

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



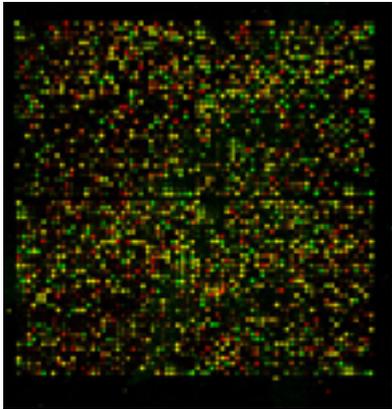
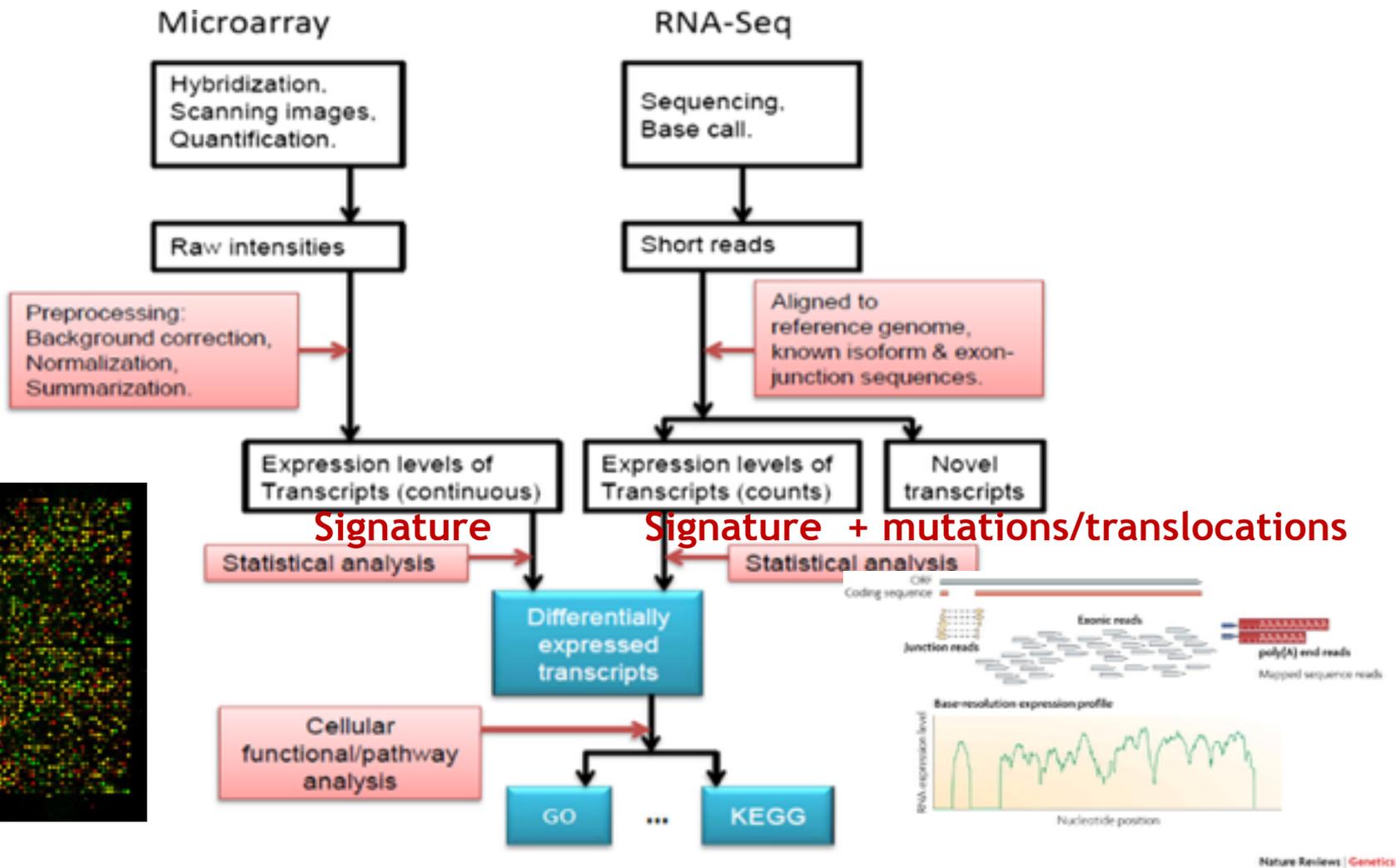
Tom Lesluyes ^{a,b,c}, Gaëlle Pérot ^{a,d}, Marine Roxane Largeau ^{a,b},
 Céline Brulard ^a, Pauline Lagarde ^a, Valérie Dapremont ^d,
 Carlo Lucchesi ^{a,c}, Agnès Neuville ^{a,d}, Philippe Terrier ^c,
 Dominique Vince-Ranchère ^f, Maria Mendez-Lago ^g, Marta Gut ^g,
 Ivo Gut ^g, Jean-Michel Coindre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

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

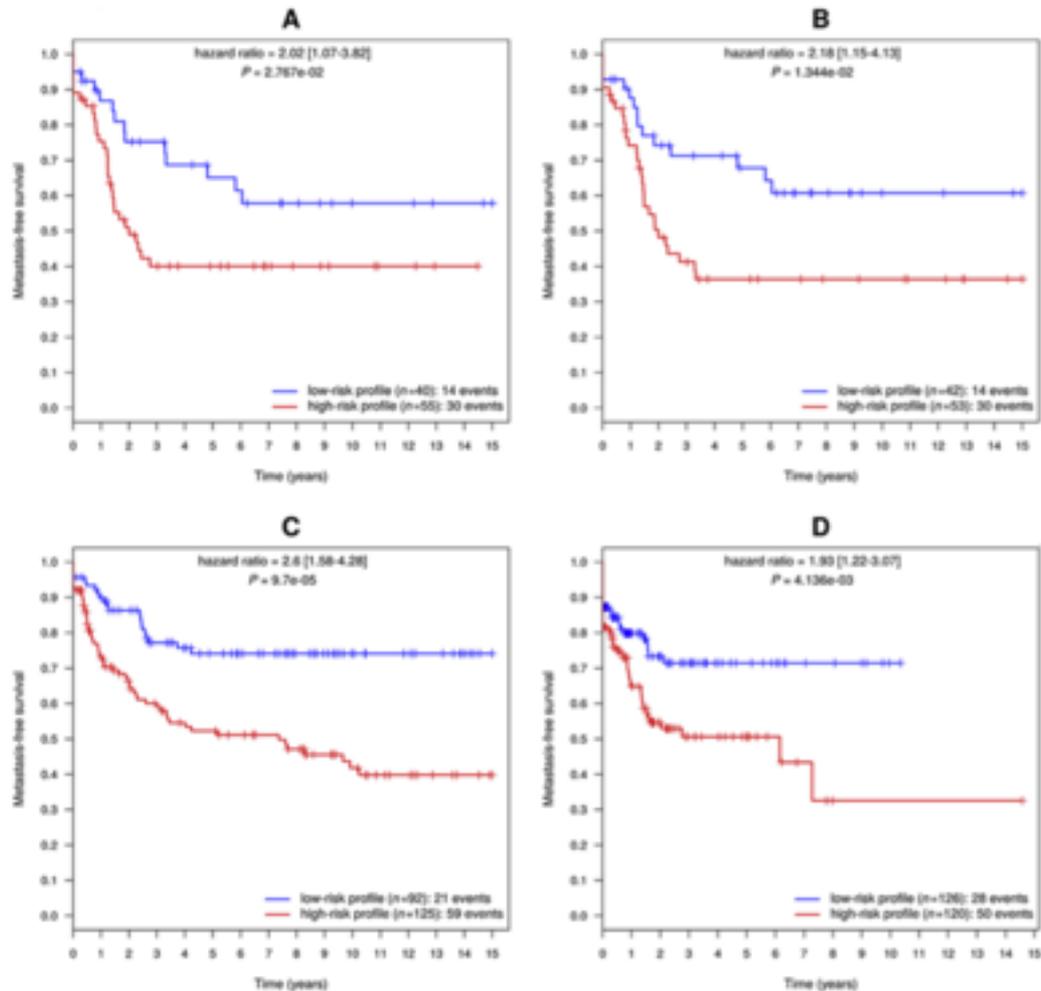
Prospectif

Non

Non

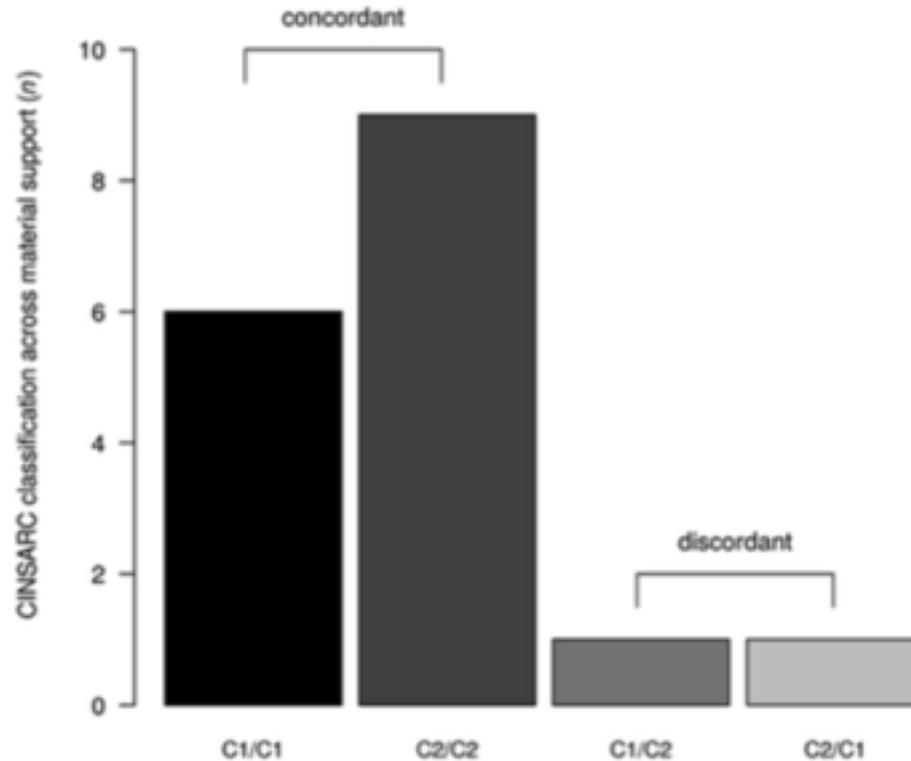
Meilleure reproductibilité

- 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 Guarnerio¹, Luisa Riccardi¹, Riccardo Taulli¹, Takahiro Maeda², Guocan Wang¹, Robin M. Hobbs¹, Min Sup Song¹, Paolo Sportoletti¹, Rosa Bernardi³, Roderick T. Bronson⁴, Mireia Castillo-Martin⁵, Carlos Cordon-Cardo⁵, Andrea Lunardi^{1,6,*}, and Pier Paolo Pandolfi^{1,*}

Hypothèses

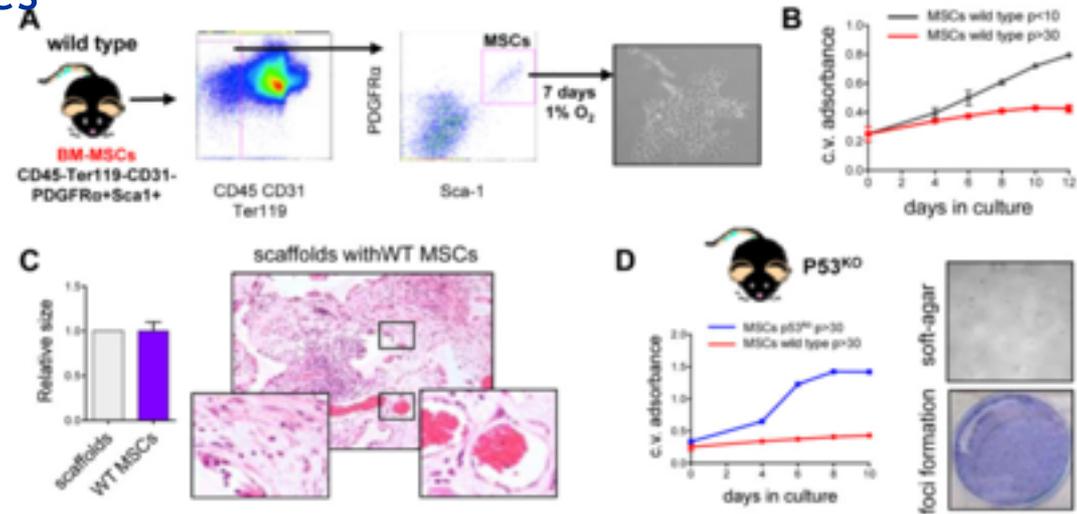
- Initiation de l'oncogénèse des sarcomes dans une cellule souche mésenchymateuse (MSC) adulte
- Dérégulation combinée de gènes impliqués dans :
 - prolifération / apoptose
 - régulation de la différenciation des cellules souches

Test

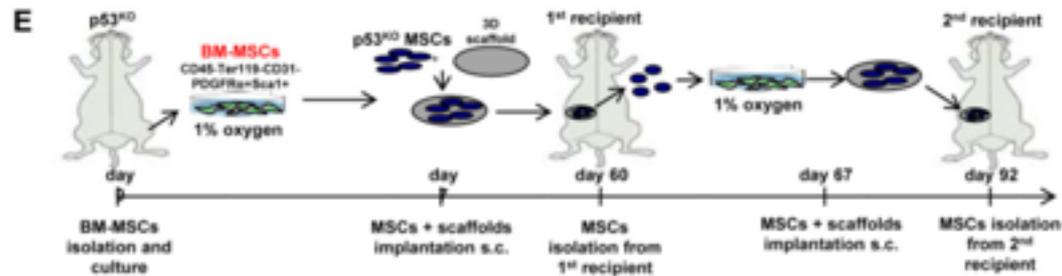
- Plateforme de génétique fonctionnelle in vitro et in vivo d'étude des sarcomes indifférenciés de l'adulte

Modèle cellulaire

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



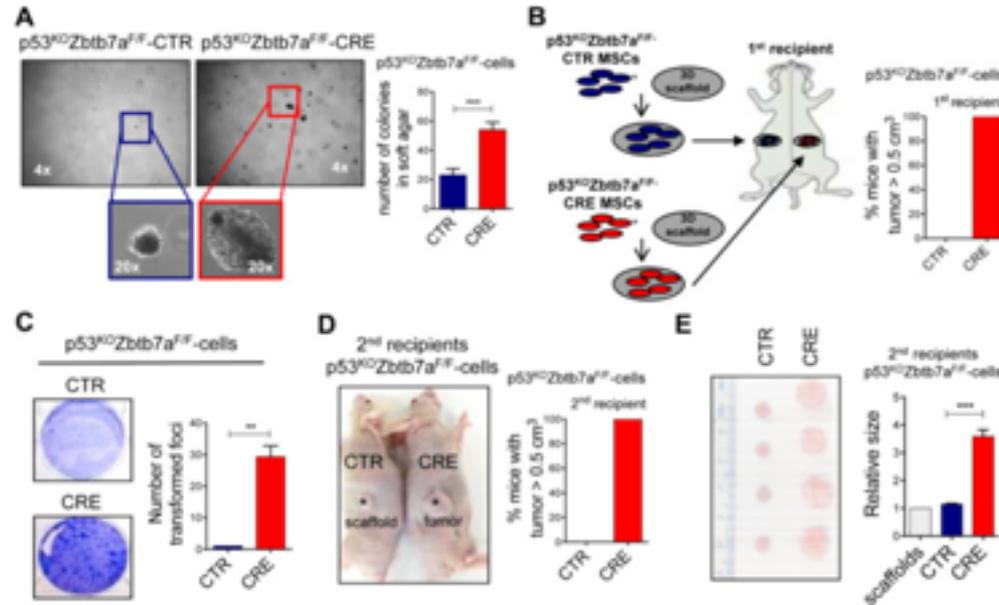
➤ Culture in vitro dans des conditions hypoxiques (cf environnement médullaire naturel) empêchant leur transformation spontanée



➤ 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 Kanojia¹, Yasunobu Nagata², Manoj Garg¹, Dhong Hyun Lee³, Aiko Sato², Kenichi Yoshida², Yusuke Sato², Masashi Sanada^{2,4}, Anand Mayakonda¹, Christoph Bartenhagen⁵, Hans-Ulrich Klein⁵, Ngan B. Doan⁶, Jonathan W. Said⁶, S. Mohith¹, Swetha Gunasekar¹, Yuichi Shiraishi⁷, Kenichi Chiba⁷, Hiroko Tanaka⁸, Satoru Miyano^{7,8}, Ola Myklebost^{9,10}, Henry Yang¹, Martin Dugas⁵, Leonardo A. Meza-Zepeda⁹, Allan W. Silberman¹¹, Charles Forscher³, Jeffrey W. Tyner¹², Seishi Ogawa^{2,*} and H. Phillip Koeffler^{1,3,13,*}

Contexte

➤ Liposarcome (LPS) :

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

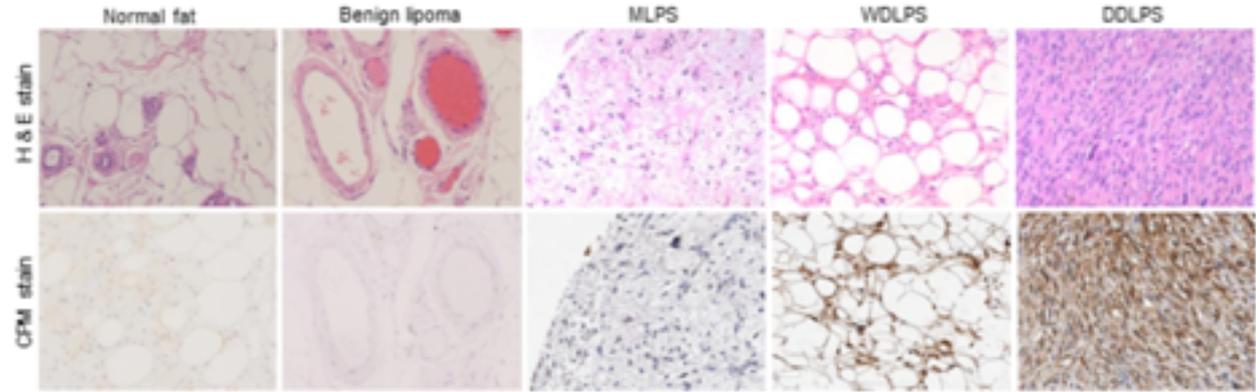
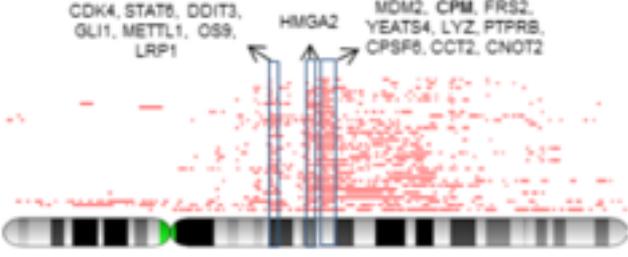
➤ absence d'alternatives thérapeutiques efficaces à la chirurgie

Test

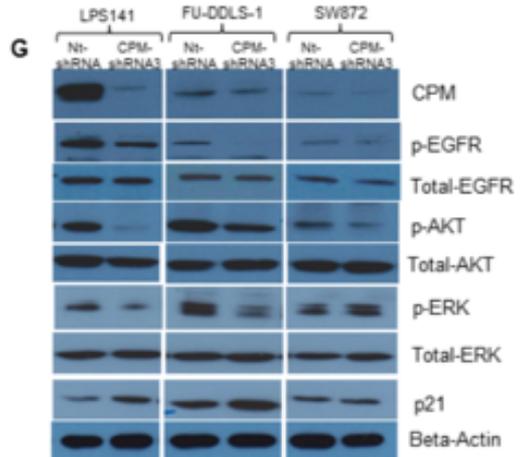
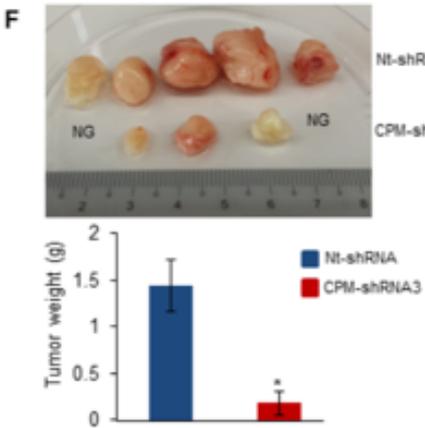
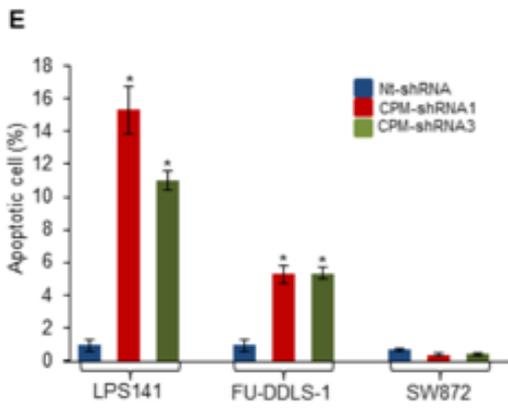
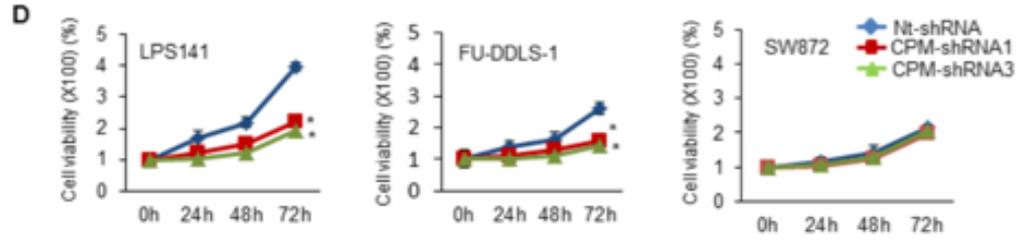
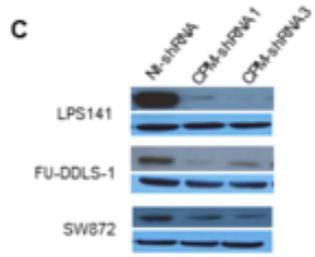
- Identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans les différents types de LPS par une approche intégrée :
 - Déséquilibres génomiques (SNP-array)
 - Séquençage NGS pan-exomique & exomique ciblé
- 86 LPS et 13 lignées cellulaires

1/ SNP-array :

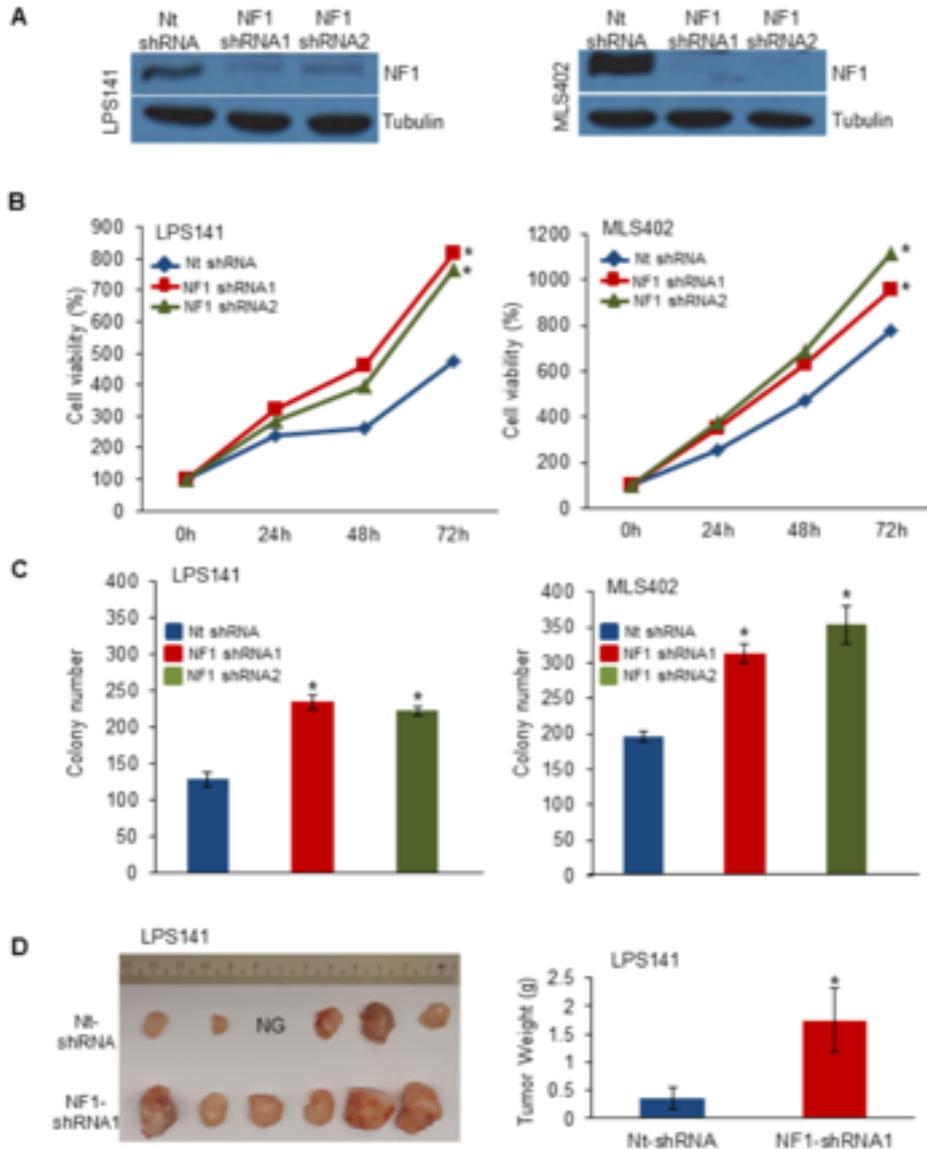
➤ Amplifications du gène **CPM** (Carboxypeptidase)/12q15 dans 78% des WD/DDLPS



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



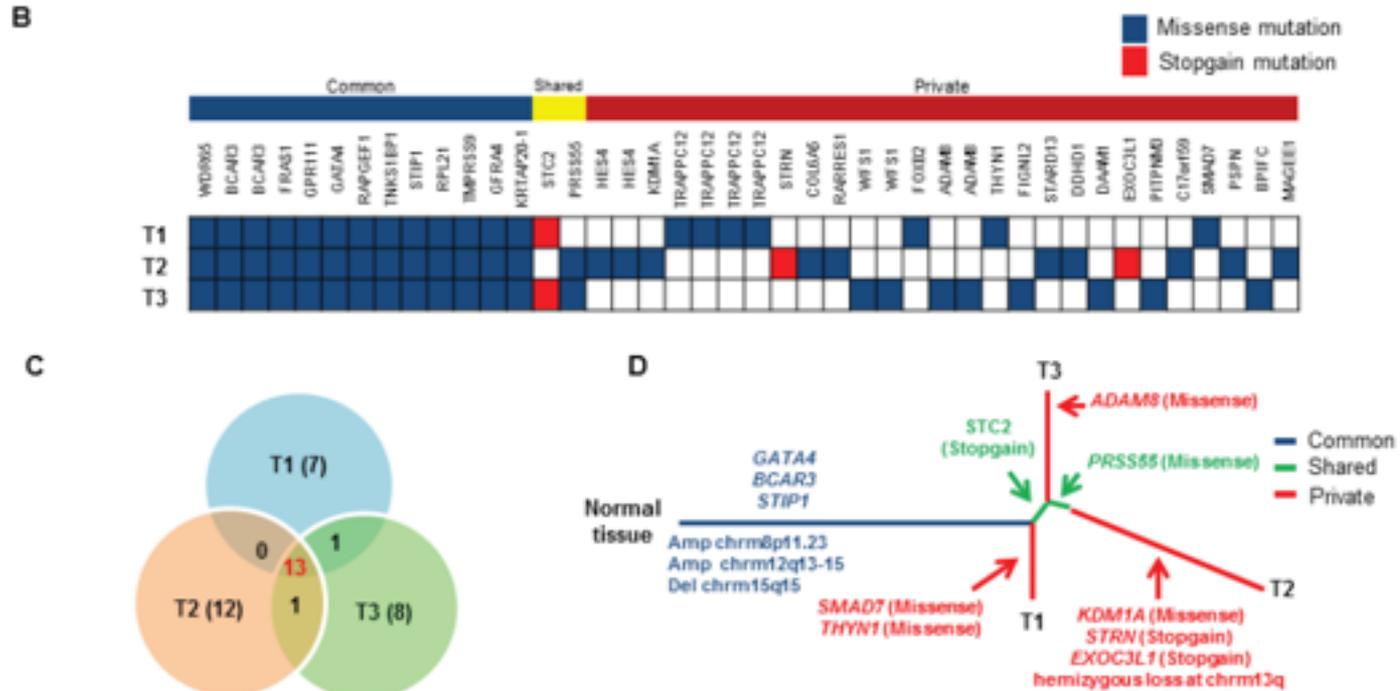
➤ Mutations du gène NF1 dans 20% des LPS



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

Hétérogénéité intratumorale :

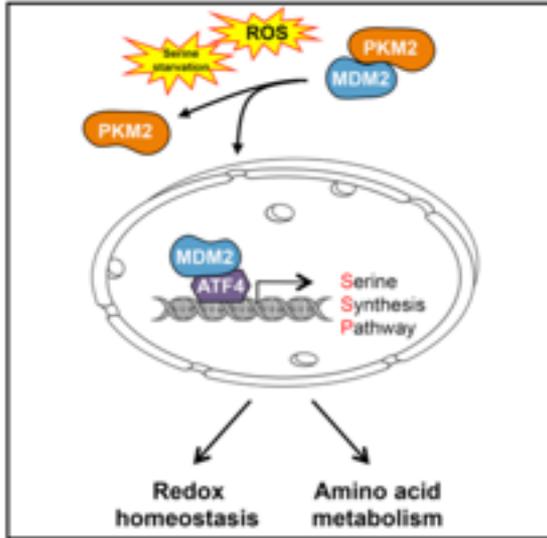
➤ 3 biopsies d'une même tumeur : 31% de mutations communes



➔ 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, Emile 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.



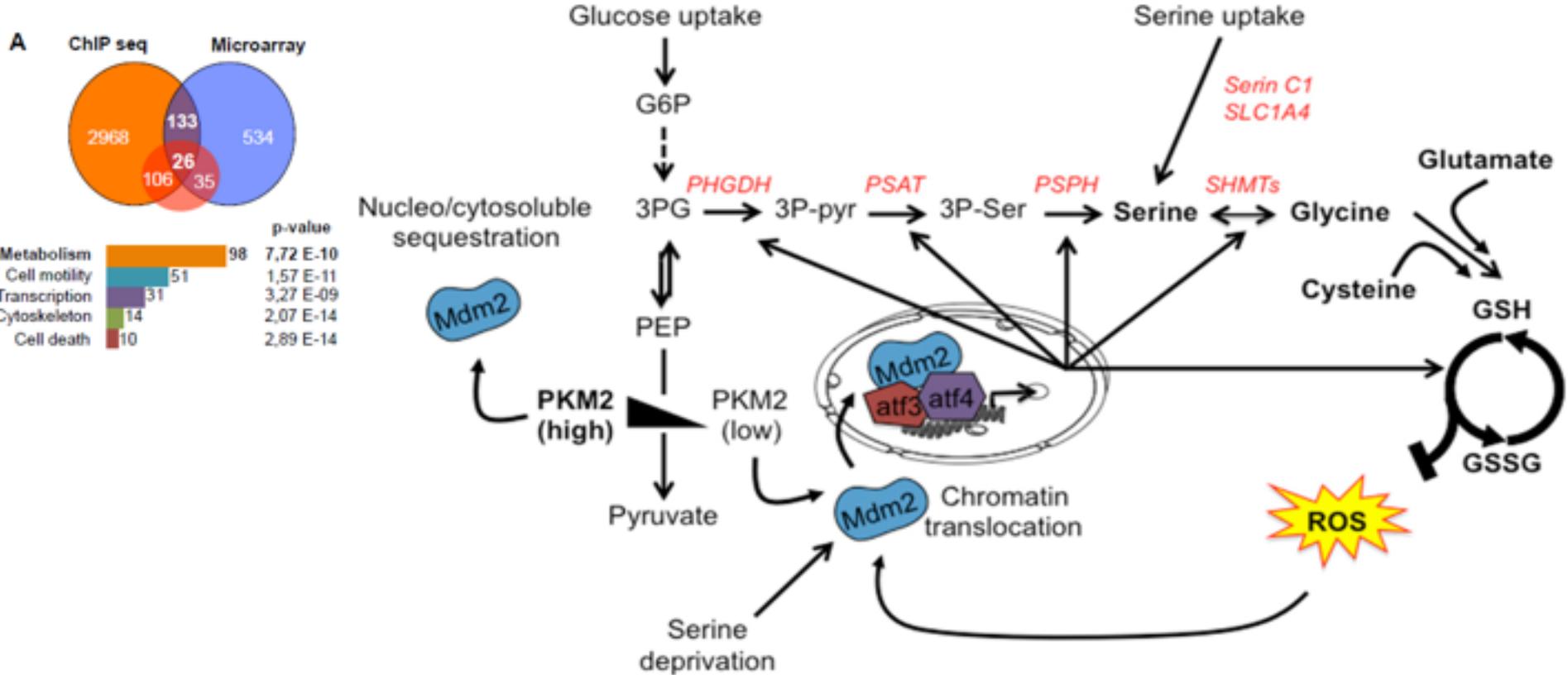
BIOSARC 2015
Paris

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

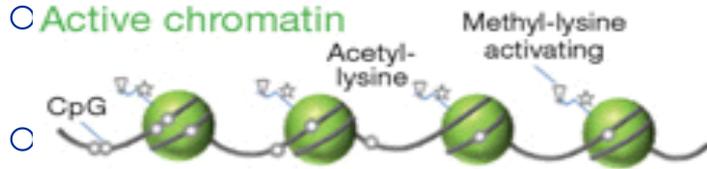


- MDM2 est recruté à la chromatine indépendamment de p53 pour réguler
 - le métabolisme de la sérine
 - l'homéostasie redox
 via une activation de la transcription ATF dépendante
- Favorise la croissance des cellules cancéreuses en conditions de déprivation exogène de sérine / glycine ou de stress oxydatif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

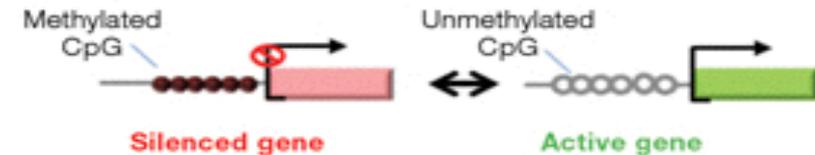
Epigénétique

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

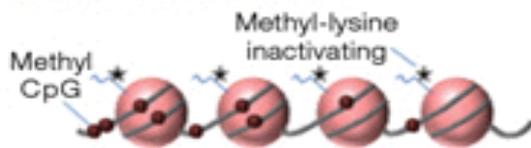
○ Active chromatin



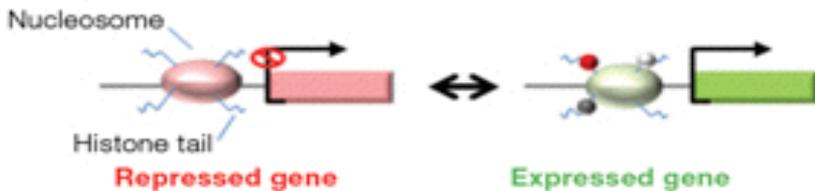
DNA methylation



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,^{1,2,3} Kadir C. Akdemir,¹ Ghadah A. Al Sannaa,⁴ Jeannine Garnett,² Dina Lev,⁵ Keila E. Torres,² Alexander J. Lazar,⁴ Kunal Rai,¹ and Lynda Chin¹

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

Contexte	WDLPS Bas grade Indolent	versus	DDLPS 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

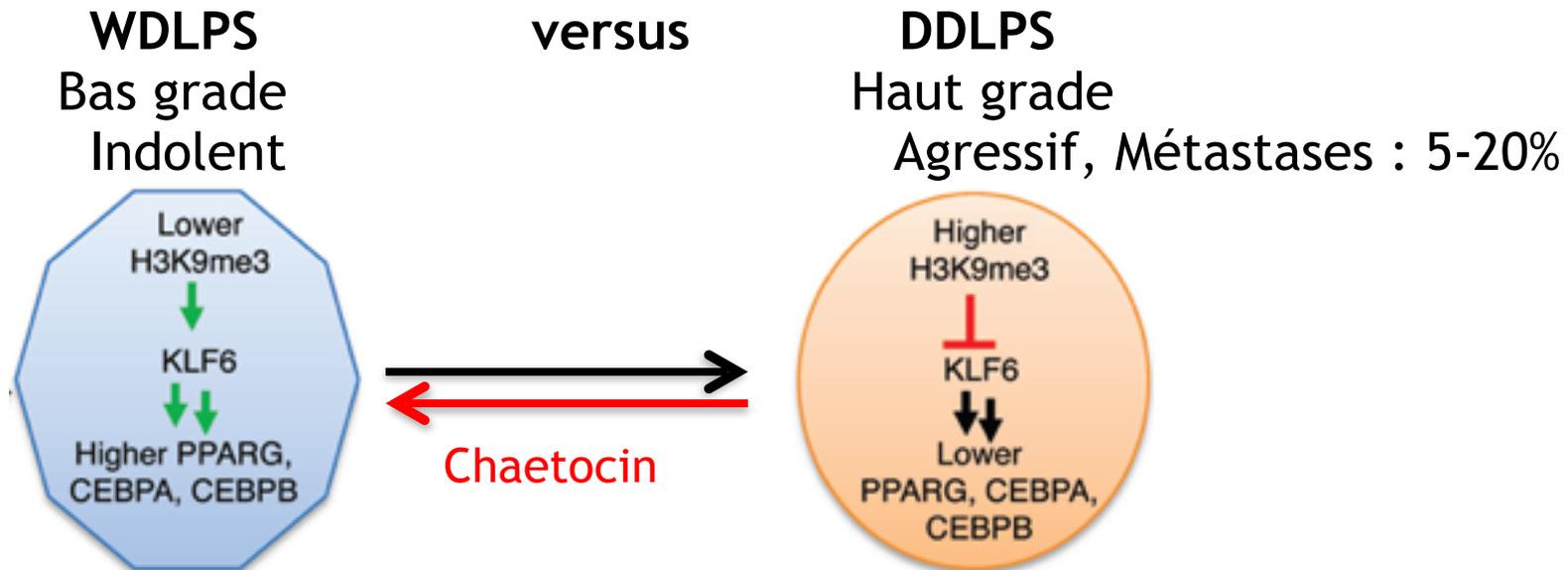
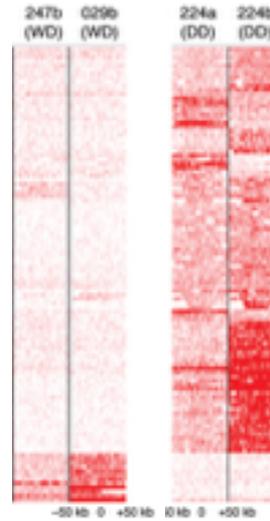
Test

➤ 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

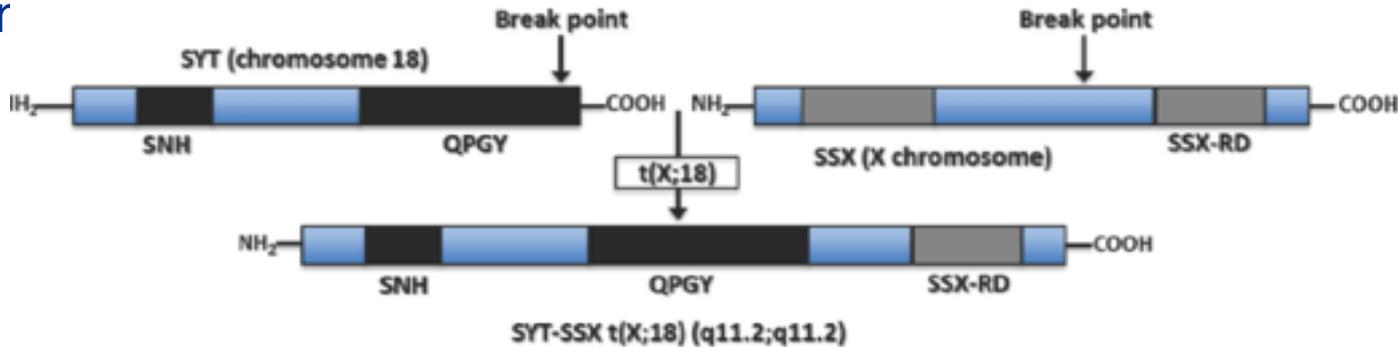
REVIEW

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

Torsten O. Nielsen¹, Neal M. Poulin¹, and Marc Ladanyi²

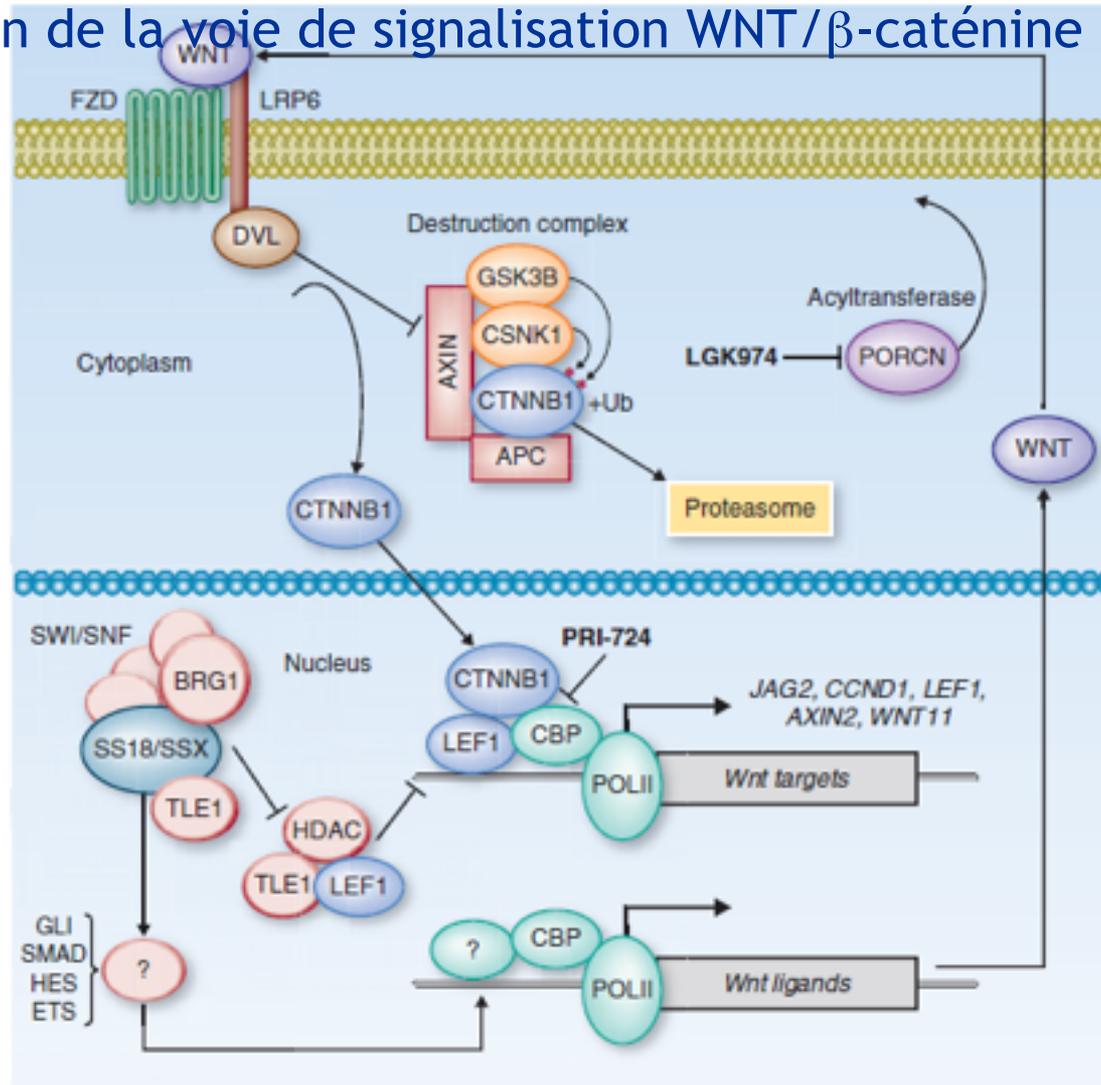
Contexte

- 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



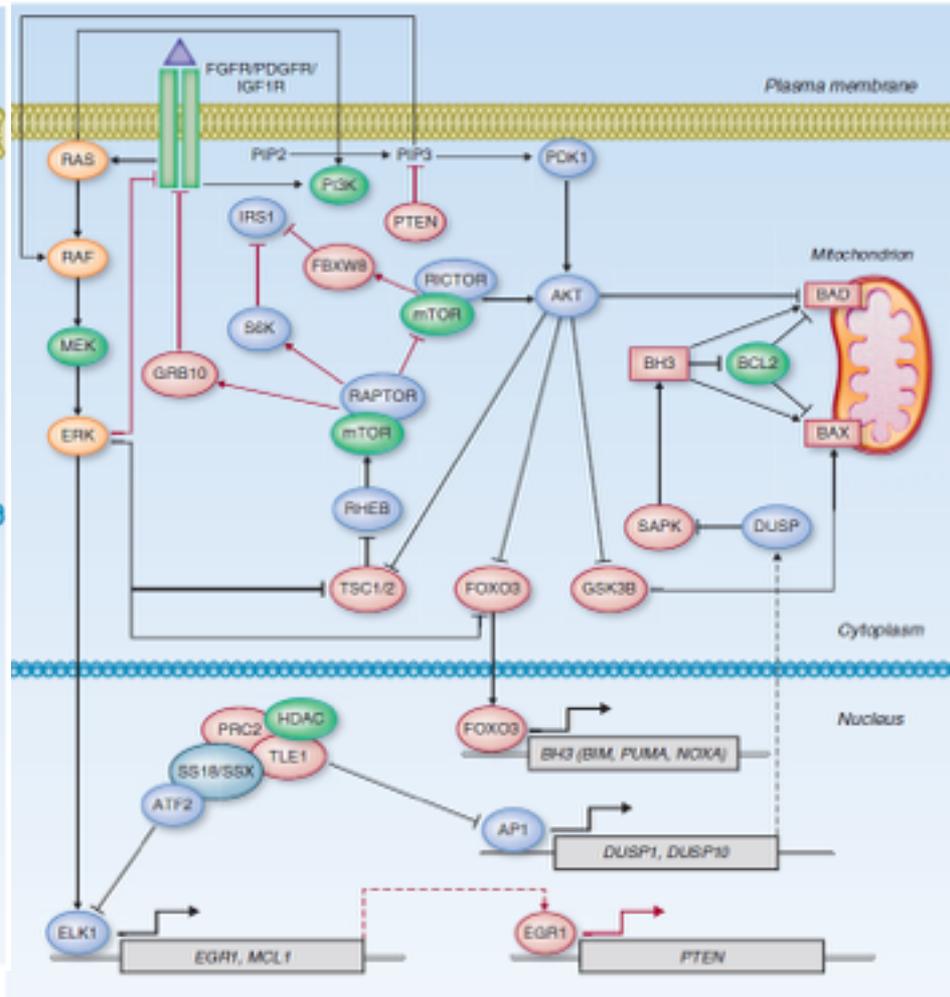
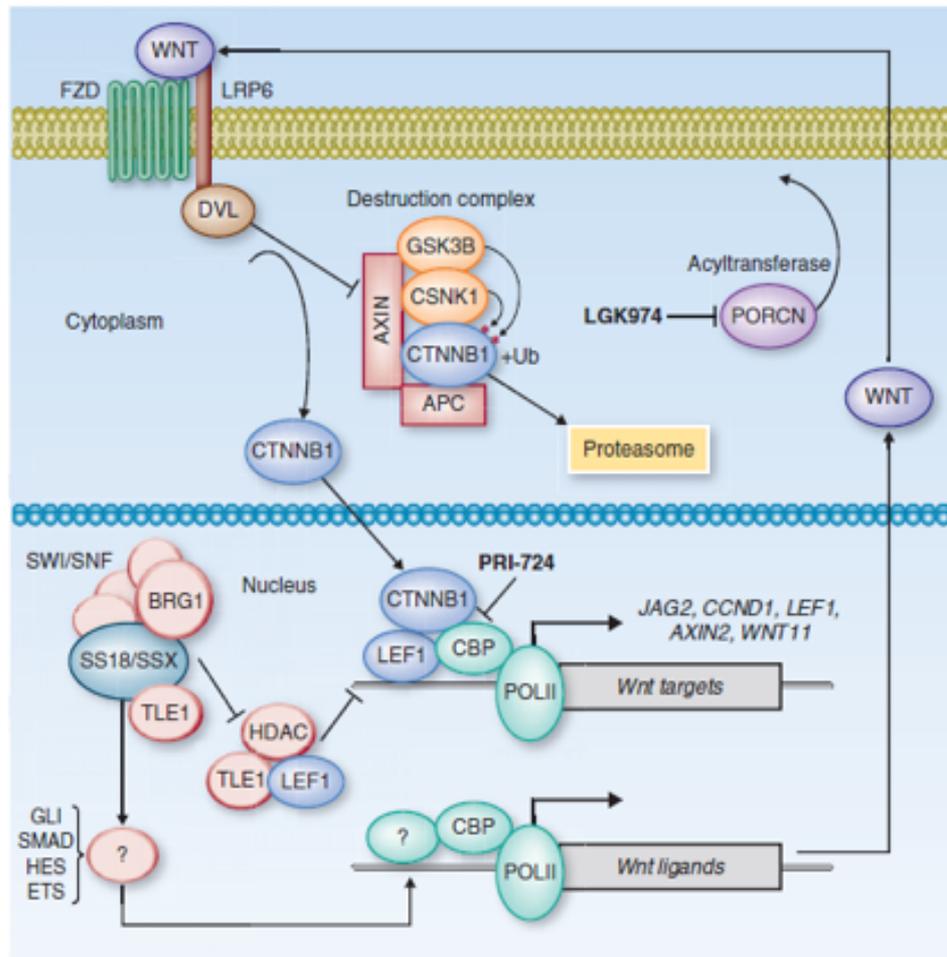
- Fusion entre la sous-unité β du complexe SWI/SNF (coactivateur transcriptionnel) et le domaine SSX associé au complexe répresseur polycomb d'un des 3 gènes test homologues (SSX1, 2, 4)
- Elucidation des mécanismes oncogéniques pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques

- 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/ β -caténine



Cibles thérapeutiques dans le SS

- Voie de signalisation WNT/ β -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 α suppresses soft tissue sarcoma growth

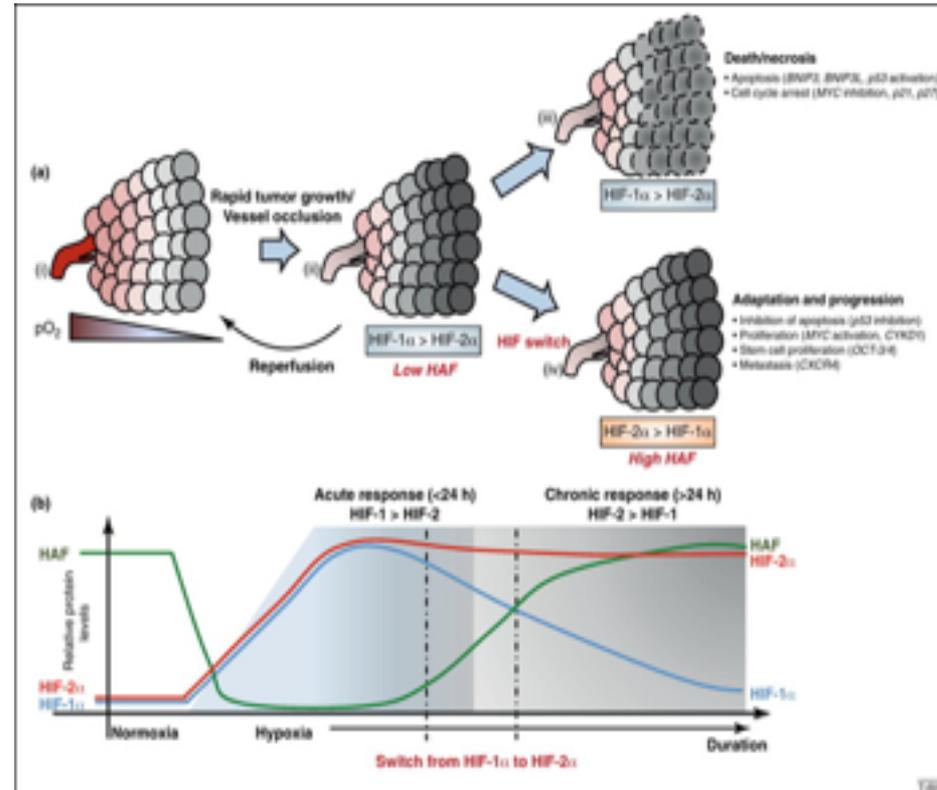
Michael S. Nakazawa¹, T.S. Karin Eisinger-Mathason^{1,2}, Navid Sadri^{1,3}, Joshua D. Ochocki¹, Terence P.F. Gade⁴, Ruchi K. Amin⁵ & M. Celeste Simon^{1,2,5}

Contexte

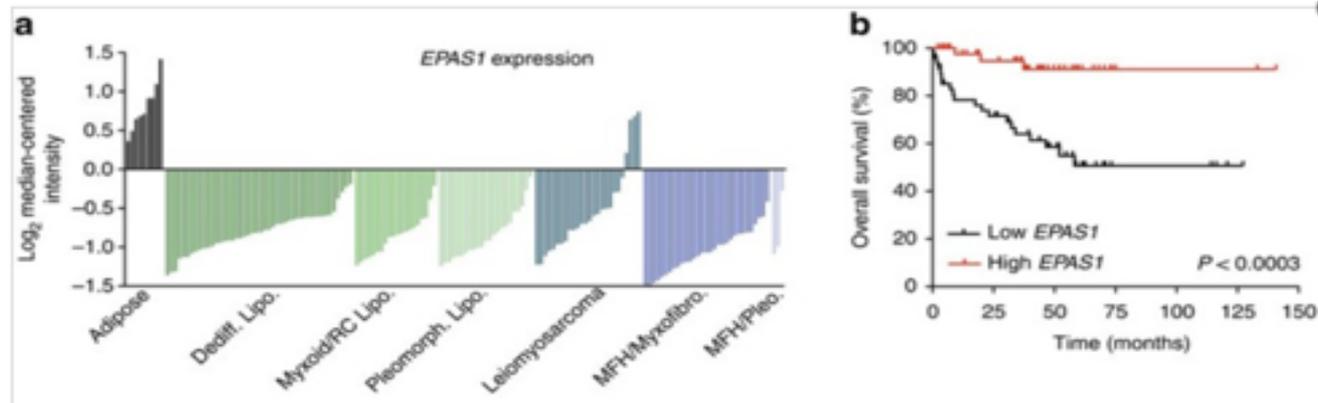
- Dans les sarcomes des tissus mous, sarcomes pléomorphes indifférenciés, l'hypoxie intra-tumorale est un critère pronostique péjoratif
- Adaptation cellulaire via HIF-1 α et HIF-2 α : rôles contexte-dépendant
- HIF-1 α est un médiateur-clé pour les réponses transcriptionnelles à l'hypoxie et promeut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

Test fibrosarcomes

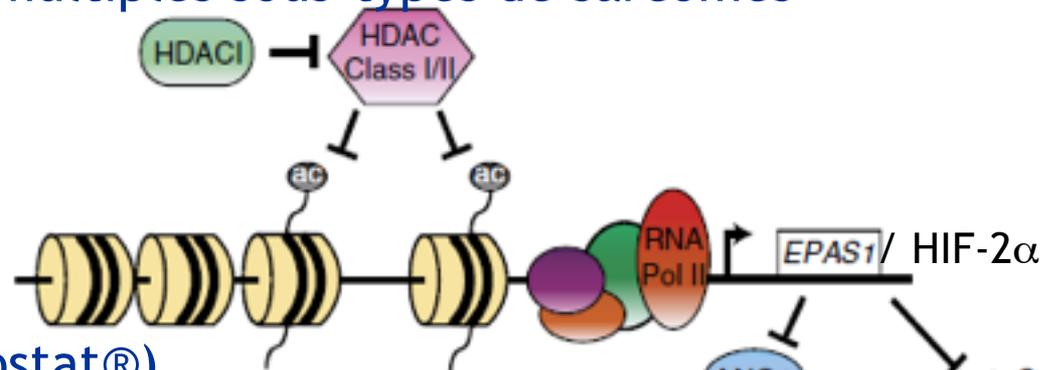
- Rôle de HIF-2 α (codé par le gène *EPAS1*) ?



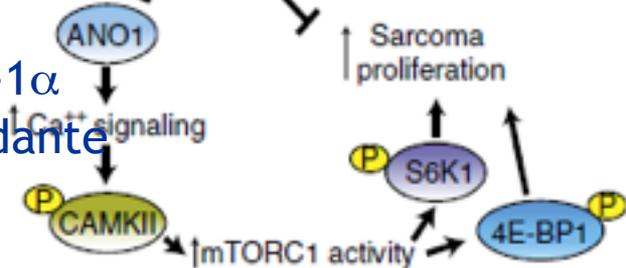
- HIF-2 α (*EPAS1*) inhibe la croissance des sarcomes des tissus mous de haut grade (UPS, FBS, LPS):
Cf perte de HIF-2 α dans les sarcomes pléomorphiques indifférenciés et les liposarcomes dédifférenciés → activation de la signalisation mTORC1 → prolifération tumorale



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



- HDAC inhibiteur (Vorinostat®)
→ augmente sélectivement HIF-2 α (*EPAS1*) mais pas HIF-1 α
→ inhibe la croissance tumorale HIF-2 α (*EPAS1*) - dépendante



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^{1*}, Riki Nishimura^{1*}, Kenichi Yoshida^{2,3}, Teppei Shimamura^{4,5}, Yuichi Shiraishi⁴, Yusuke Sato^{2,3}, Motohiro Kato^{1,6,7}, Kenichi Chiba⁴, Hiroko Tanaka⁸, Noriko Hoshino⁹, Genta Nagae¹⁰, Yusuke Shiozawa^{2,3}, Yusuke Okuno^{3,11}, Hajime Hosoi¹², Yukichi Tanaka¹³, Hajime Okita¹⁴, Mitsuru Miyachi¹², Ryota Souzaki¹⁵, Tomoaki Taguchi¹⁵, Katsuyoshi Koh⁷, Ryoji Hanada⁷, Keisuke Kato¹⁶, Yuko Nomura¹⁷, Masaharu Akiyama¹⁸, Akira Oka¹, Takashi Igarashi^{1,19}, Satoru Miyano^{4,8}, Hiroyuki Aburatani¹⁰, Yasuhide Hayashi²⁰, Seishi Ogawa^{2,3} & Junko Takita¹

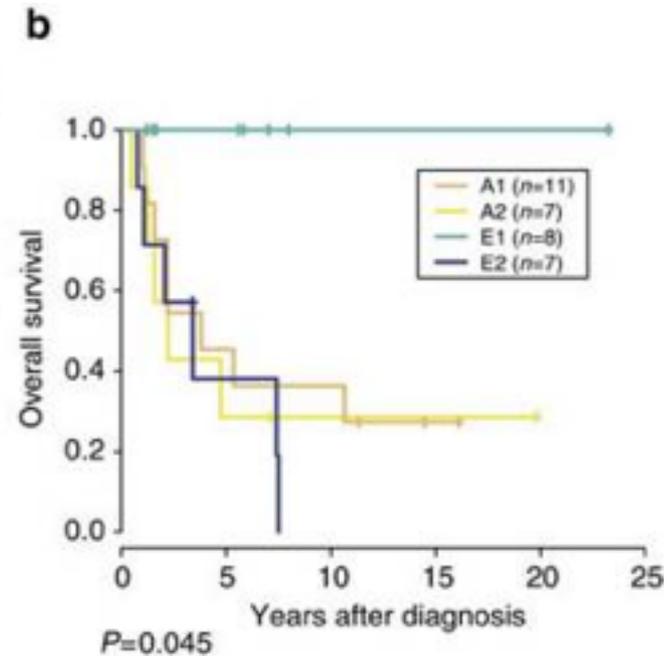
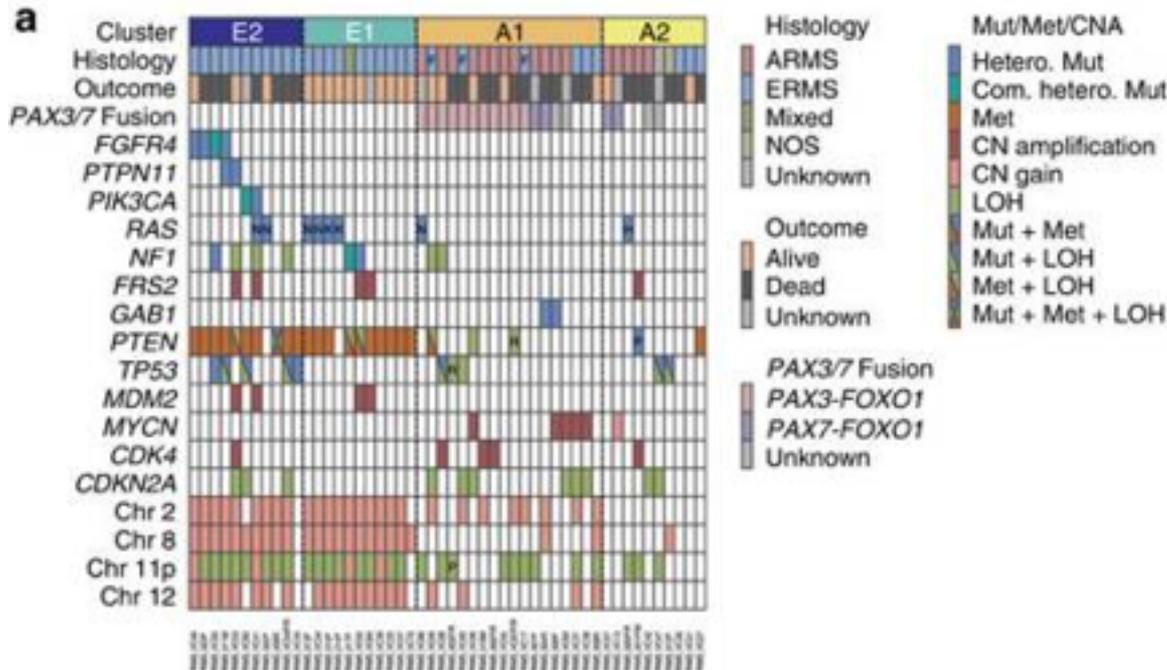
Contexte

- 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