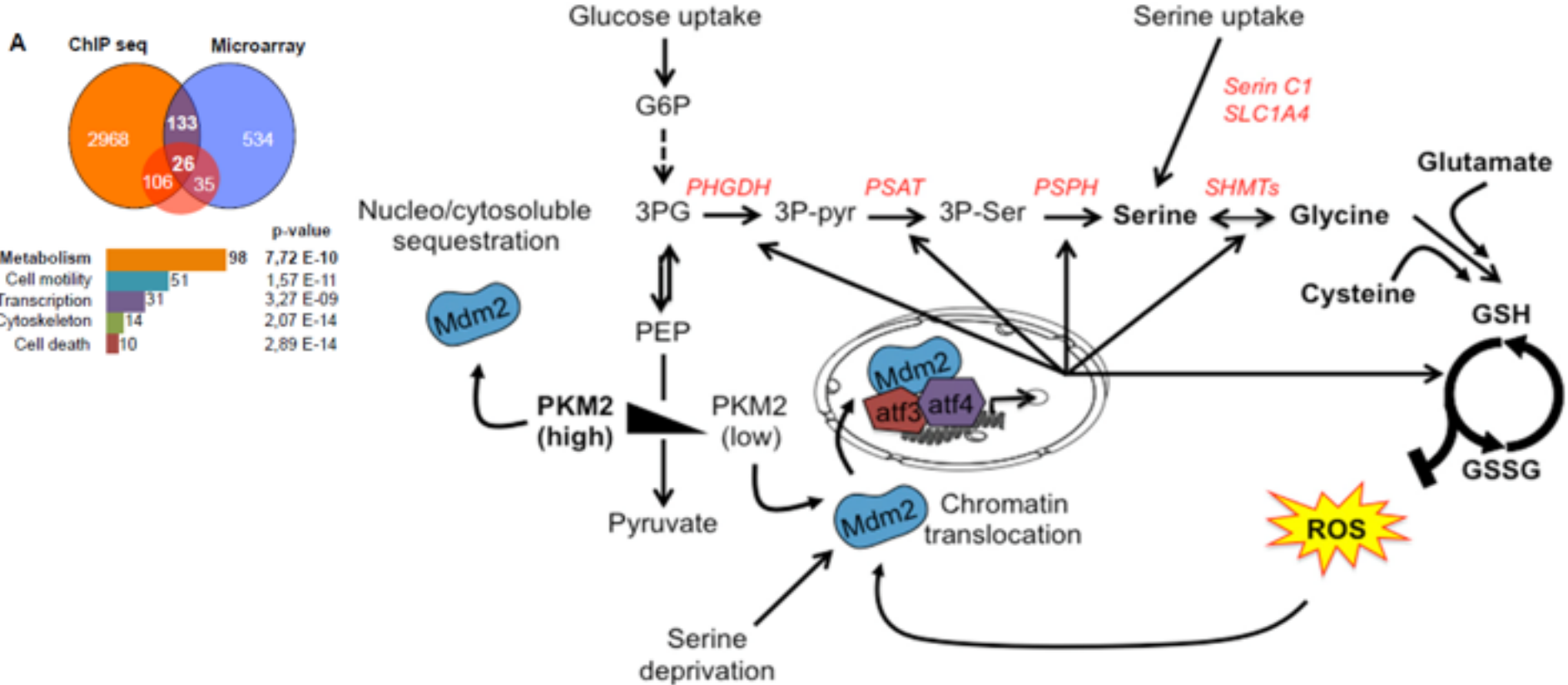
## Contexte

- MDM2 est un régulateur négatif majeur de p53 (contrôle de l'intégrité du génome - cycle cellulaire - apoptose)
- Fréquemment surexprimé dans différents types de cancers humains
- Mutation TP53 & dérégulation de MDM2 mutuellement exclusives
- Mais - des tumeurs peuvent avoir les 2
  - augmentation de sarcomes chez les souris ayant les 2 vs celles

## p53 KO Hypothèse

- L'oncogenèse induite par MDM2 ne serait pas seulement p53 dépendante



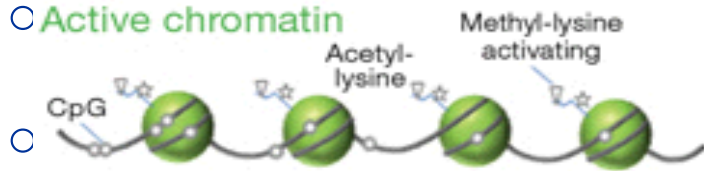


- MDM2 est recruté à la chromatine indépendamment de p53 pour réguler
  - le métabolisme de la sérine
  - l'homéostasie redox
 via une activation de la transcription ATF dépendante
- Favorise la croissance des cellules cancéreuses en conditions de déprivation exogène de sérine / glycine ou de stress oxydatif
- Nouveau rôle de MDM2 p53-indépendant dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses

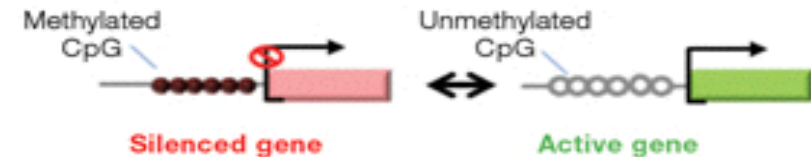
# Epigénétique

- régulation de la transcription des gènes sans modification de la séquence d'ADN
- Réversible
- Mécanismes responsables du processus de remodelage de la chromatine sont :

## ○ Active chromatin



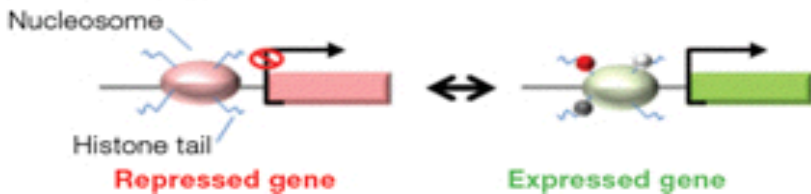
## DNA methylation



## Inactive chromatin



## Histone modifications



- Processus régulés par des complexes enzymatiques multiprotéiques de remodelage de la chromatine ATP-dépendant dont
  - le complexe activateur SWI/SNF
  - les complexes répresseurs du groupe Polycomb (PRC1 & PRC2/EZH2)Fonctions antagonistes de SWI/SNF et PCR2/EZH2 pour affiner les niveaux d'expression génique
- Modifications épigénétiques aberrantes dans l'oncogénèse :
  - Acétylations ou méthylations aberrantes
  - Dérégulation des complexes qui régulent ces processus

# Increased H3K9me3 drives dedifferentiated phenotype via KLF6 repression in liposarcoma

Emily Z. Keung,<sup>1,2,3</sup> Kadir C. Akdemir,<sup>1</sup> Ghadah A. Al Sannaa,<sup>4</sup> Jeannine Garnett,<sup>2</sup> Dina Lev,<sup>5</sup> Keila E. Torres,<sup>2</sup> Alexander J. Lazar,<sup>4</sup> Kunal Rai,<sup>1</sup> and Lynda Chin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genomic Medicine and <sup>2</sup>Department of Surgical Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. <sup>3</sup>Department of Surgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. <sup>4</sup>Department of Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. <sup>5</sup>Department of Surgery, Sheba Medical Center, Tel Aviv, Israel.

<b>Contexte</b>	<b>WDLPS</b> Bas grade Indolent	<b>versus</b>	<b>DDLPS</b> Haut grade Agressif, Métastases : 5-20%
-----------------	---------------------------------------	---------------	--

synchrone ou métachrone

Même amplification 12q14-15 ciblant MDM2 (100%) et CDK4 (90%)

➤ Pathogenèse mal comprise : **Est-ce que DDLPS dérive du WDLPS ou indépendant ?**

➤ Etude de l'ADN (séquençage, déséquilibre génomique), de l'ARN (expression, séquençage) des miRNA : peu de différences

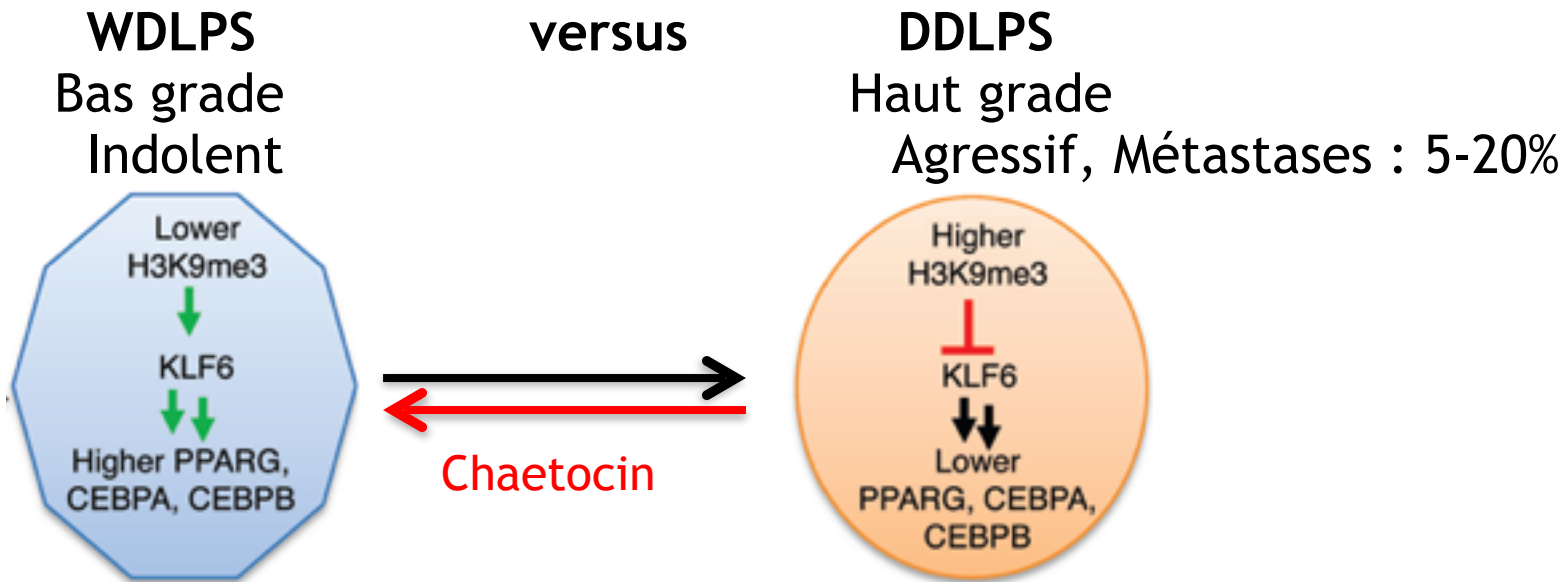
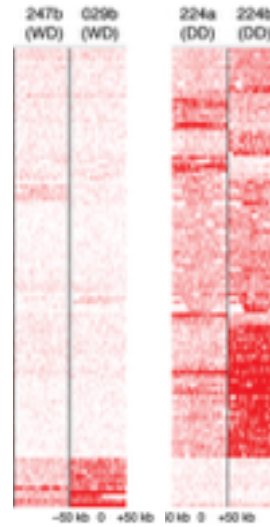
## Test

➤ Est-ce que des modifications épigénétiques peuvent expliquer les différences entre WDLPS & DDLPS ?

➤ Etude de 9 modifications épigénétiques par IHC sur 151 WDLPS & DDLPS (TMA)

- Gene repression : H3K9me3, H3K20me3, H3K27me3, 5mC
- Gene activation : H3K4me3, H3K27Ac, H3K36me2, H3K79me3

- L'histone méthyltransférase H3K9me3 est plus exprimée dans DDLPS >> WDLPS



- L'inhibition pharmacologique de H3K9me3 bloque la prolifération et induit une différenciation adipeuse dépendante de KLF6
- Base épigénétique de la transition WDLPS - DDLPS

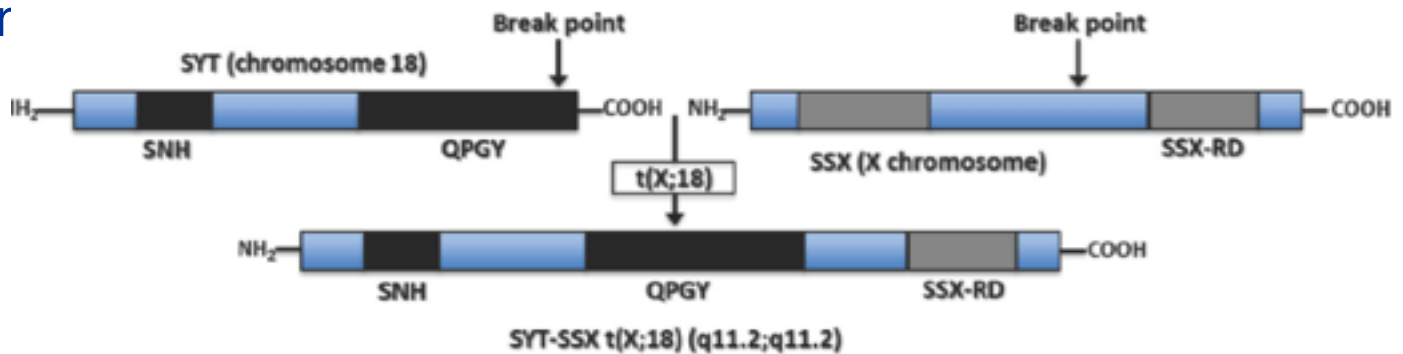
# REVIEW

## Synovial Sarcoma: Recent Discoveries as a Roadmap to New Avenues for Therapy

Torsten O. Nielsen<sup>1</sup>, Neal M. Poulin<sup>1</sup>, and Marc Ladanyi<sup>2</sup>

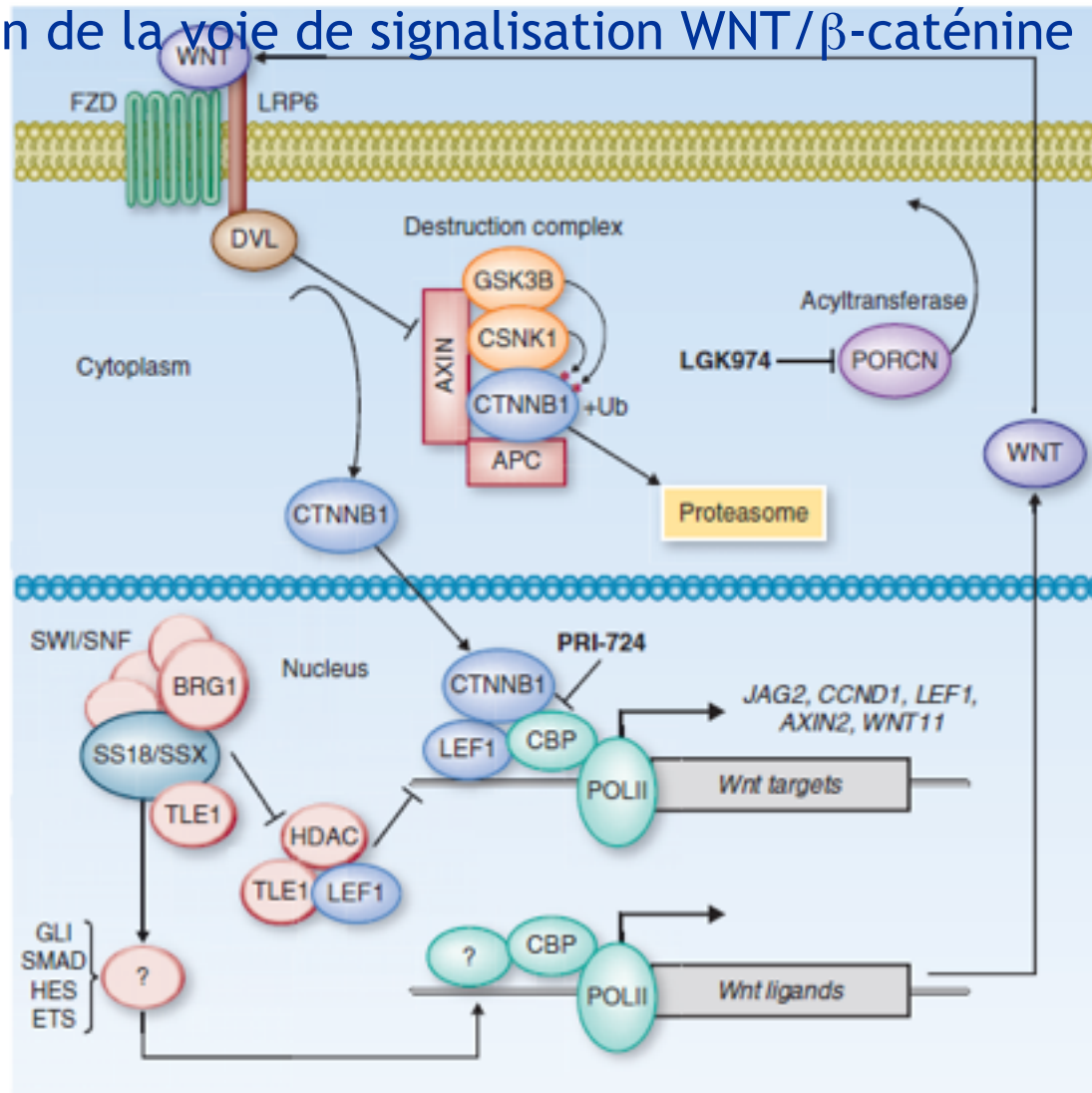
### Contexte

- Le terme sarcome synovial est impropre : cellule d'origine inconnue
- Morphologie suggestive d'une capacité de différenciation pluripotente
- Absence d'alternatives thérapeutiques efficaces à la chirurgie
- t(X18)(p11;q11) pathognomonique dans ~90-95% des SS → événement « dr » primaire



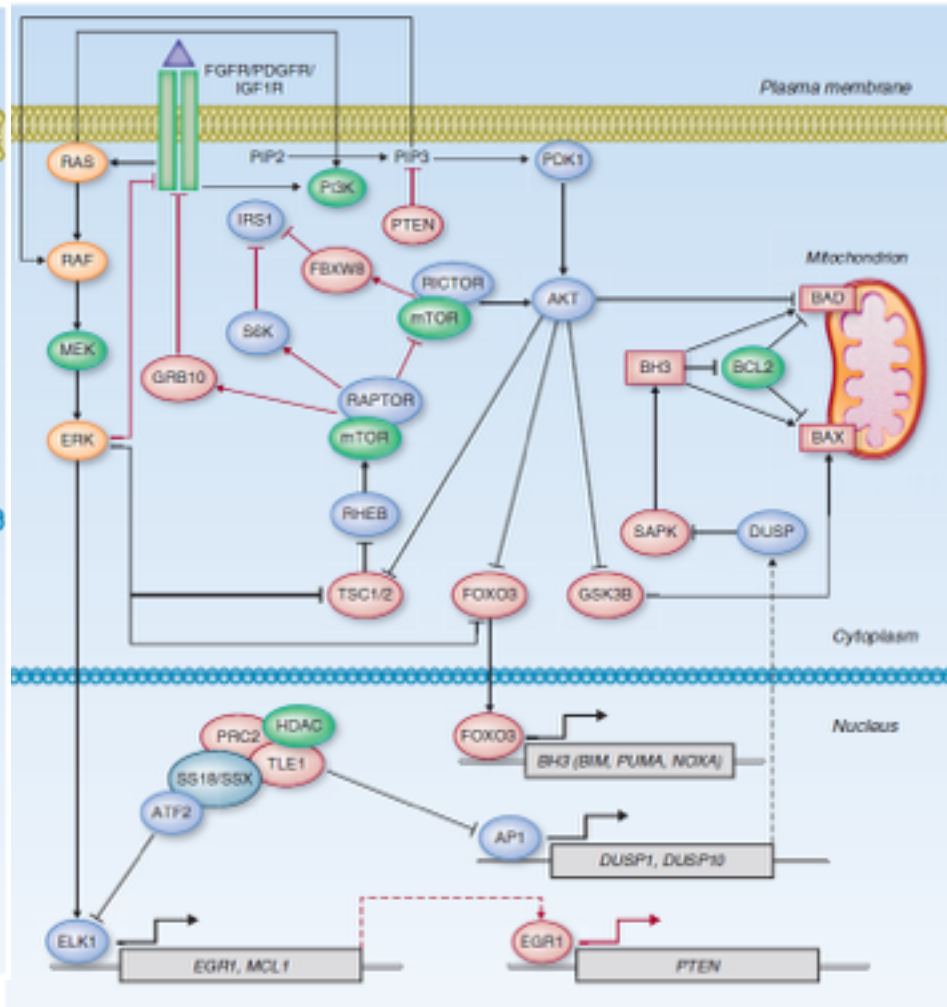
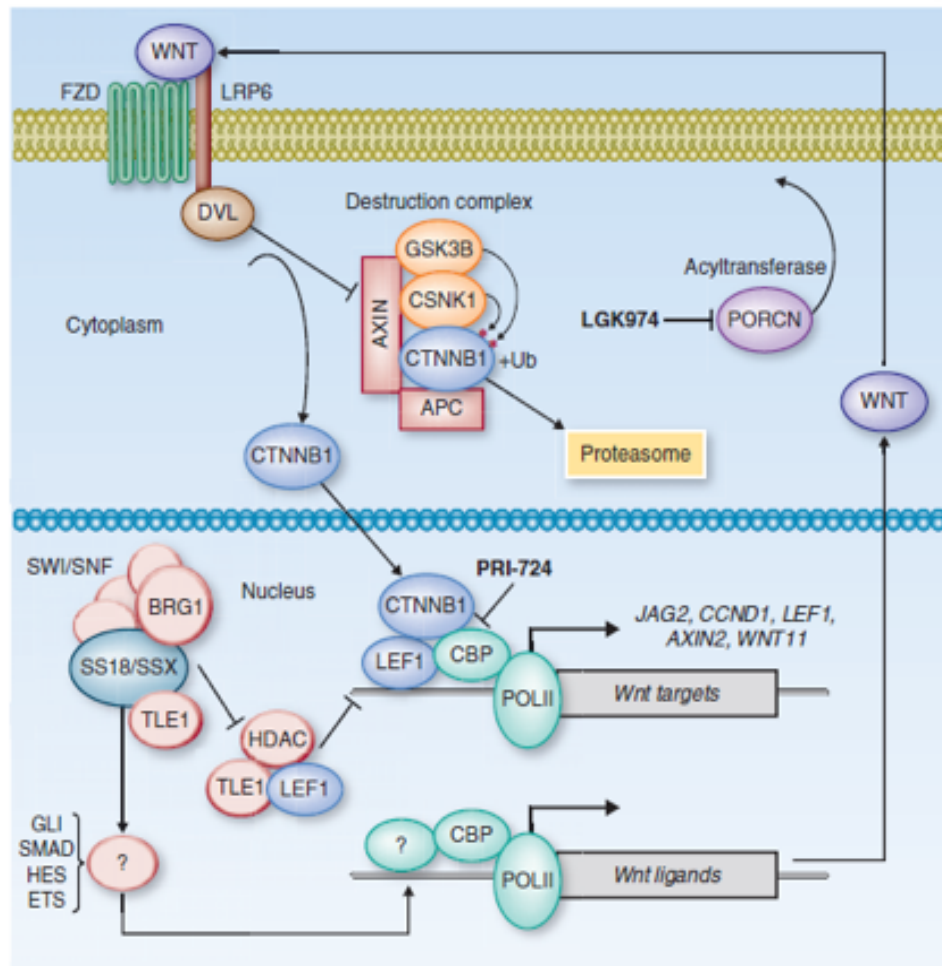
- Fusion entre la sous-unité  $\beta$  du complexe SWI/SNF (coactivateur transcriptionnel) et le domaine SSX associé au complexe répresseur polycomb d'un des 3 gènes test homologues (SSX1, 2, 4)
- Elucidation des mécanismes oncogéniques pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques

- La fusion survient dans une **cellule progénitrice mésenchymateuse immature**
- Le gène de fusion code pour un **perturbateur multiple du contrôle épigénétique**
  - Dérégulation du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF
  - Dérégulation de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine



# Cibles thérapeutiques dans le SS

- Voie de signalisation WNT/ $\beta$ -Catenin
- Voie de signalisation AKT/MTOR
- Voies antiapoptotiques



ARTICLE

Received 21 Apr 2015 | Accepted 21 Dec 2015 | Published 3 Feb 2016

DOI: 10.1038/ncomms10539

OPEN

# Epigenetic re-expression of HIF-2 $\alpha$ suppresses soft tissue sarcoma growth

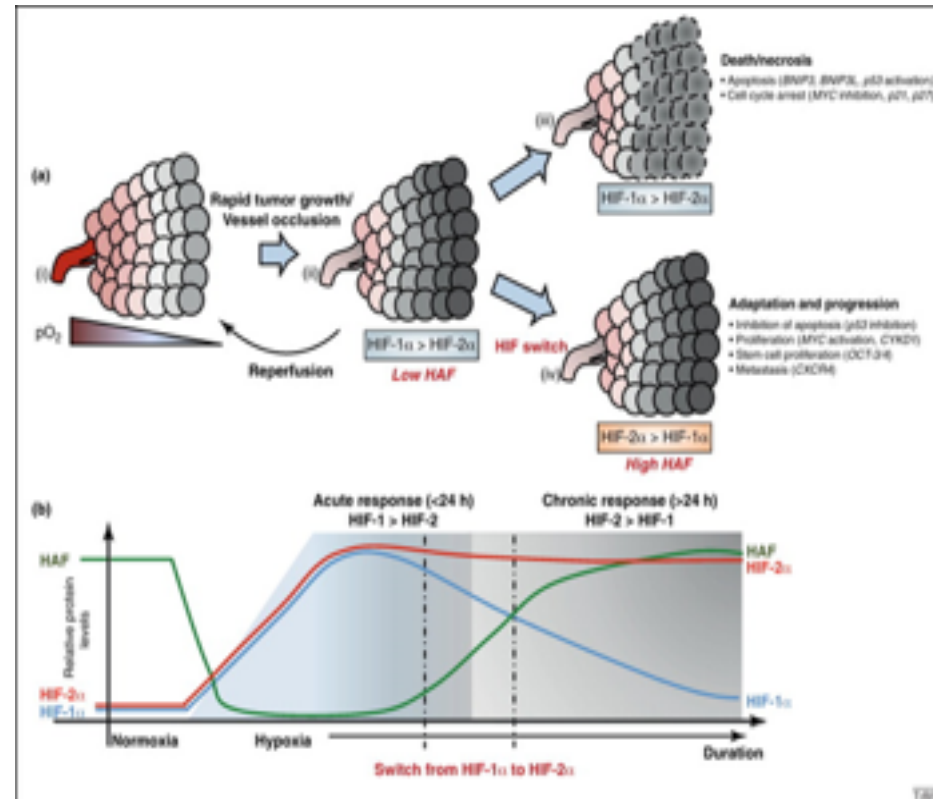
Michael S. Nakazawa<sup>1</sup>, T.S. Karin Eisinger-Mathason<sup>1,2</sup>, Navid Sadri<sup>1,3</sup>, Joshua D. Ochocki<sup>1</sup>, Terence P.F. Gade<sup>4</sup>, Ruchi K. Amin<sup>5</sup> & M. Celeste Simon<sup>1,2,5</sup>

## Contexte

- Dans les sarcomes des tissus mous, sarcomes pléomorphes indifférenciés, l'hypoxie intra-tumorale est un critère pronostique péjoratif
- Adaptation cellulaire via HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  : rôles contexte-dépendant
- HIF-1 $\alpha$  est un médiateur-clé pour les réponses transcriptionnelles à l'hypoxie et promeut les métastases dans les UPS &

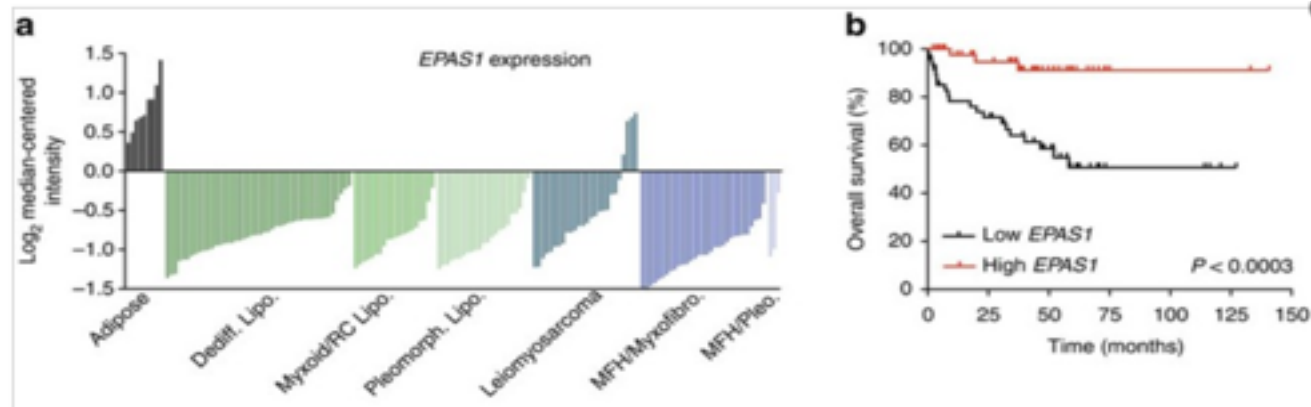
## Test fibrosarcomes

- Rôle de HIF-2 $\alpha$  (codé par le gène *EPAS1*) ?

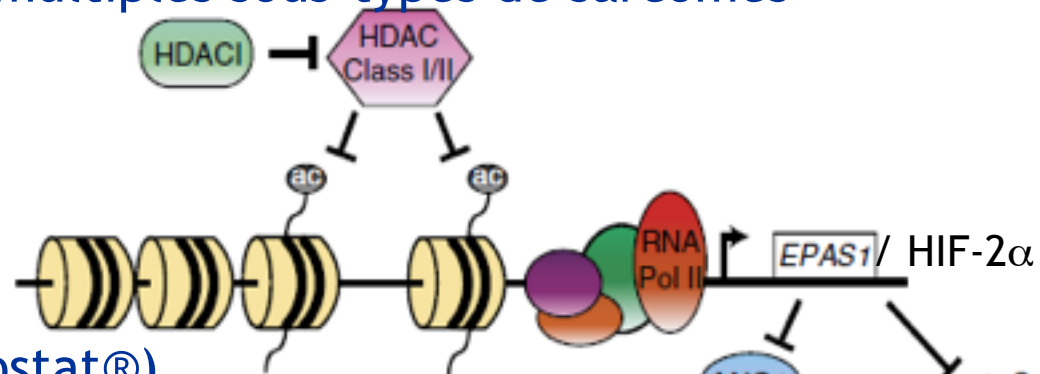




- HIF-2 $\alpha$  (*EPAS1*) inhibe la croissance des sarcomes des tissus mous de haut grade (UPS, FBS, LPS):  
Cf perte de HIF-2 $\alpha$  dans les sarcomes pléomorphiques indifférenciés et les liposarcomes dédifférenciés → activation de la signalisation mTORC1 → prolifération tumorale



- L'expression de HIF-2 $\alpha$  (*EPAS1*) est inhibée par des mécanismes épigénétiques dans de multiples sous-types de sarcomes



- HDAC inhibiteur (Vorinostat®)
    - augmente sélectivement HIF-2 $\alpha$  (*EPAS1*) mais pas HIF-1 $\alpha$
    - inhibe la croissance tumorale HIF-2 $\alpha$  (*EPAS1*) - dépendante
- 
- The signaling pathway diagram shows that increased *EPAS1*/HIF-2 $\alpha$  expression leads to increased Sarcoma proliferation. This is mediated by the ANO1 pathway: ANO1 (blue oval) is activated by HIF-2 $\alpha$ , leading to increased Ca<sup>2+</sup> signaling, which activates CAMKII (green oval). CAMKII then inhibits mTORC1 activity (indicated by a downward arrow). mTORC1 activity normally inhibits S6K1 (blue oval) and 4E-BP1 (blue oval). Inhibition of mTORC1 activity leads to increased phosphorylation (P) of S6K1 and 4E-BP1, which in turn promotes Sarcoma proliferation.

ARTICLE

Received 7 Jan 2015 | Accepted 20 May 2015 | Published 3 Jul 2015

DOI: 10.1038/ncomms8557

OPEN

## Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma

Masafumi Seki<sup>1\*</sup>, Riki Nishimura<sup>1\*</sup>, Kenichi Yoshida<sup>2,3</sup>, Teppei Shimamura<sup>4,5</sup>, Yuichi Shiraishi<sup>4</sup>, Yusuke Sato<sup>2,3</sup>, Motohiro Kato<sup>1,6,7</sup>, Kenichi Chiba<sup>4</sup>, Hiroko Tanaka<sup>8</sup>, Noriko Hoshino<sup>9</sup>, Genta Nagae<sup>10</sup>, Yusuke Shiozawa<sup>2,3</sup>, Yusuke Okuno<sup>3,11</sup>, Hajime Hosoi<sup>12</sup>, Yukichi Tanaka<sup>13</sup>, Hajime Okita<sup>14</sup>, Mitsuru Miyachi<sup>12</sup>, Ryota Souzaki<sup>15</sup>, Tomoaki Taguchi<sup>15</sup>, Katsuyoshi Koh<sup>7</sup>, Ryoji Hanada<sup>7</sup>, Keisuke Kato<sup>16</sup>, Yuko Nomura<sup>17</sup>, Masaharu Akiyama<sup>18</sup>, Akira Oka<sup>1</sup>, Takashi Igarashi<sup>1,19</sup>, Satoru Miyano<sup>4,8</sup>, Hiroyuki Aburatani<sup>10</sup>, Yasuhide Hayashi<sup>20</sup>, Seishi Ogawa<sup>2,3</sup> & Junko Takita<sup>1</sup>

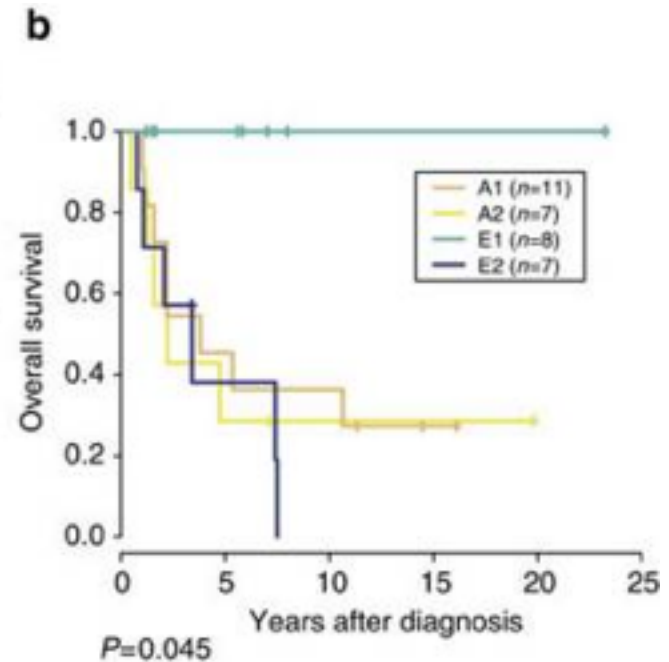
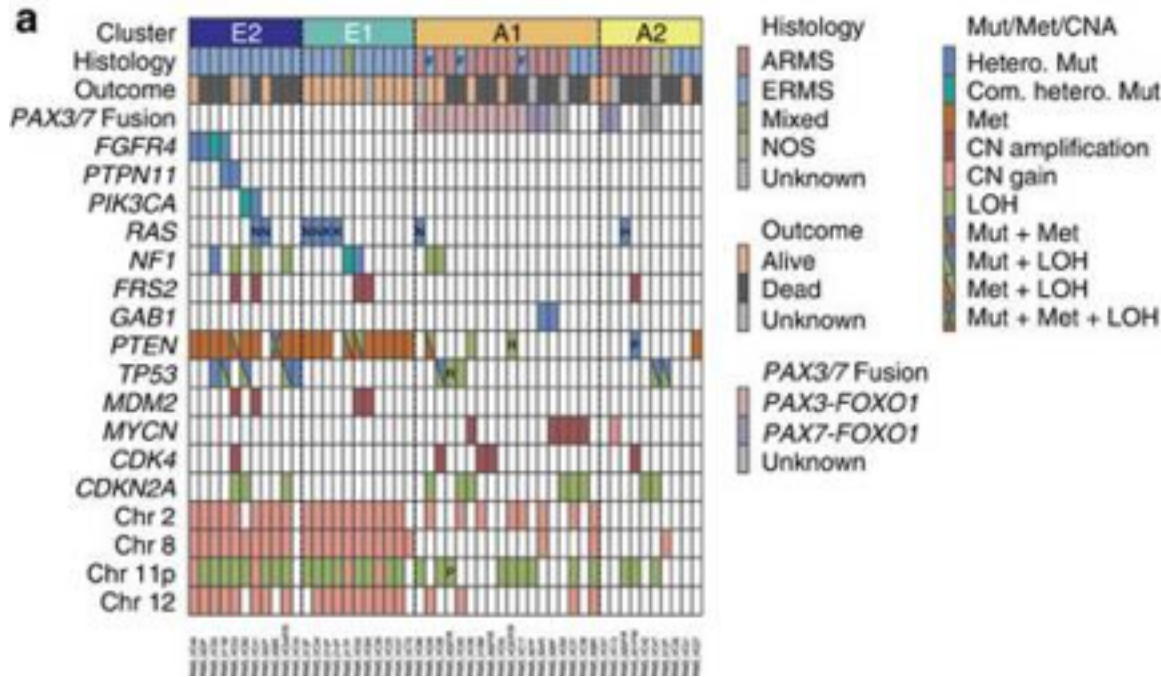
### Contexte

- Rhabdomyosarcomes (RMS)
- RMS alvéolaires : fusions PAX3/7-FOXO1 RMS embryonnaires : LOH 11p15, +2, 8, 12
- Mutations voies FGFR4/RAS/AKT, FBXW7, CTNNB1, BCOR

**Test** ➤ Nombre relativement faible de mutations : mécanismes épigénétiques ?

- Décrypter les bases (épi-)génétiques des RMS par une approche intégrée :
  - Déséquilibres génomiques (SNP-array)
  - Séquençage NGS pan-exomique, & pan-transcriptomique (RNA-seq)
  - Pan- méthylome de l'ADN
- 60 RMS

➤ 4 profils distincts de méthylation de l'ADN : remarquable corrélation avec les profils de mutation, déséquilibre génomique, morphologie et survie



**E1/E2** : RMS embryonnaires  
 Bcp de déséquilibres génomiques  
 Mutations voie **FGFR4/RAS/AKT**  
 Méthylation/mutation de **PTEN**

**A1/A2** : RMS alvéolaires  
 fusions **PAX3/7**  
 Altérations des régulateurs du cycle cellulaire

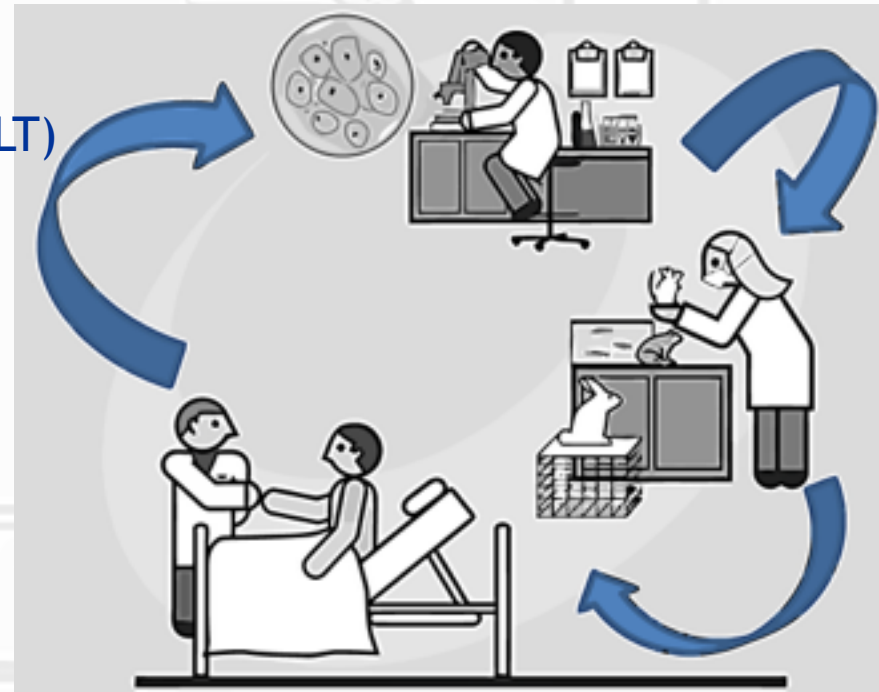
➤ **Individualisation d'un sous-groupe E2** : mauvais pronostic / E1

➤ **PTEN** : régule négativement la voie **FGFR4/RAS/AKT**  
 → marqueur diagnostique identifiant les cas chez qui l'inhibition de **FGFR4/PI3K/AKT** peut avoir un rôle thérapeutique

# Quoi de neuf ?

## Biologie des sarcomes des tissus mous

- **Utilité des approches moléculaires intégrées grâce aux nouvelles technologies** : séquençage NGS ADN, ARN, épigénétique, protéines
- **Meilleure compréhension de la physiopathogénie des sarcomes, en particulier les sarcomes de haut grade peu différenciés à génomique complexe**
  - Epigénétique
  - Métabolisme
  - Hypoxie
  - (Maintien alternatif des télomères : ALT)
- **Hétérogénéité tumorale**
  - Inter-
  - Intra-
- **Nouvelles pistes de traitement ciblé**





Cliniques universitaires  
**SAINT-LUC**  
UCL BRUXELLES

### Question 1 :

L'oncogenèse induite par MDM2 est-elle uniquement p53-dépendante ?

- OUI
- NON
- NE SAIT PAS

## Question 2 :

Des modifications épigénétiques peuvent-elles expliquer les différences entre les liposarcomes bien différenciés & les liposarcomes dédifférenciés ?

- OUI
- NON
- NE SAIT PAS

**Question 3 :**

**Dans les sarcomes des tissus mous, l'hypoxie intra-tumorale est-elle un critère de bon pronostique ?**

**OUI**

**NON**

**NE SAIT PAS**