Anomalies chromosomiques et moléculaires des tumeurs mésenchymateuses bénignes et des sarcomes

Florence Pedeutour

UE 4

20 décembre 2012

Tumeurs mésenchymateuses ou conjonctives

Tumeurs des tissus mous et de l'os

Très vaste groupe

Tumeurs bénignes
très fréquentes
(ex: lipomes,
leiomyomes etc…)

Tumeurs malignes :
sarcomes

Sarcomes

Du grec : *sarks*: chair

Virchows : tumeurs malignes du tissu conjonctif

1% des cancers de l'adulte : 1800 nouveaux cas par an en France

Sarcomes

Diagnostic difficile+++

*rares

*variés : >60 types et sous-types

*discordances de diagnostic : +++ (>25%)

***prise en charge de type « maladie rare »**

Structuration indispensable

Depuis 1990 : Groupe Sarcomes Français
Référents régionaux, lecture collégiales des lames histologiques, prise en charge multi-disciplinaire

Depuis 2010 : Institut National du Cancer : réseaux spécialisés et soutien financier

Sarcomes

Diagnostic difficile+++

*rares

*variés : >60 types et sous-types

*discordances de diagnostic : +++ (>25%)

*prise en charge de type « maladie rare »

Structuration indispensable

Depuis 1990 : Groupe Sarcomes Français Référents régionaux, lecture collégiale des lames histologiques, prise en charge multi-disciplinaire

Depuis 2010 : Institut National du Cancer : réseaux spécialisés et soutien financier

***Importance majeure de la génétique**

Sarcomes

Diagnostic difficile+++

*Eliminer une tumeur bénigne, surtout lésion bénigne pseudosarcomateuse (ex: fasciite, histiocytome bénin…)

*Eliminer un lymphome, un carcinome, un mélanome

*Distinguer les sarcomes entre eux

Sarcomes

Diagnostic difficile+++

*Eliminer une tumeur bénigne, surtout lésion bénigne pseudosarcomateuse (ex: fasciite, histiocytome bénin…)

*Eliminer un lymphome, un carcinome, un mélanome

Classification des sarcomes

- **Liposarcomes : 20%**
- **Léiomyosarcomes : 15 %**
- **Synovialosarcomes : 10%**
- **Rhabdomyosarcomes : 10%**
- **Schwannomes malins : 10 %**
- **Angiosarcomes < 5 %**
- **PNET 2%**
- **Divers 5%**
- **Inclassés (ex « MFH ») : 30%**

Ligne de différenciation
histologie
immunohistochimie

Profil
cytogénétique
et
moléculaire

-1) Sarcomes avec anomalies génomiques

Anomalies génomiques détectables par une ou plusieurs méthodes de cytogénétique moléculaire (caryotype, FISH, CGH-array) ou de biologie moléculaire (RT-PCR, Q-PCR)

-2) Sarcomes avec anomalies mutationnelles

Détectables par méthodes de biologie moléculaire (séquençage, PCR…)

-Sarcomes à génomique simple

Ex: translocation et gène de fusion

Synovialosarcome

PNET

Rhabdomyosarcome etc…

-Sarcomes à génomique complexe

Ex: léïomyosarcomes, oséosarcomes, angiosarcomes, fibrosarcomes, sarcomes peu différenciés….

-Sarcomes à génomique »intermédiaire »

Liposarcomes bien différenciés

Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand

Sarcomes à caryotypes « simples »

EXEMPLE DE LA TRANSLOCATION t(11;22) DANS LE SARCOME D'EWING

Tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing

-Tumeurs osseuses ou des tissus mous de l'enfant et
du jeune adulte (5-20 ans)

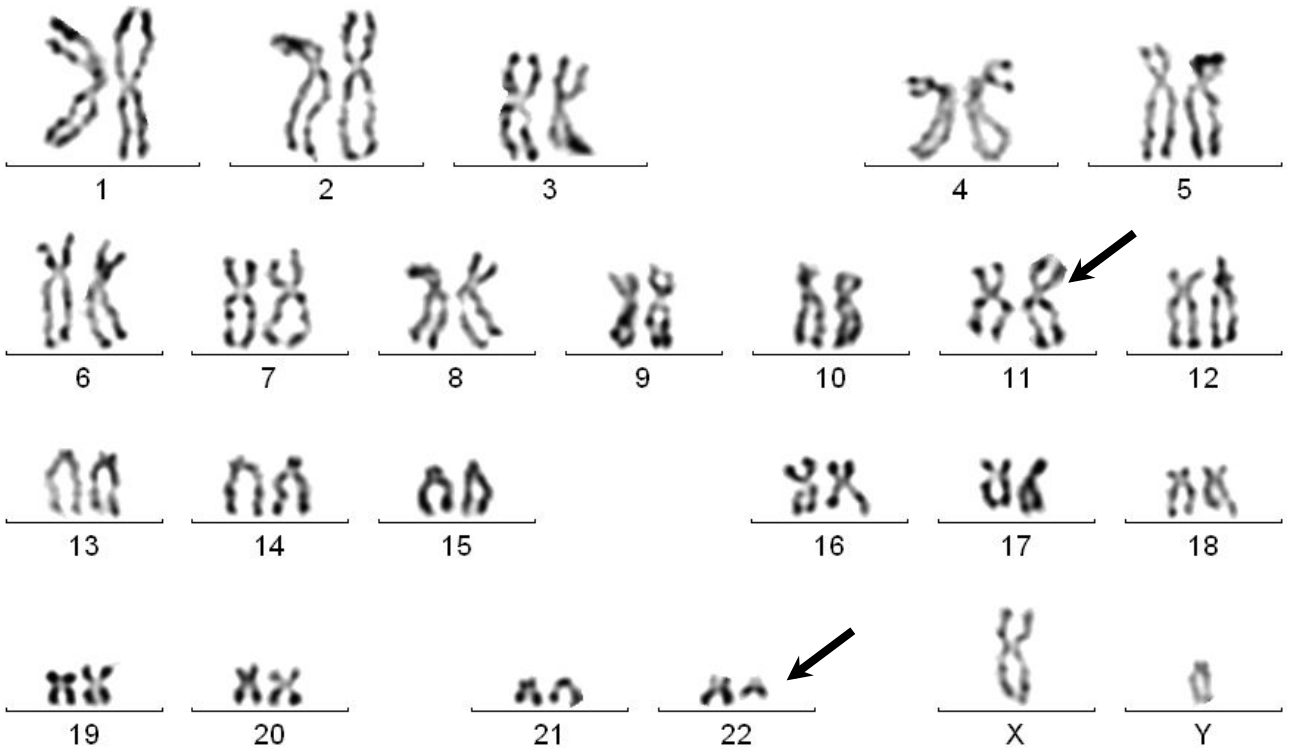
-Tumeurs à "petites cellules rondes":
aspect histologique
aspect en culture cellulaire

-Tumeurs chimio- et radiosensibles, 60-70% de survie à 5 ans
pour une tumeur localisée

-Importance +++ de la (cyto)génétique dans le diagnostic

Sarcome d'Ewing

-1984: découverte d'une anomalie cytogénétique spécifique



11;22)(q24;q12)

t(11;22) et PPNET

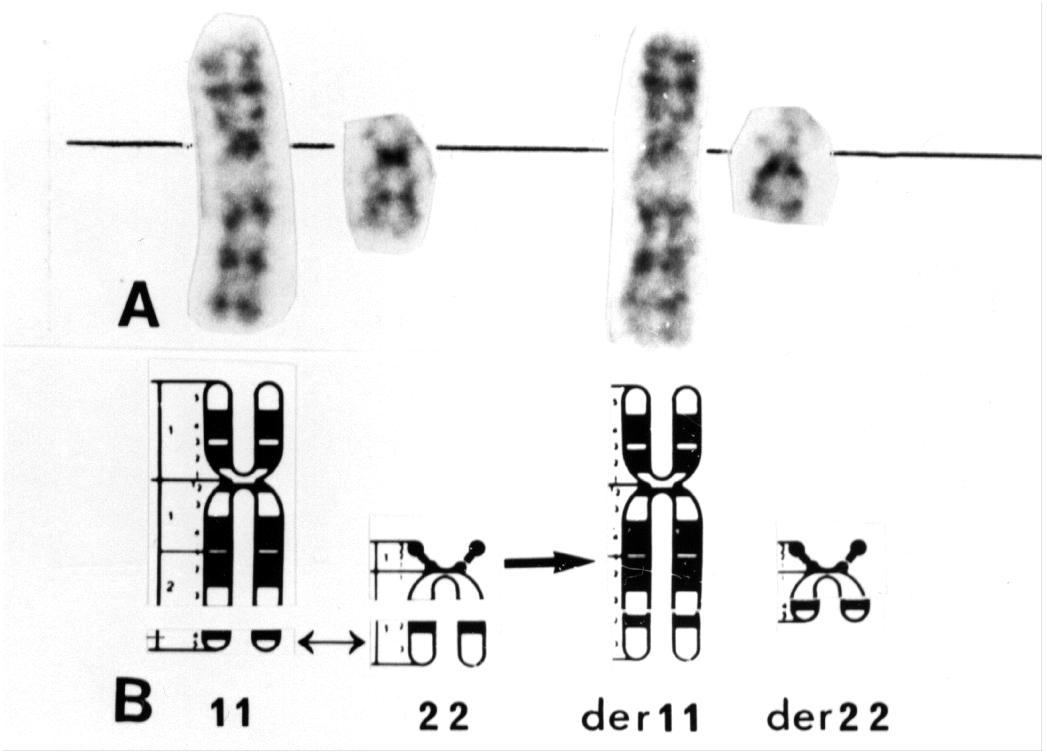
Découverte d'une translocation t(11;22) identique dans des tumeurs neuroectodermiques périphériques ("PPNET") considérées jusqu'alors comme des entités différentes du sarcome d'Ewing (tumeurs à petites cellules rondes des tissus mous, tumeur thoracique d'Askin, neuroépithéliomes...)

Sarcome d'Ewing et PPNETs ne sont que des manifestations cliniques différentes (localisation anatomique, degré de différenciation) d'un même processus de tumorigénèse corrélé à la t(11;22)

Apport de la cytogénétique tumorale à la classification et au diagnostic des SE/PPNET :
Définition d'une famille des tumeurs du sarcome d'Ewing

Diagnostic correct : conditionne une prise en charge thérapeutique optimale

-1992 : Identification des gènes impliqués dans la t(11;22)



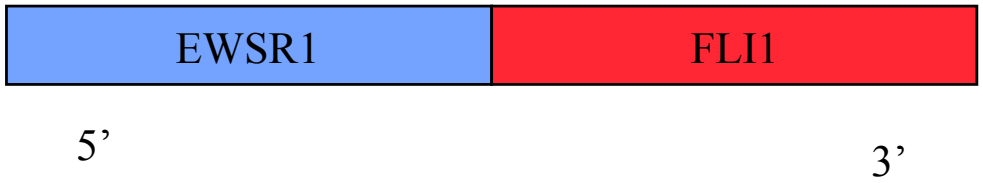
bandes GTG

-11q24
-FLI1
-activateur de transcription
-expression cellules hématopoiétiques

-22q12
-EWSR1
-domaine de liaison à l'ARN
-expression ubiquitaire

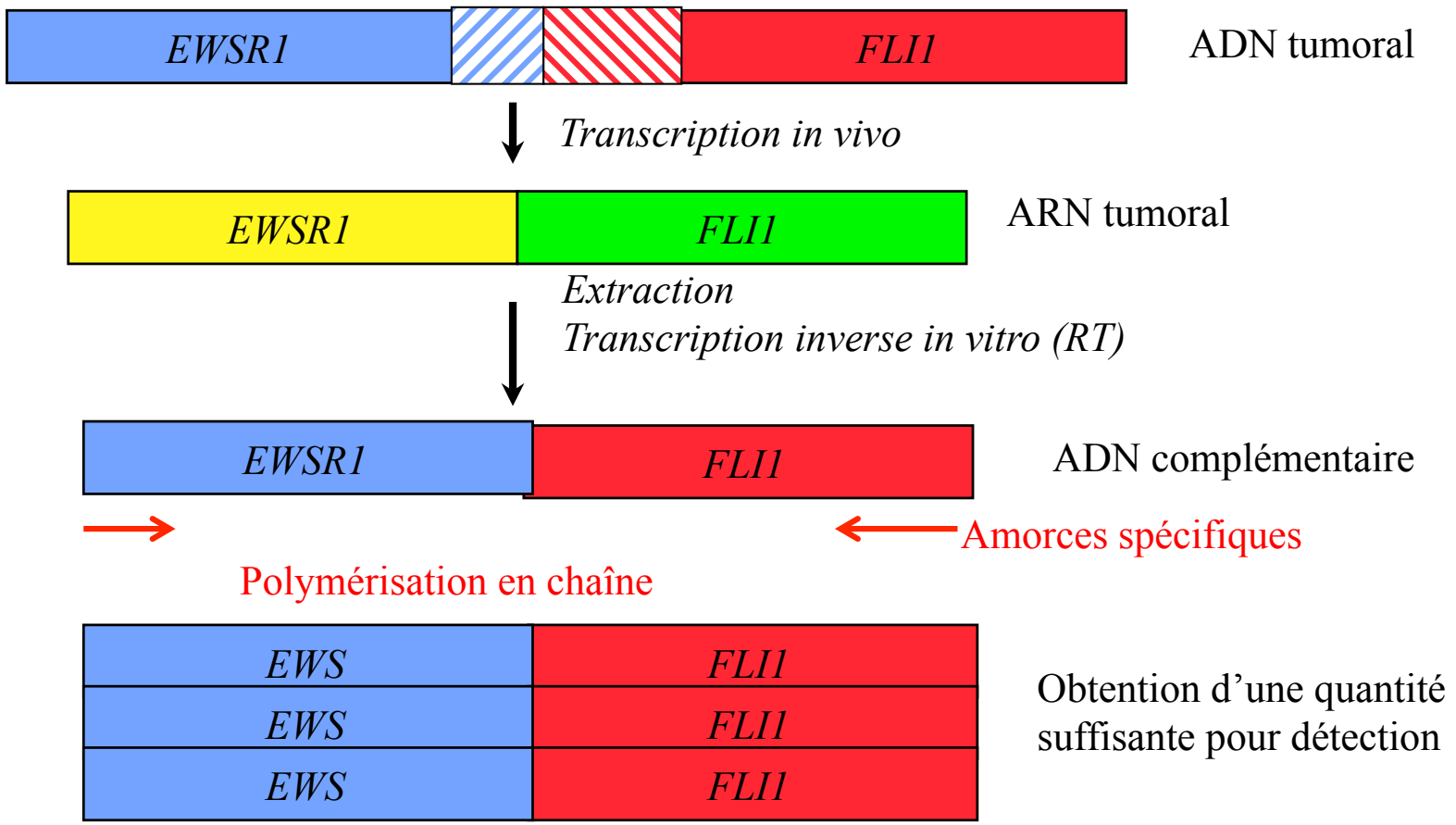
Formation d'un gène chimérique de fusion *EWSR1-FLI1*

Sur le chromosome 22 anormal :
portion 5' proximale de *EWS*+ portion 3' distale
de *FLI1*



Produit de fusion : partie N-terminale *EWSR1*+ partie C-terminale
FLI1(avec domaine liaison ADN)
Activateur transcription+++

RT-PCR



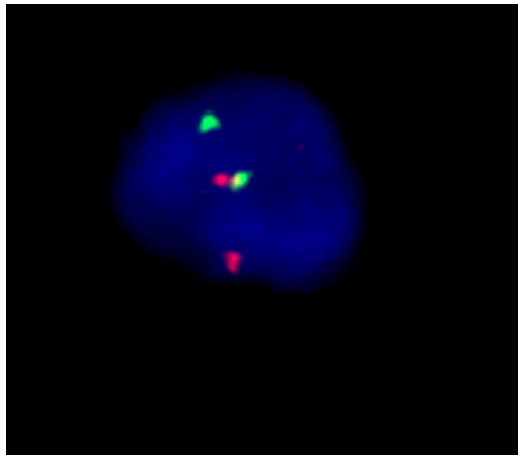
Intérêt : spécificité et sensibilité

Inconvénients :

-nécessité d'une quantité suffisante d'ARN de bonne qualité,

-ne détecte pas les translocations variantes non connues *EWSR1-X*?
(il faut des amorces spécifiques)

FISH interphasique : détection de remaniements de *EWSR1* à partir de prélèvements frais, congelés, appositions, ou fixés et inclus en paraffine





Sondes encadrant *EWSR1*

Intérêt : simple, rapide, utilisable sur tout type de prélèvement, permet la détection de tous les remaniements de *EWSR1*, quel que soit le gène partenaire
Limite : fission de *EWSR1* non limitée aux sarcomes d’Ewing/PNET : résultat FISH à confronter au contexte clinique et histologique et à compléter par d’autres analyses pour identifier gène ou chromosome partenaire

Cytogénétique : *uniquement si quantité suffisante*

Aspect des cellules en culture (rosettes ou ballonets)

Recherche de t(11;22) (ou anomalie du 22)

Intérêt : détection possible d'anomalies non attendues, d'anomalies secondaires

Synovialosarcomes

-Sarcomes à cellules fusiformes

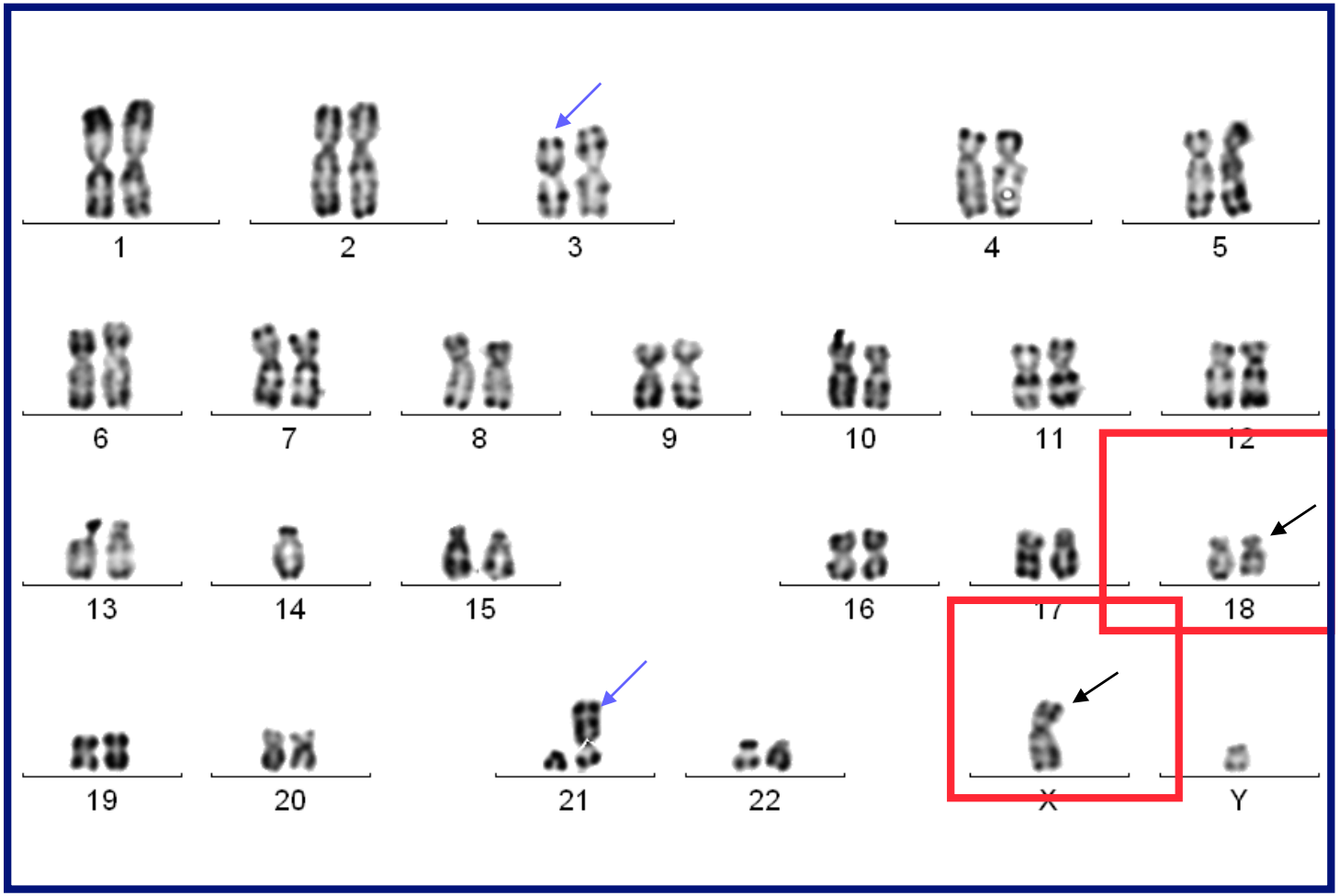
-Appellation trompeuse : ne dérivent pas du tissu synovial

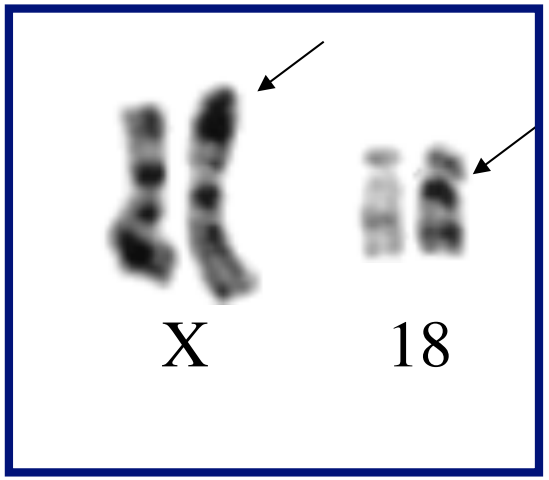
-Souvent tissus profonds des membres, voisinage des tendons et articulations, mais toute localisation anatomique possible, notamment plèvre, poumon etc…

-Importance du diagnostic cytogénétique et moléculaire

EXEMPLE DU SYNOVIALOSARCOME

Caractérisé par t(X;18)(p11;q11) et fusion SS18-SSX1/2/4



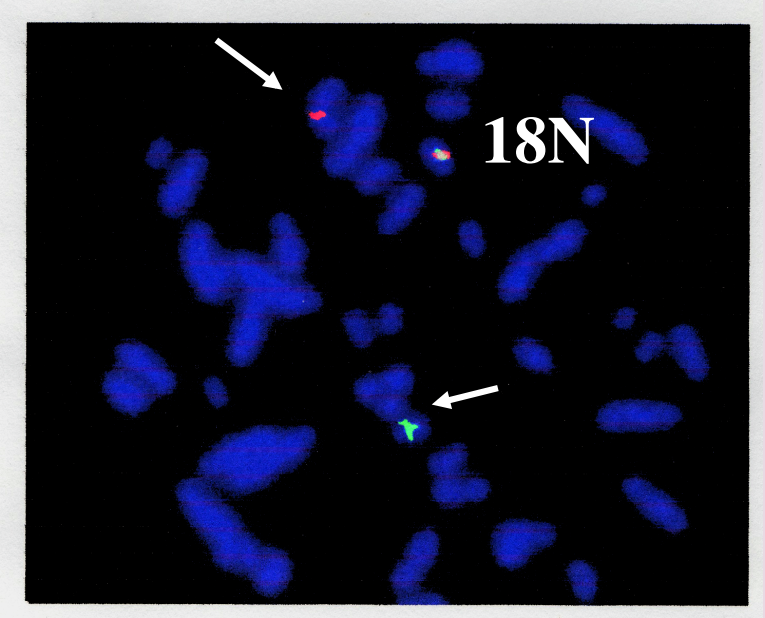


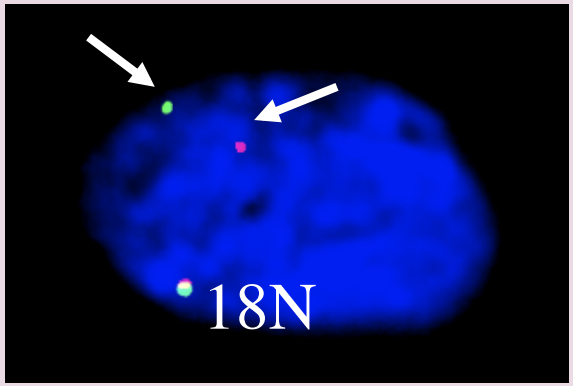
Recherche t(X;18) : fission du gène SS18 (=SYT)

Demandé généralement pour :

-confirmation du diagnostic anatomo-pathologique

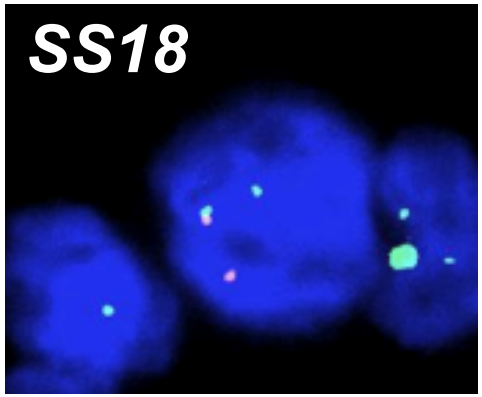
-important si localisation anatomique inhabituelle (+++) ou immunohistochimie non caractéristique (ex : sarcome peu différencié)



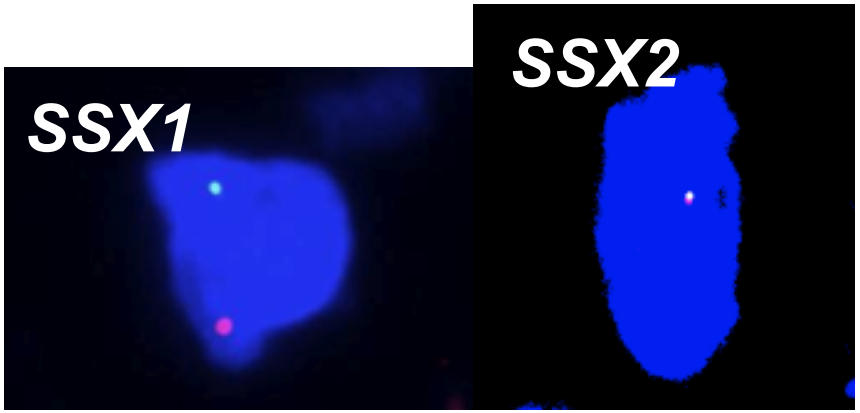


RECHERCHE PAR FISH

Etape 1 :
recherche
Fission SS18 (SYT)



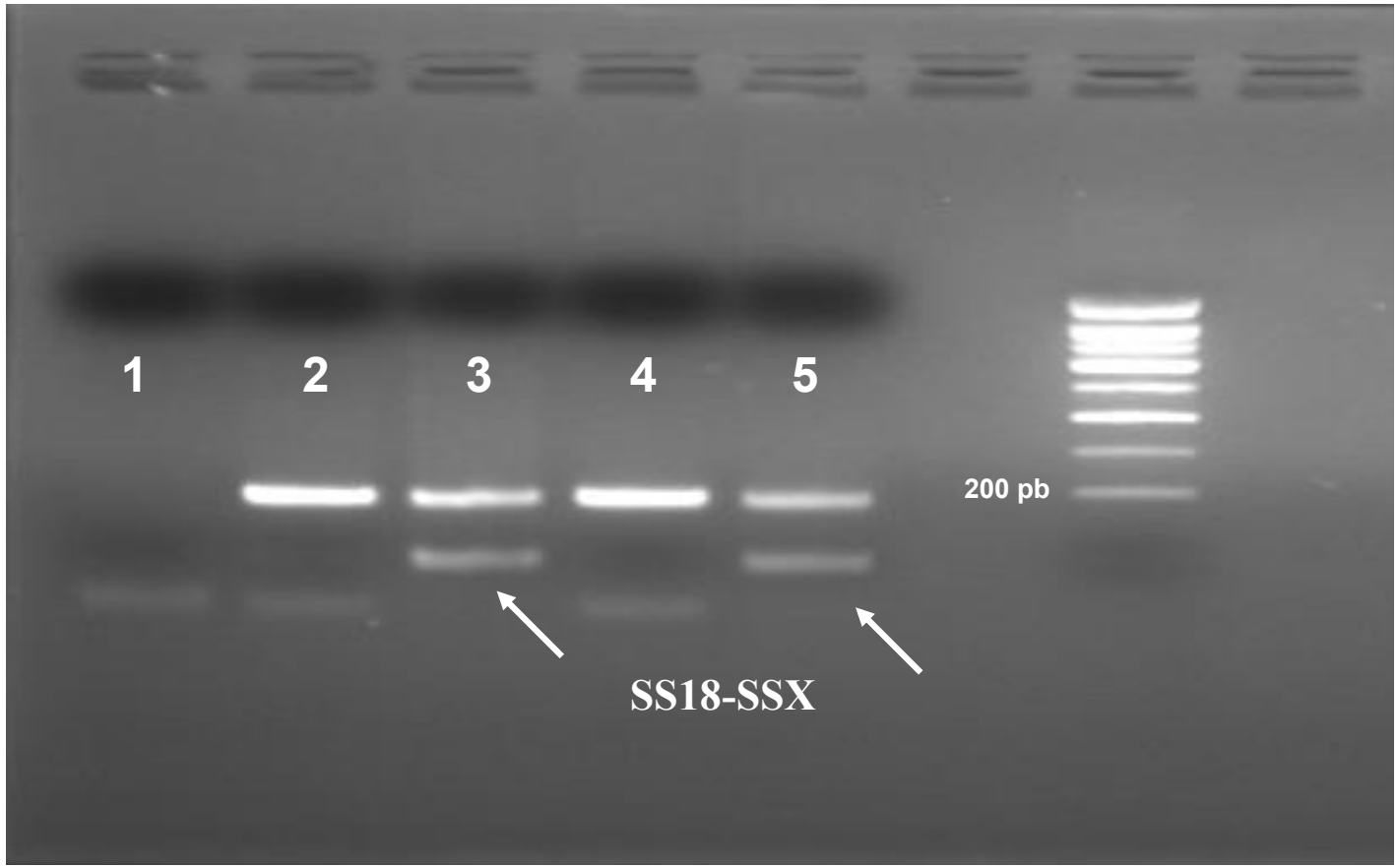
Etape 2 (confirme et complète) :
recherche remaniement
SSX1* ou *SSX2* et éventuellement *SSX4



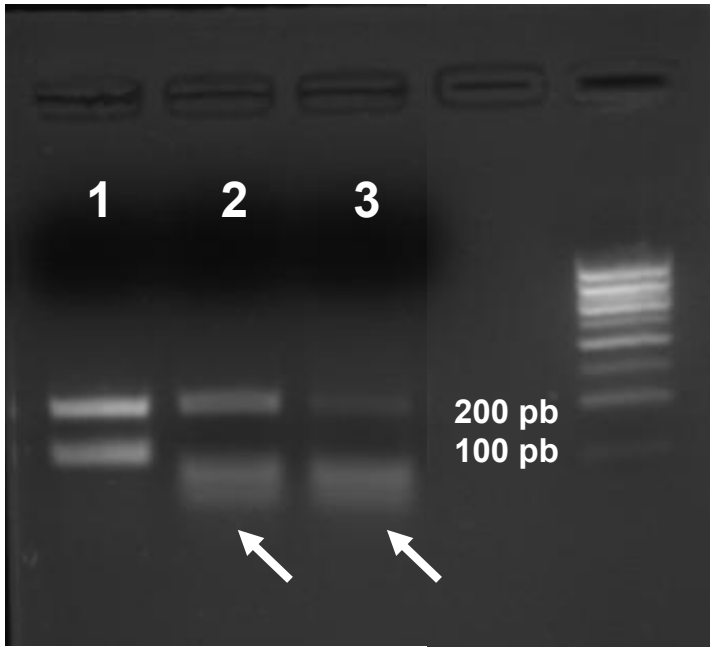
fusion *SS18-SSX1*
chez un homme de 25 ans
avec synovialosarcome
cuisse droite

Recherche par RT-PCR

Extraction d'ARN



RT-PCR avec amorces SS18+ amorce polyvalente SSX



Si bande positive SS18-SSX : coupure enzymatique par Taq1 pour distinguer SS18-SSX1 et SS18-SSX2

Rhabdomyosarcomes

Principaux types

Rhabdomyosarcome alvéolaire

t(1;13) ou t(2;13) avec fusion
FKHR-PAX3 ou *PAX7*

Rhabdomyosarcome embryonnaire

Trisomies : caryotype hyperdiploïde

Rhabdomyosarcome pléomorphe

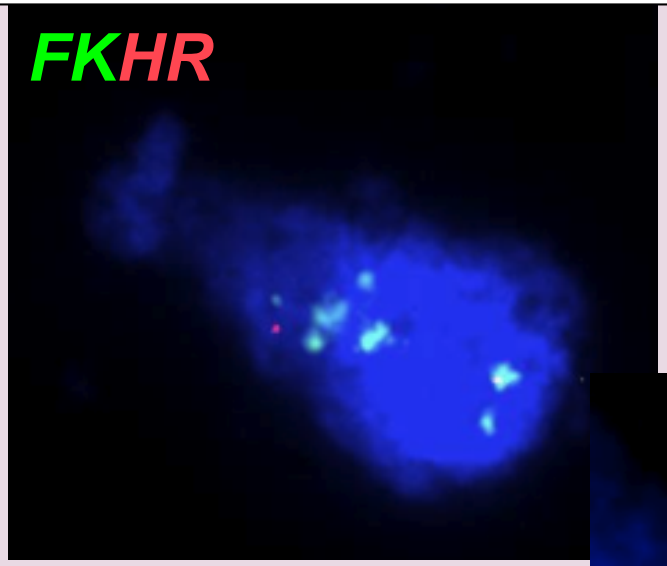
Caryotypes complexes

DETECTION PAR FISH D'UN REMANIEMENT SPECIFIQUE

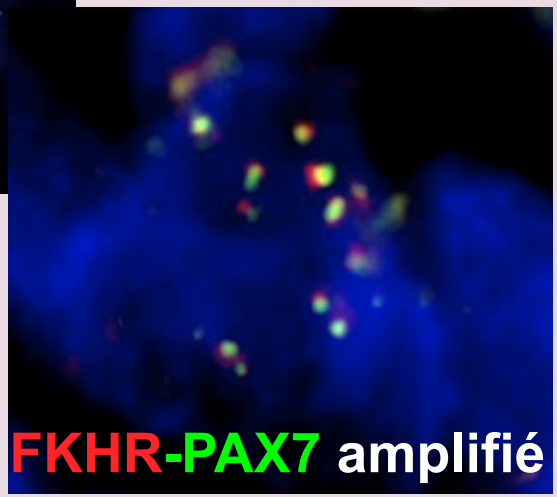
Exemple d'un cas de rhabdomyosarcome alvéolaire

t(1;13) avec amplification de FKHR-PAX7

Etape 1 :
recherche
fission FKHR



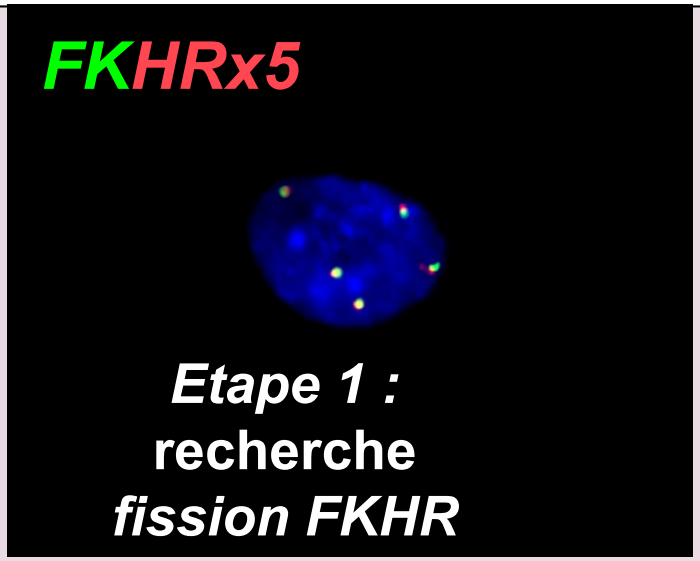
Etape 2 (confirme et complète) :
Recherche fusion
FKHR-PAX3 ou FKHR-PAX7
Importance pronostique+++
(FKHR=FOXO1=facteur transcription)



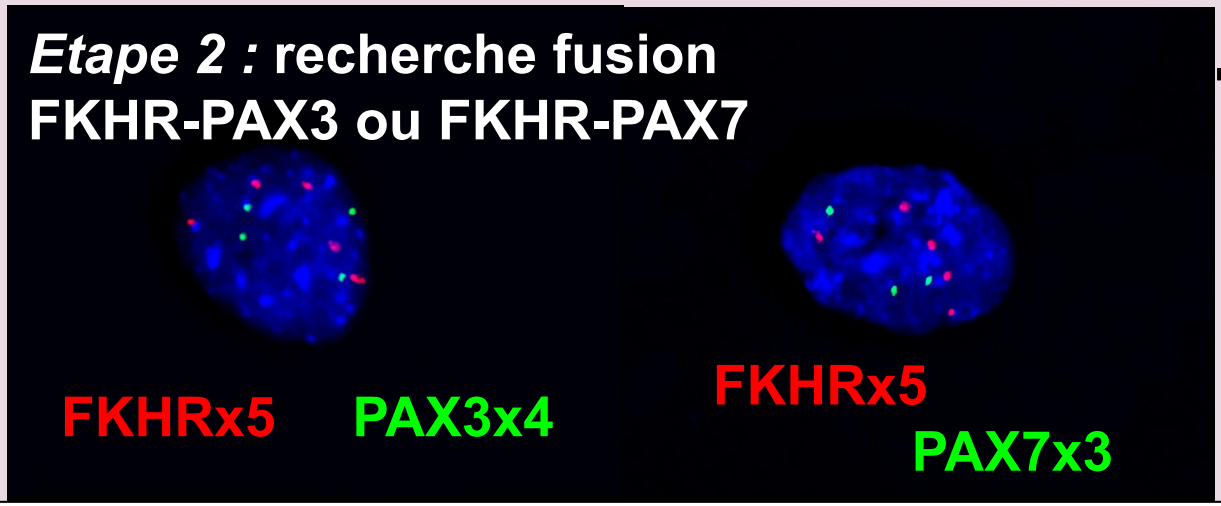
DETECTION PAR FISH D'UN REMANIEMENT SPECIFIQUE

Exemple d'un cas de rhabdomyosarcome pelvien chez un enfant :

Examen histologique plutôt en faveur d'un rhabdomyosarcome embryonnaire, mais doute++: forme alvéolaire ?



→ **Pas de fission de *FKHR* mais gain du gène (5 copies/cellule) : pentasomie 13**



→ **Pas de fusion *FKHR-PAX3/7* mais gains:**

pentasomie 13
trisomie 1 et
tétrasomie 2

Conclusion : profil de rhabdomyosarcome embryonnaire

Sarcomes à caryotypes « intermédiaires »

Aspects moléculaires des dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand : implications diagnostiques et thérapeutiques

Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand (DFSP)

Tumeur dermo-hypodermique de malignité intermédiaire



Image: Pr C Lebbe

Prolifération à cellules fusiformes,
organisation « en roue de chariot », CD 34+++

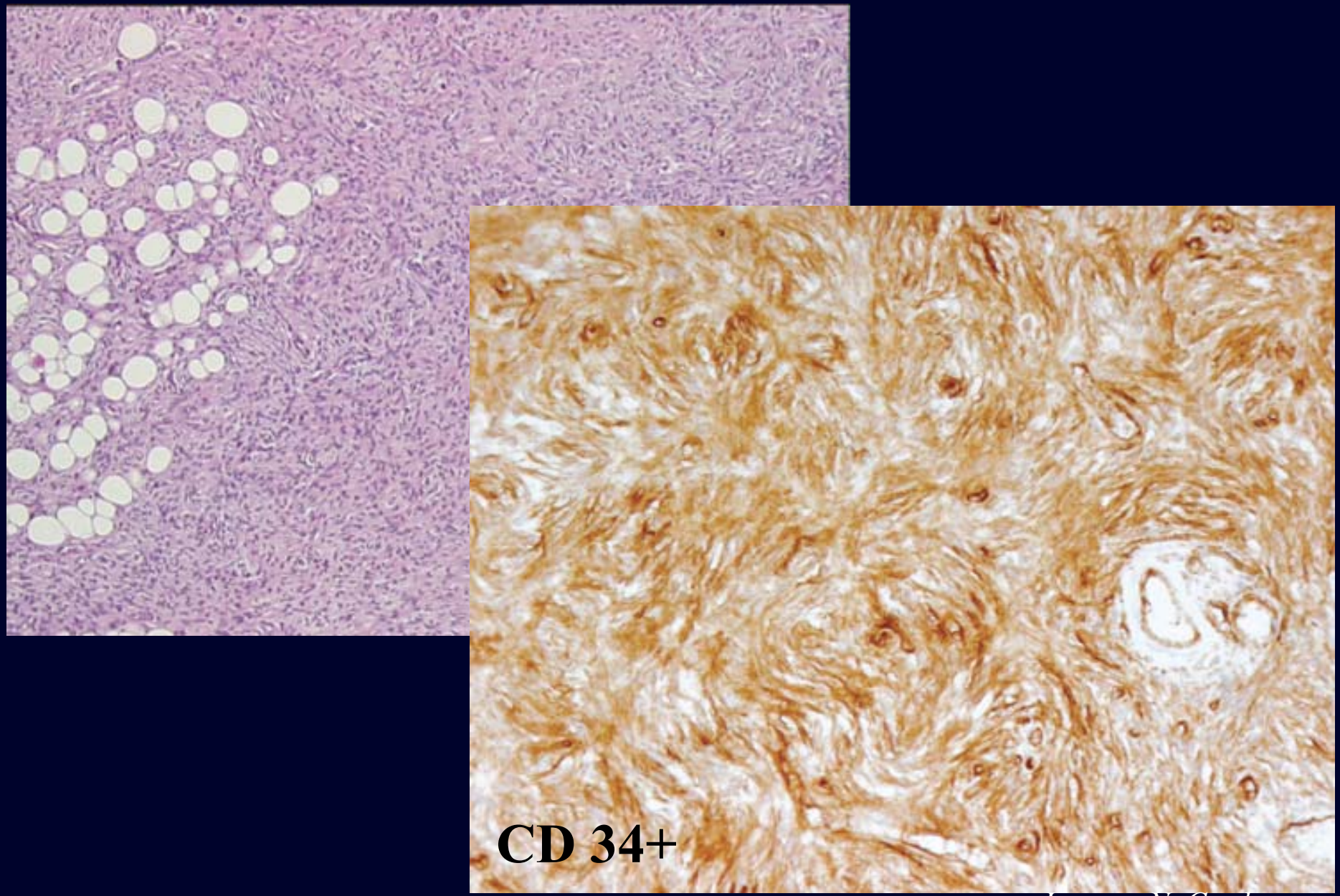
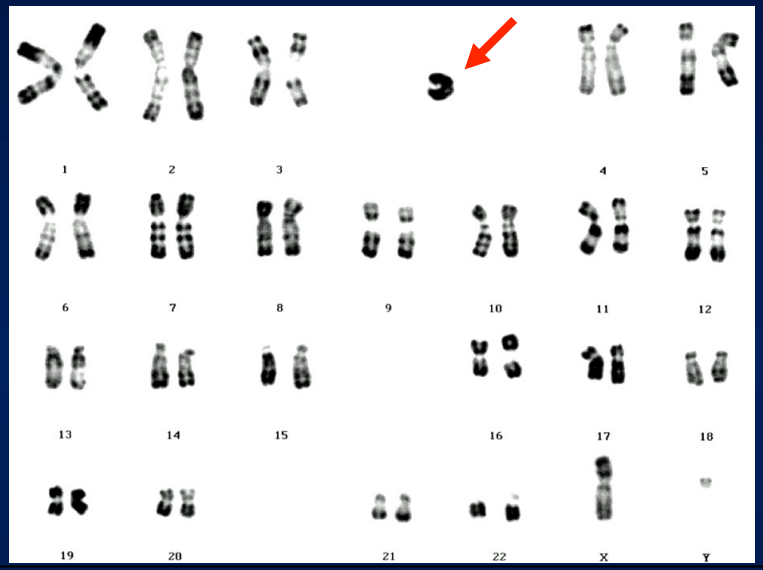


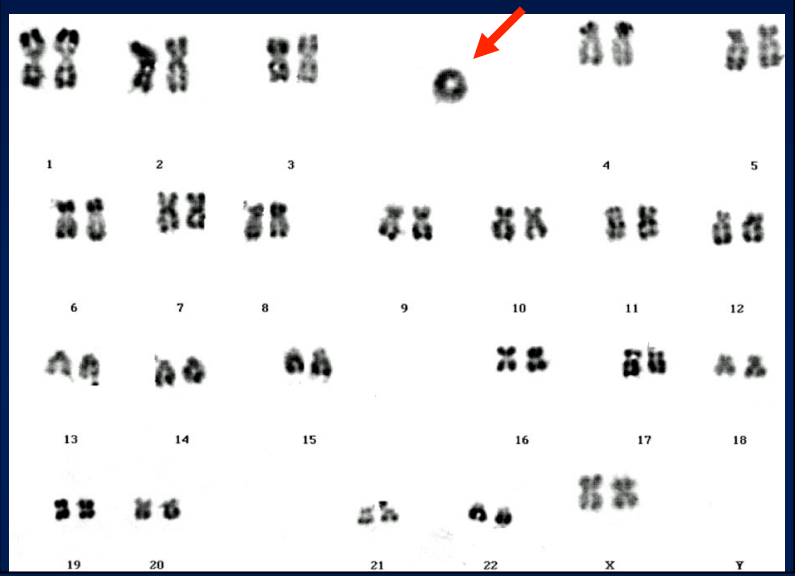
Image : N. Cardot

Analyse Cytogénétique

Dermatofibrosarcoma Protuberans



Liposarcome bien différencié



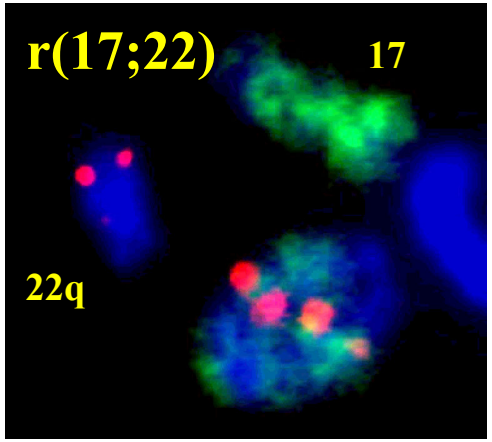
Chromosome en anneau surnuméraire

Caractéristique des tumeurs mésenchymateuses de malignité intermédiaire ?

Bridge et al;1990 ;Mandahl et al, 1990; Örndal et al., 1992

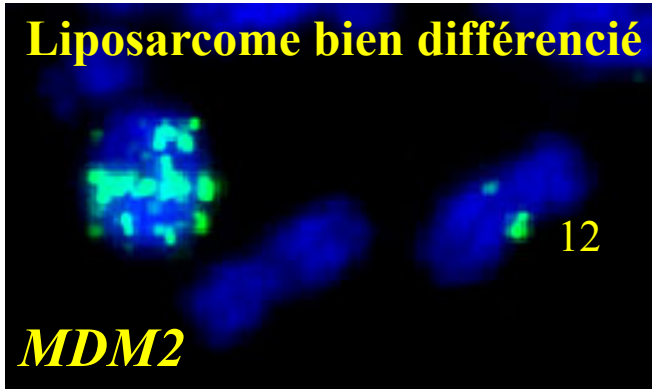
FISH

Dermatofibrosarcoma Protuberans



anneau composé de séquences issues de :

- **chromosome 17**
- **chromosome 22**
- **centromère 22**



Composition de l ’anneau :

- **amplification de *MDM2* *(12q14-15)***
- **structure complexe**
- **néocentromère**

…pas de similitude moléculaire entre les chromosomes en anneau des dermatofibrosarcomes et des liposarcomes...

…anneau des dermatofibrosarcomes

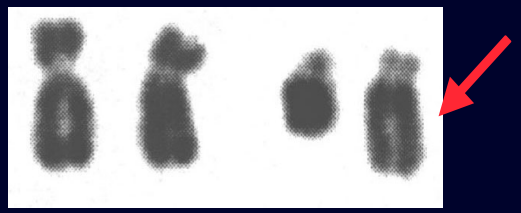
=

translocation (17;22) « circulaire » ?

(Pedeutour et al., 1993, 1994, 1995)

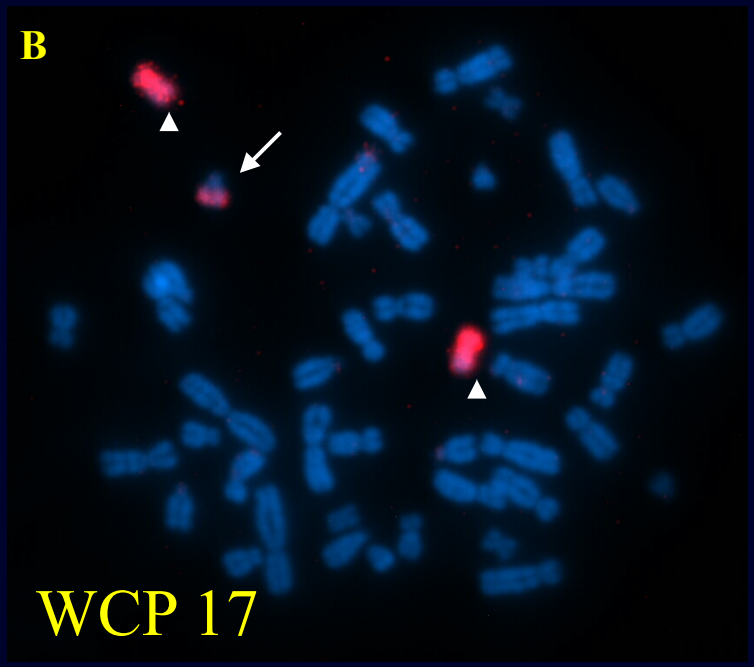
Dermatofibrosarcoma protuberans pédiatriques : translocations non équilibrées t(17;22)(q22;q21.3)

A



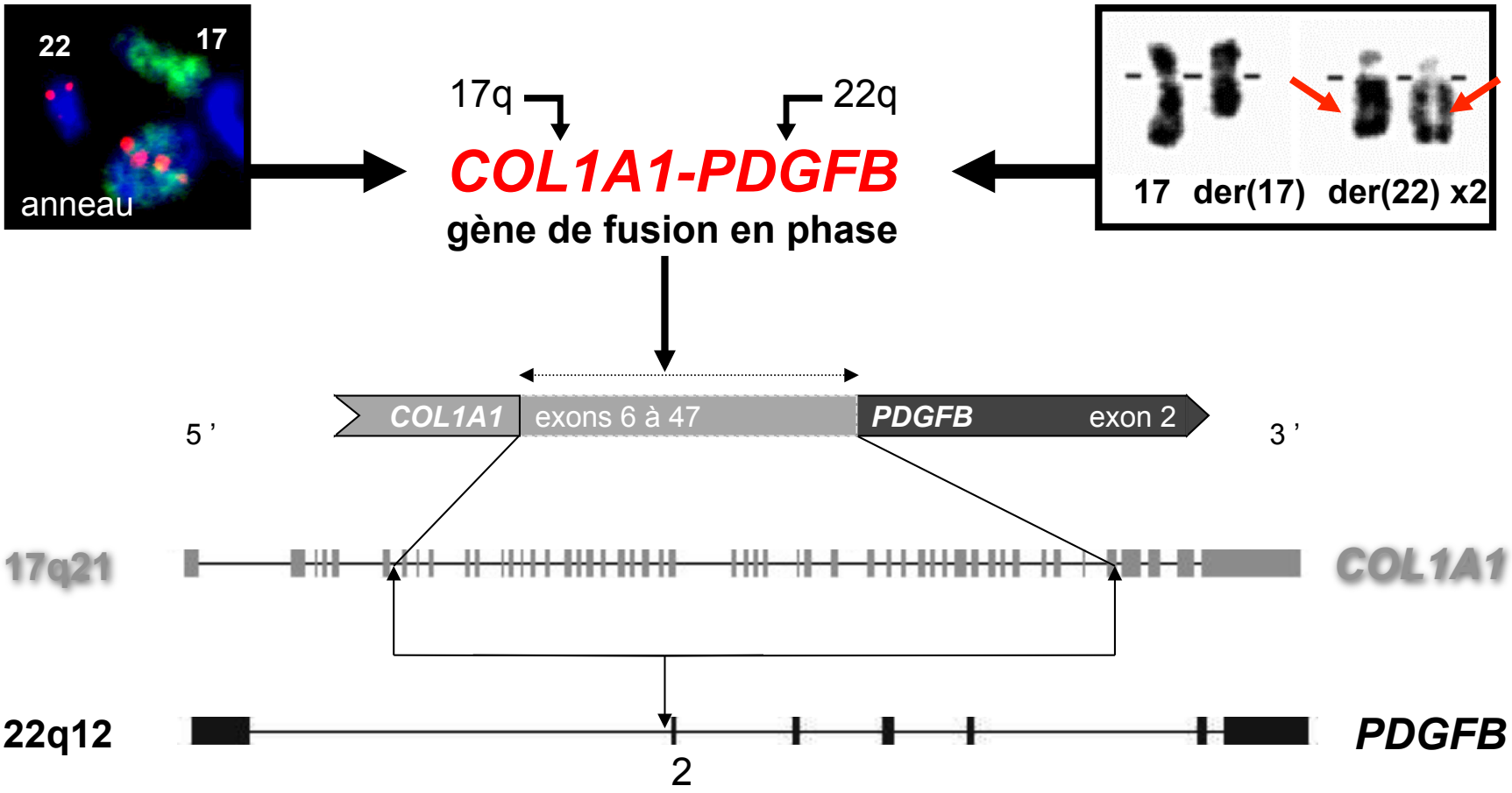
17 22

B



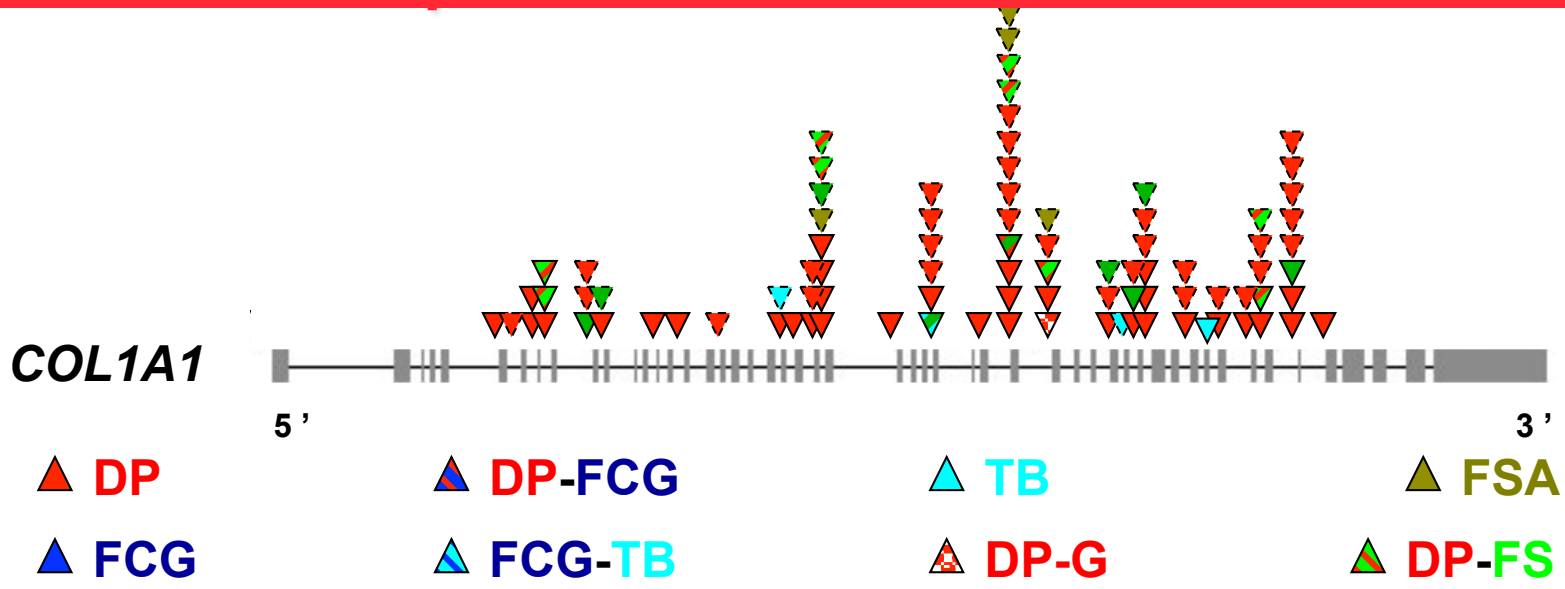
t(17;22)…gène de fusion ?

Identification du gène de fusion



(Simon et al., 1997)

Variabilité du point de cassure dans *COL1A1*



→ **pas de corrélation entre la cassure dans un exon donné de *COL1A1*et les caractéristiques histologiques :**
DFSP « classique », tumeur de Bednar, fibroblastome à cellules géantes, dermatofibrosarcome à cellules granuleuses, formes fibrosarcomateuses …..

COL1A1-PDGFB

Signature moléculaire d’une famille de tumeurs :

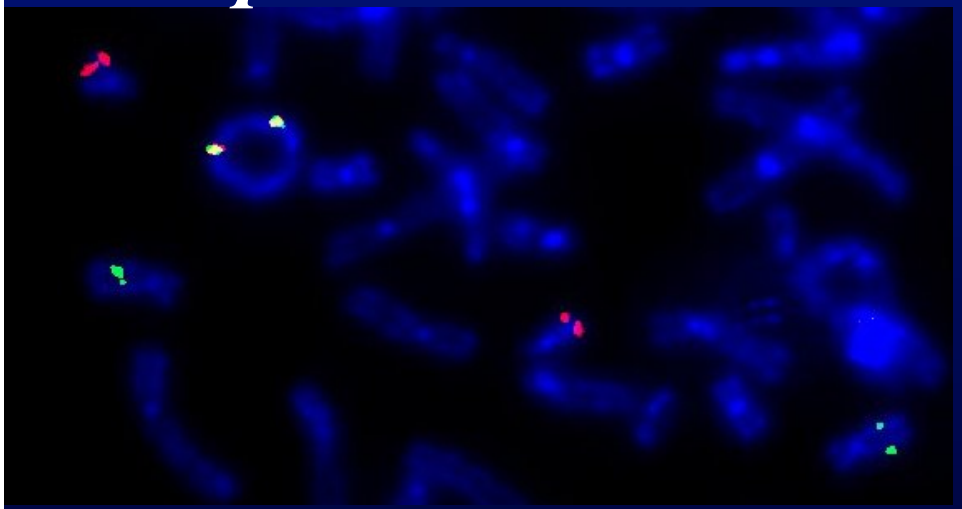
famille des tumeurs du DFSP

Diagnostic par FISH

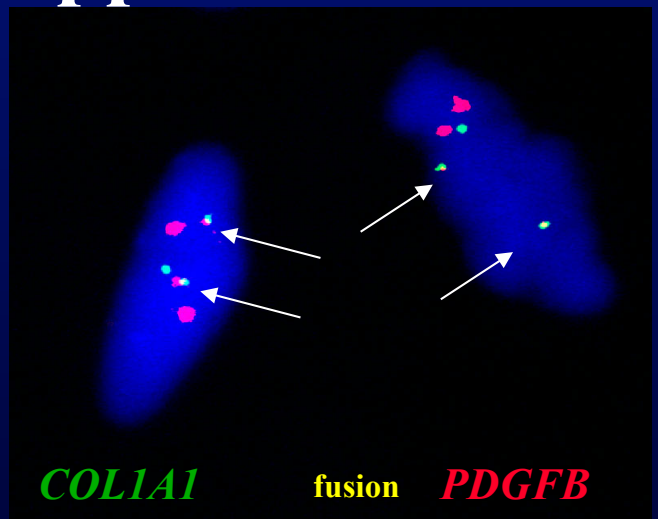
COL1A1 *PDGFB*

COL1A1
PDGFB

Métaphases

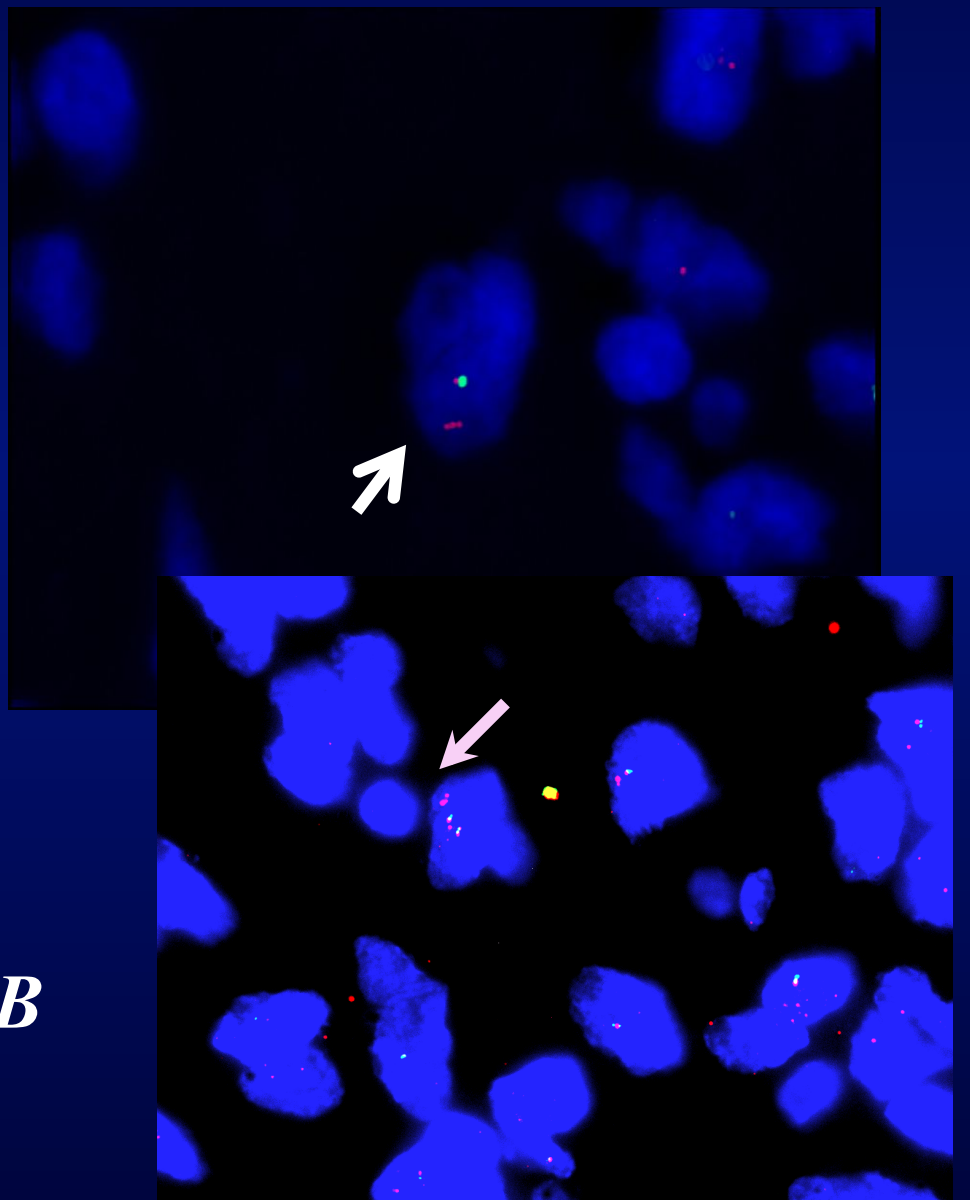


Coupes tumorales
-Cryocoupes
-Coupes fixées-paraffine (sauf Bouin)
Appositions+++





Vérification de la présence ou de l’absence du remaniement avec couple de sondes détectant la fission de *PDGFB*



Gène de fusion *COL1A1-PDGFB*
marqueur génétique des dermatofibrosarcoma protuberans

- Localisation anatomique inhabituelle
- Histologie ou présentation atypique
- Plaques, formes non nodulaires

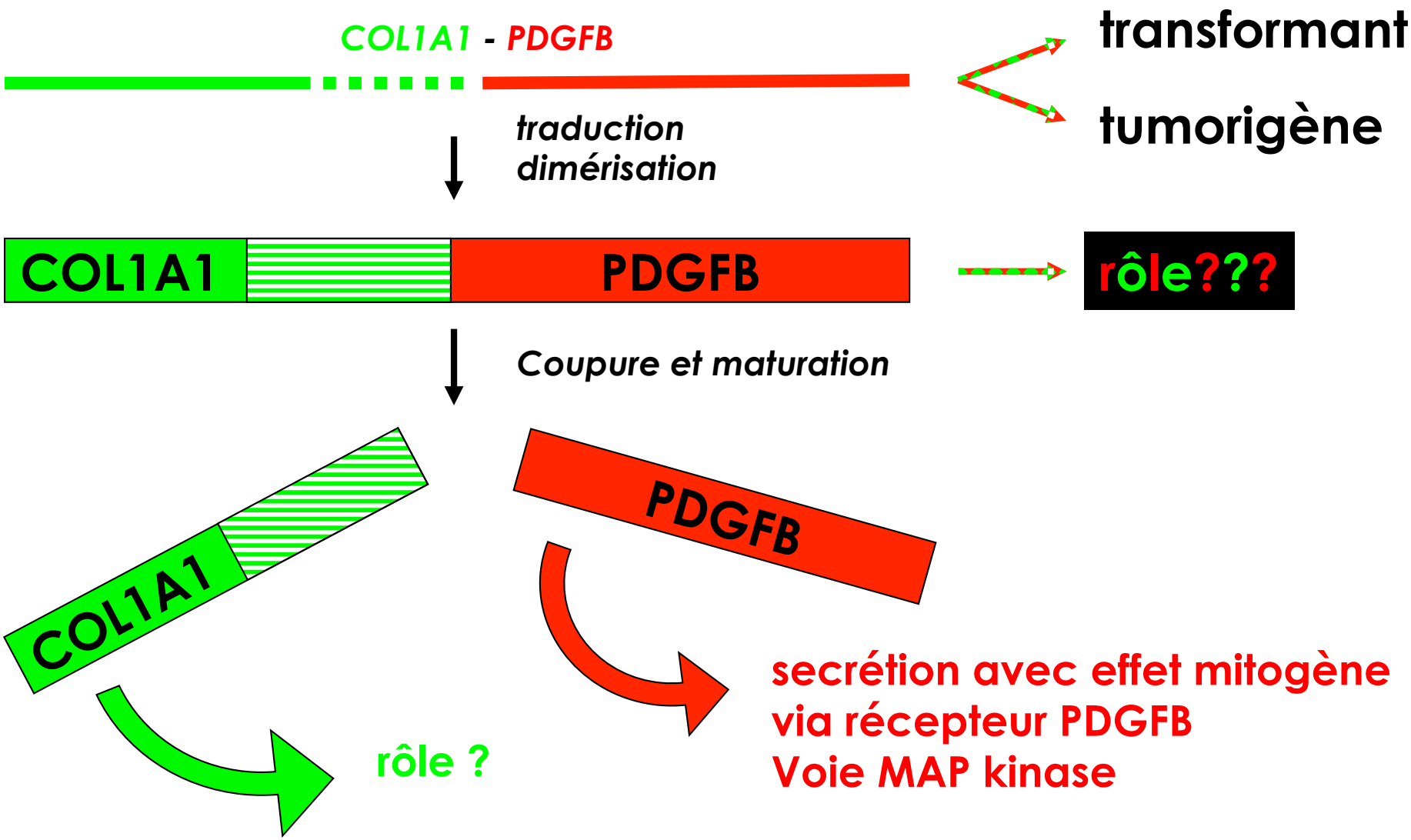
- Tumeurs à cellules fusiformes CD34+ de diagnostic incertain
- Cas pédiatriques
- Indication de traitement par imatinib mesylate

DFSP et traitement par imatinib mesylate (Glivec)

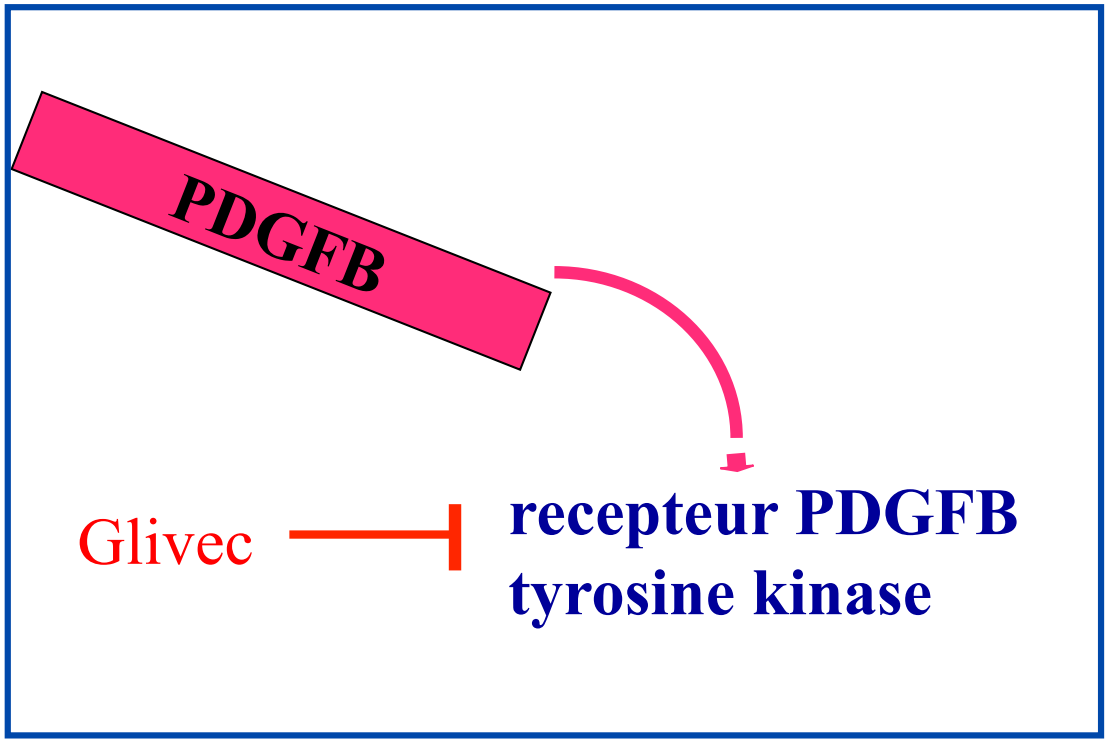
Proteine chimérique COL1A1-PDGFB

(Greco et al., 1998 ; Shimizu et al., 2000 ;Simon et al., 2001)

In-vitro and animal studies



Traitement ciblé par inhibiteur de tyrosine kinase :
imatinib mesylate (Glivec)

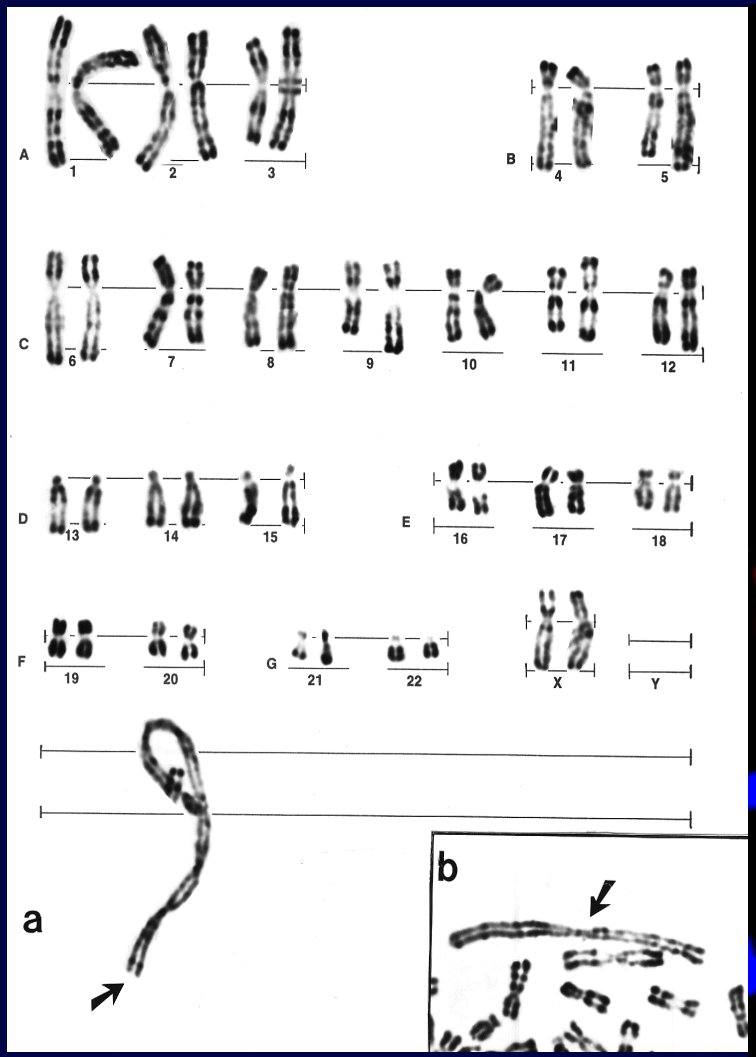


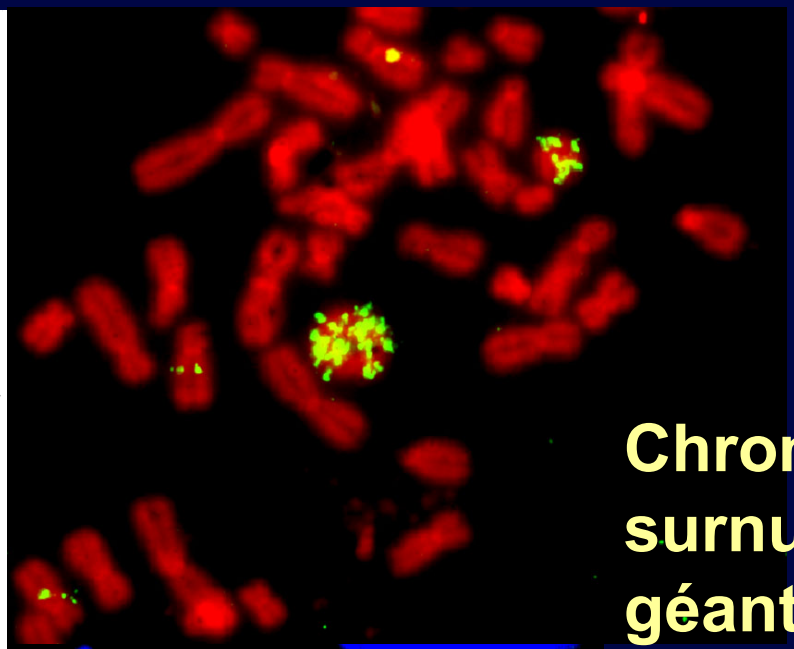
Inhibition de croissance
in vitro

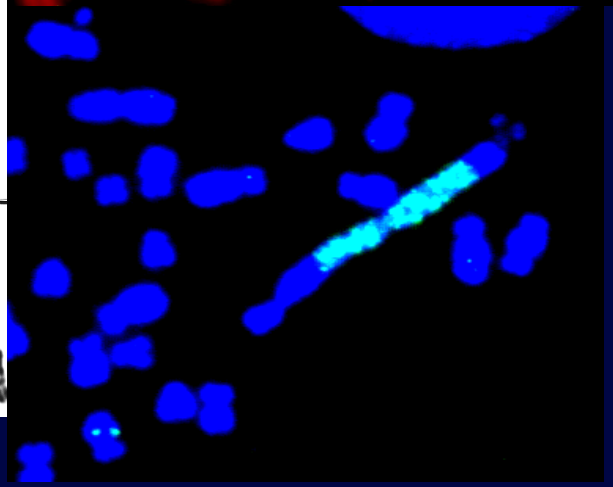
Résultats spectaculaires
chez plusieurs patients
métastatiques
ou tumeurs volumineuses
inopérables
Mais : quelques patients
non répondeurs

Essais cliniques tumeurs non métastatiques :
Traitement néo-adjuvant pour régression tumeur avant exérèse

Liposarcomes bien différenciés







Chromosomes surnuméraires géants ou en anneau contenant une amplification de *MDM2* et autres gènes

TUMEURS DU TISSU ADIPEUX

Tumeurs d'origine mésenchymateuse

Vaste groupe comprenant :

Des tumeurs bénignes

Lipomes "classiques" : tumeur humaine la plus fréquente

Hibernomes

Lipoblastomes

Lipomes à cellules fusiformes, angiomyolipomes, lipomes chondroïdes…

Des tumeurs malignes

Liposarcomes bien différenciés (lipoma-like, sclérosants, inflammatoires, dédifférenciés)

Liposarcomes myxoïdes

Liposarcomes pléiomorphes

Liposarcomes à cellules rondes

Liposarcomes à cellules fusiformes

Lipomes « classiques »

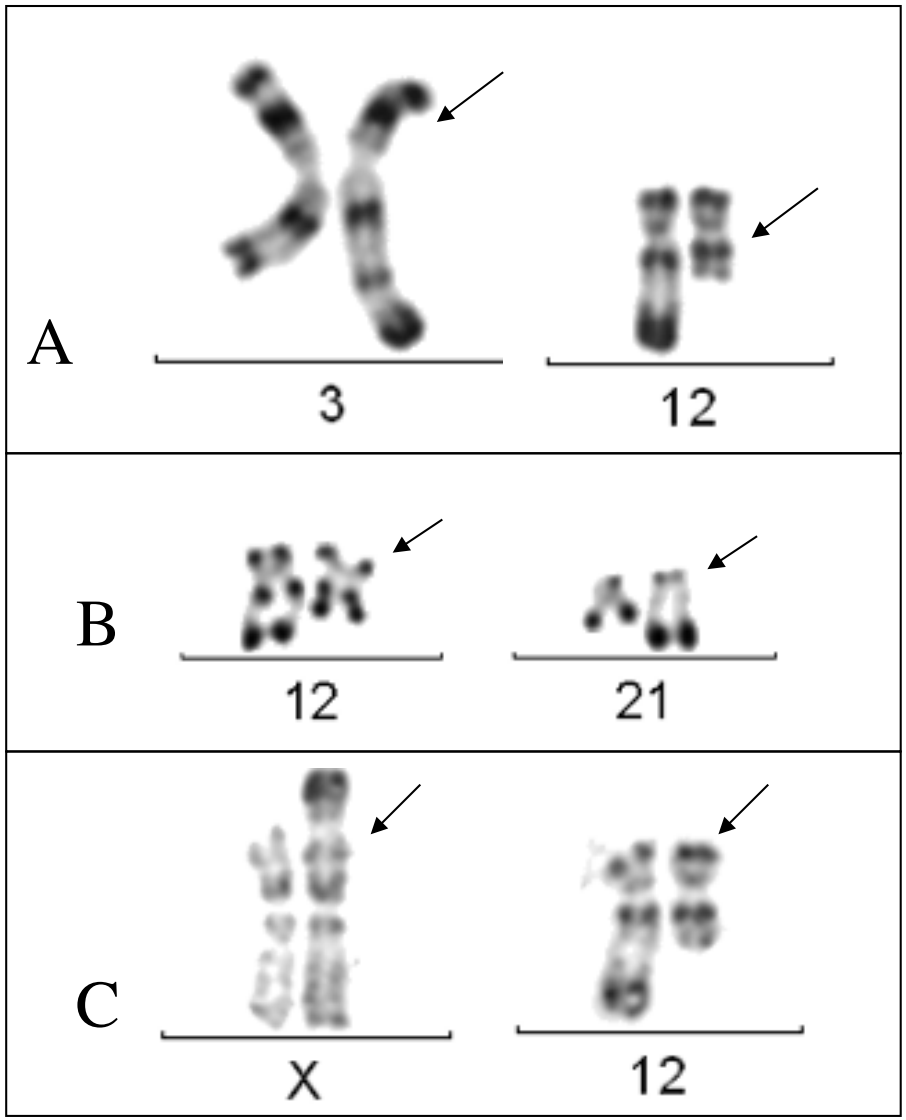
Tumeurs bien circonscrites, sous-cutanées, constituées d'adipocytes matures

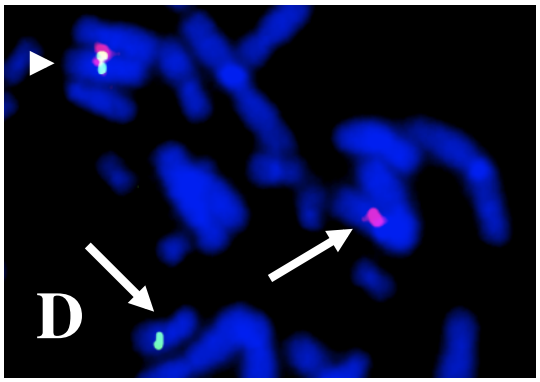
20 à 40% des cas : caryotype normal (cellules stromales? anomalies cryptiques?)

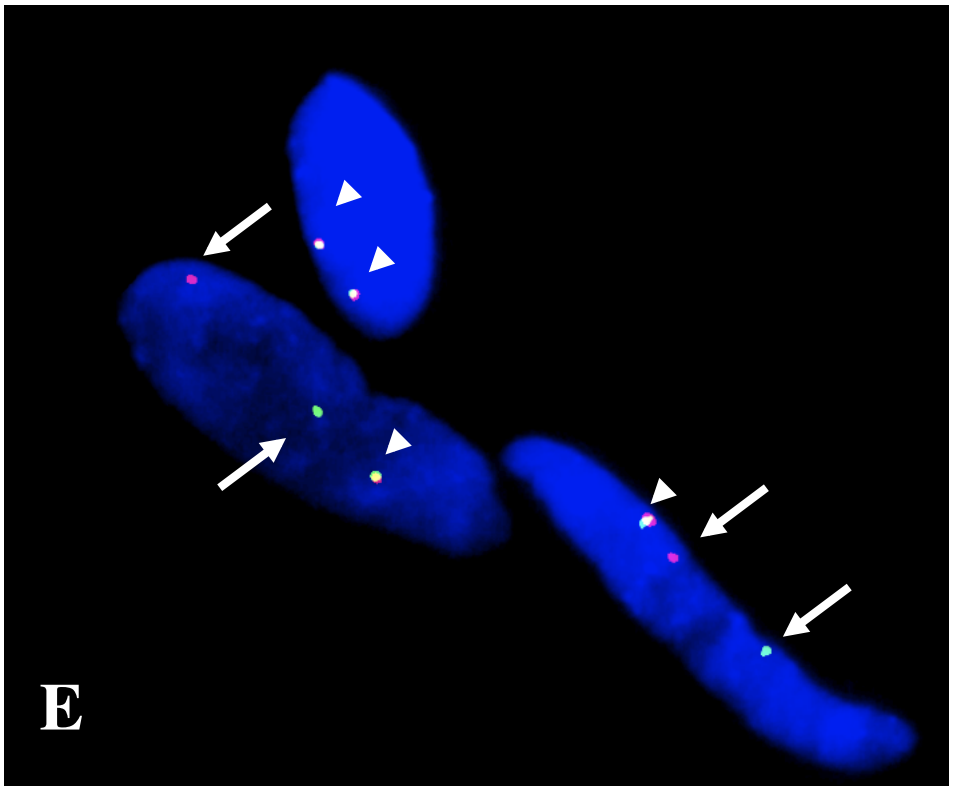
Anomalie la plus fréquente : touche le chromosome 12, en 12q14

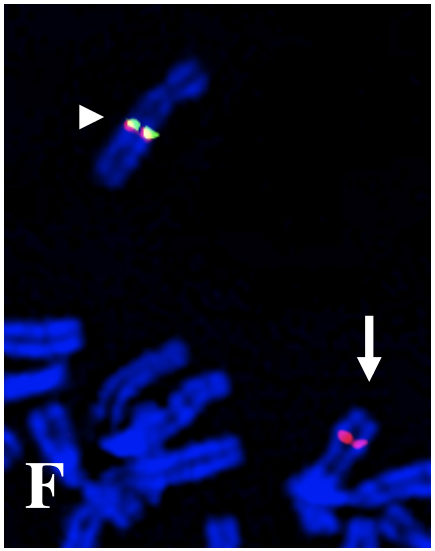
- ***Le plus souvent t(3;12)(q27;q14)***
- ***Grande variabilité des partenaires de translocation***
- ***Grande variabilité du type de remaniement (inversions, insertions, délétions…)***

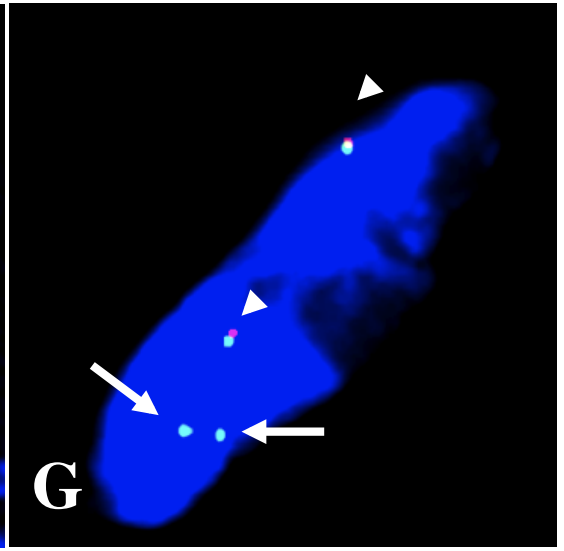
Cassure en 12q14 dans le gène HMGA2


A
3
12
B
12
21
C
X
12


D


E

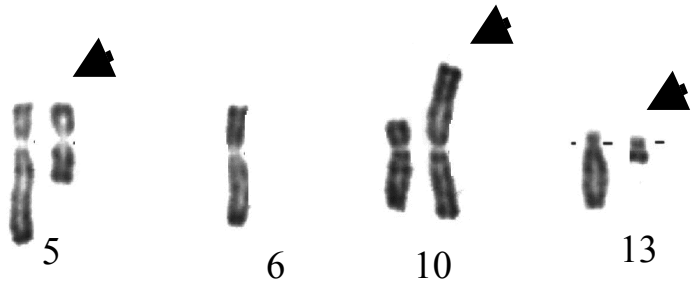

F


G

Lipomes à cellules fusiformes

délétion 16q

délétion 13q



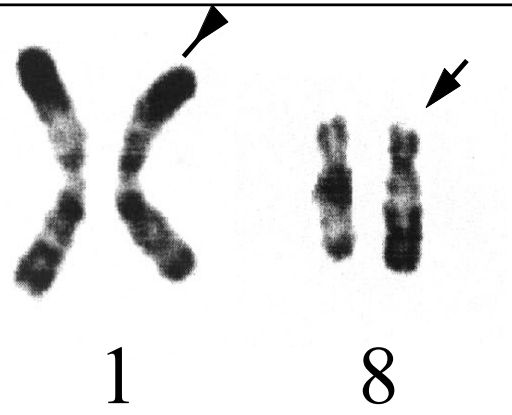
Ex : délétion 13q associée à autres anomalies dans un lipome à cellules fusiformes

Lipomes chondroïdes

t(11;16)

Lipomes profonds, intramusculaires

anomalies variables



Ex : t(1;8) complexe dans un lipome rétropéritonéal

Lipoblastomes

Anomalies de 8q11-13 impliquant le gène *PLAG1*

Hibernomes

Aspect histologique : graisse brune

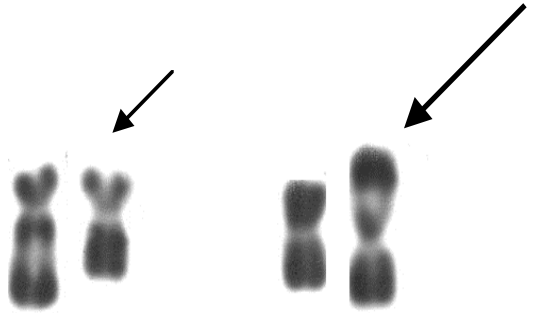
Anomalies homozygote des chromosomes 11 à type de délétions complexes de la région 11q13

Liposarcomes myxoïdes /Liposarcomes à cellules rondes

t(12;16)(q13;p11)

Gènes impliqués : *CHOP-GADD1*.
FUS-TLS

Diagnostic possible par RT-PCR



Liposarcomes pléiomorphes

Caryotypes complexes, polyploïdies

Liposarcomes à cellules fusiformes

Très peu de cas étudiés

LIPOSARCOMES BIEN DIFFERENCIES

Adipocytes matures et cellules atypiques

5 sous-types histologiques

Localisation rétropéritonéale ou périphérique

Malignité intermédiaire : agressivité locale mais rarement métastatique

« Dédifférenciation » possible (en fait : apparition d'une composante indifférenciée)

Difficulté du diagnostic : utilité des marqueurs génétiques

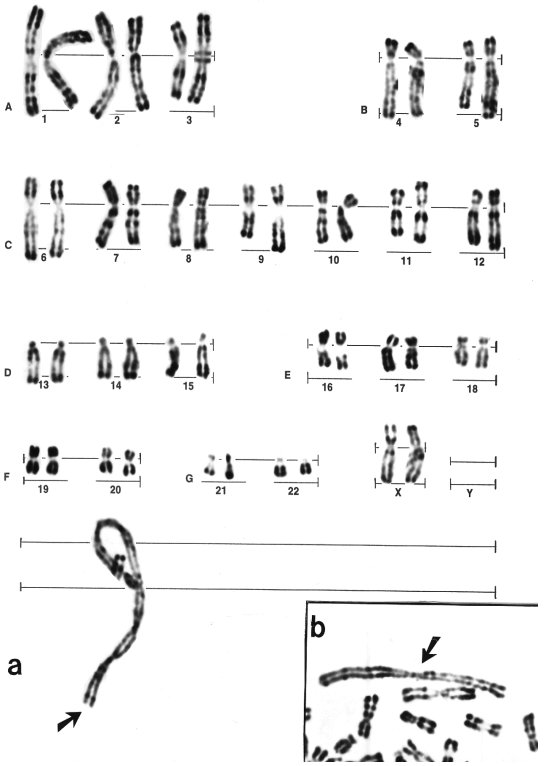
***difficulté lipome/liposarcome bien différencié**

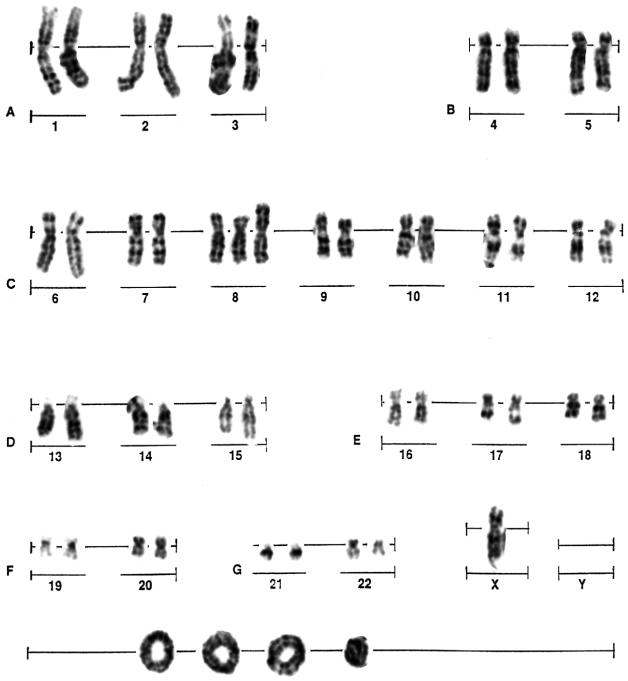
***difficulté liposarcome dédifférencié/autre tumeur peu différenciée (sarcome, carcinome…)**

Liposarcome bien différencié

Analyse cytogénétique

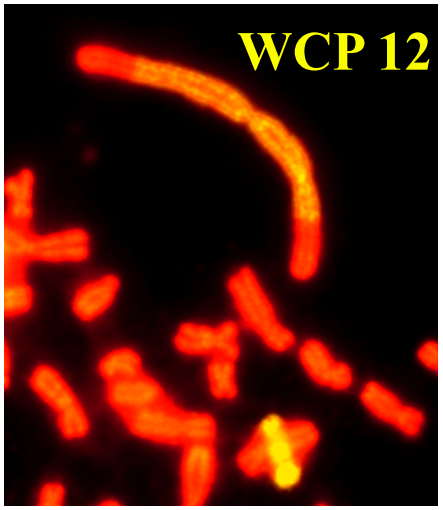
Chromosomes surnuméraires géants ou en anneau ...





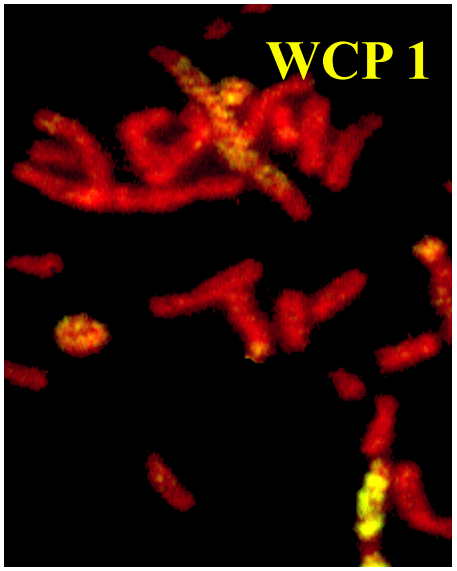
... non identifiable par méthodes cytogénétique conventionnelle

Identifiables par FISH



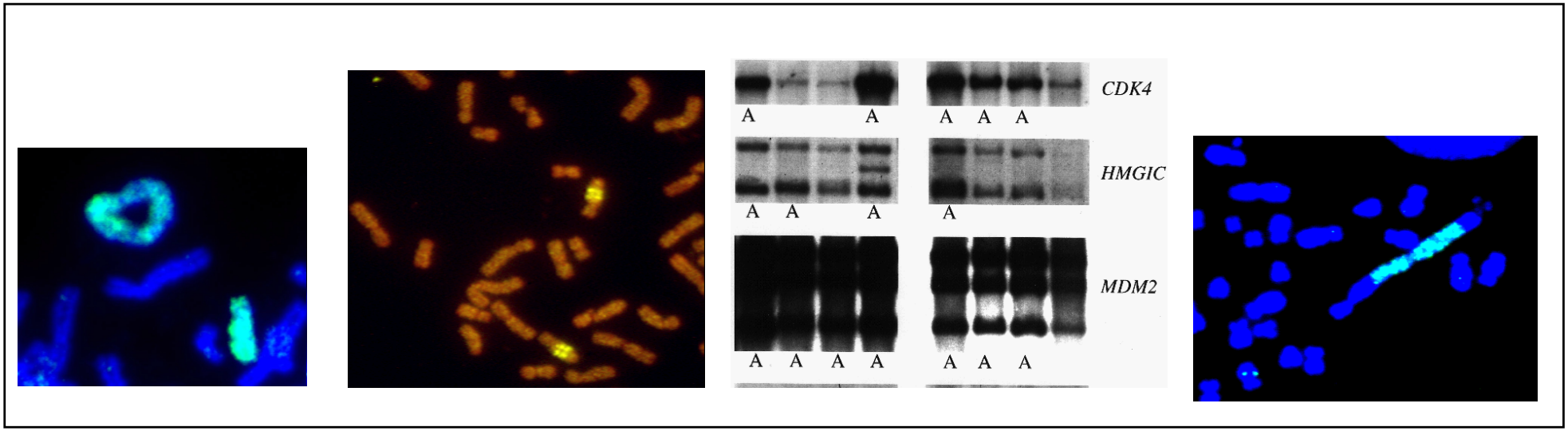
Présence constante de séquences du chromosome 12

et

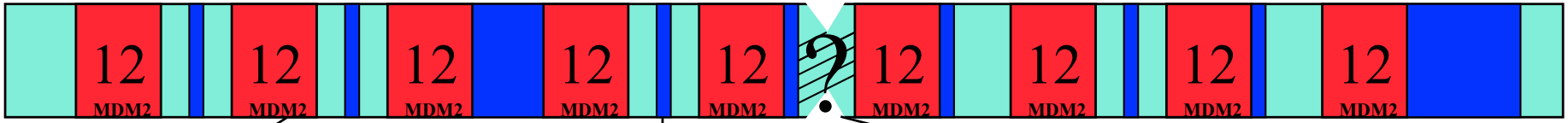


Présence fréquente d'autres chromosomes (1, 4, 8....)

Chromosomes surnuméraires des LPS bien différenciés



Structures complexes avec altération du centromère contenant des co-amplification de régions chromosomiques variées, dont une amplification constante de *MDM2* (12q15)



amplification de *MDM2*

Aide au diagnostic

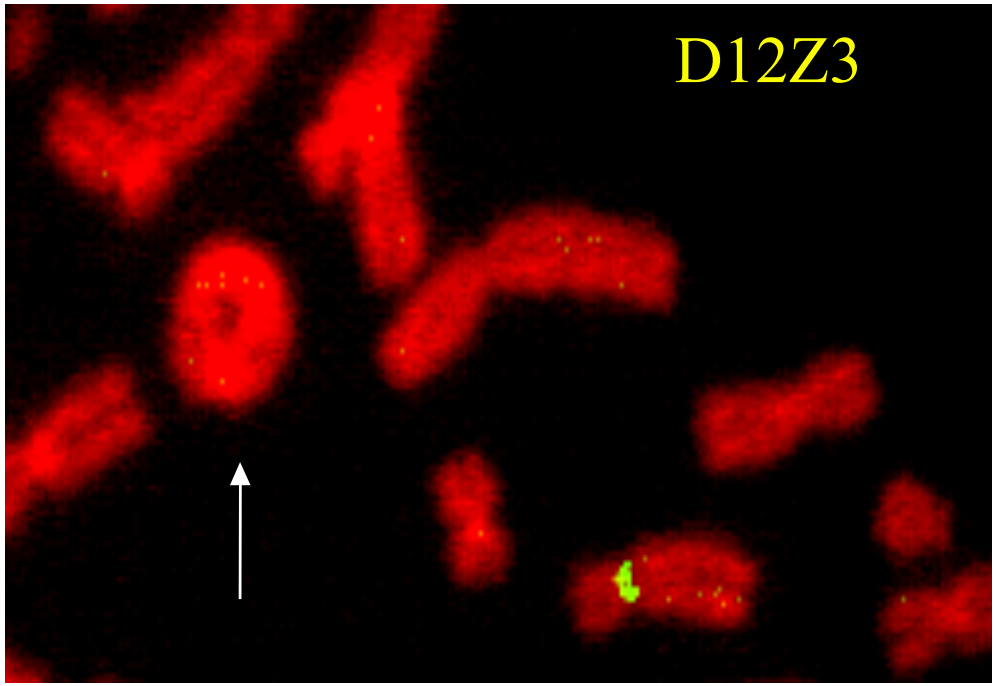
Rôle des autres gènes amplifiés ?

Établir des facteurs Pronostiques ?

Mecanisme de formation ?
Origine centromérique ?

Identification du centromère

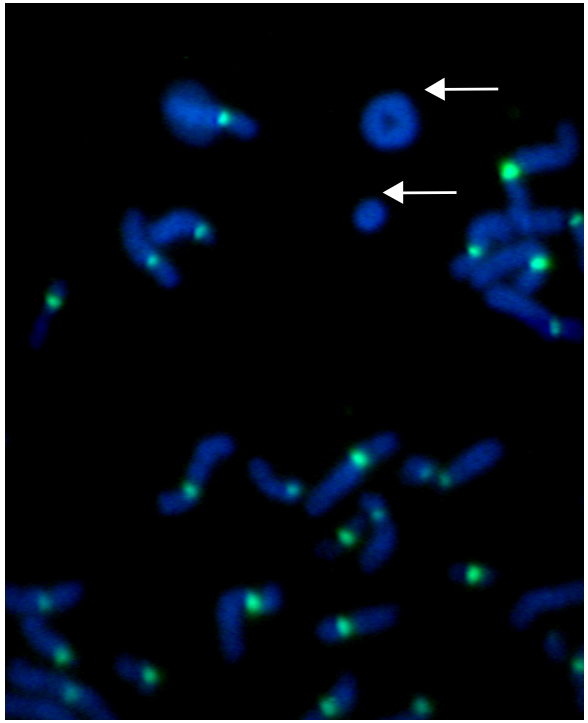
Sonde alpha-satellite chromosome 12: D12Z13



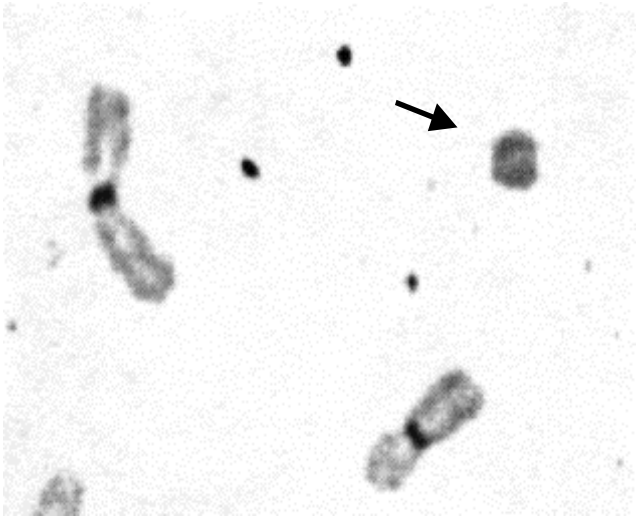
Absence de marquage sur les chromosomes surnuméraires

Identification du centromère

Absence de marquage avec la sonde alpha-satellite pancentromérique

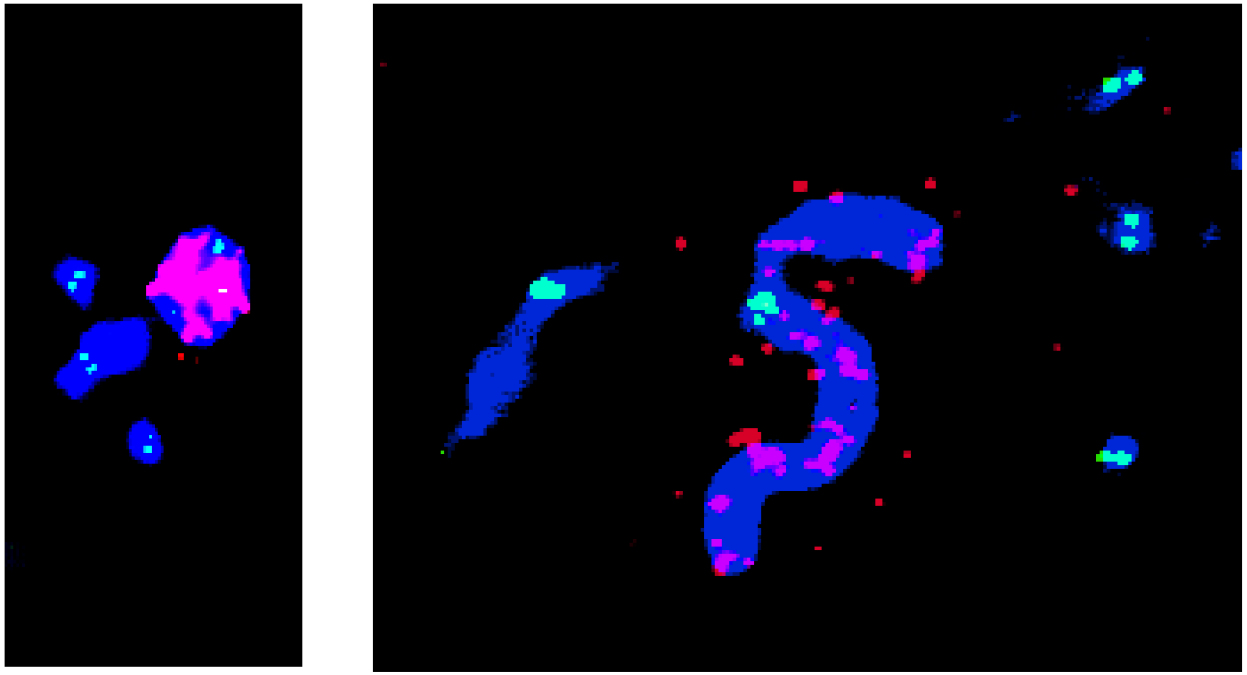


Bandes C négatifs



Chromosomes acentriques ?

ImmunoFISH : les anneaux et marqueurs surnuméraires contiennent un centromère fonctionnel

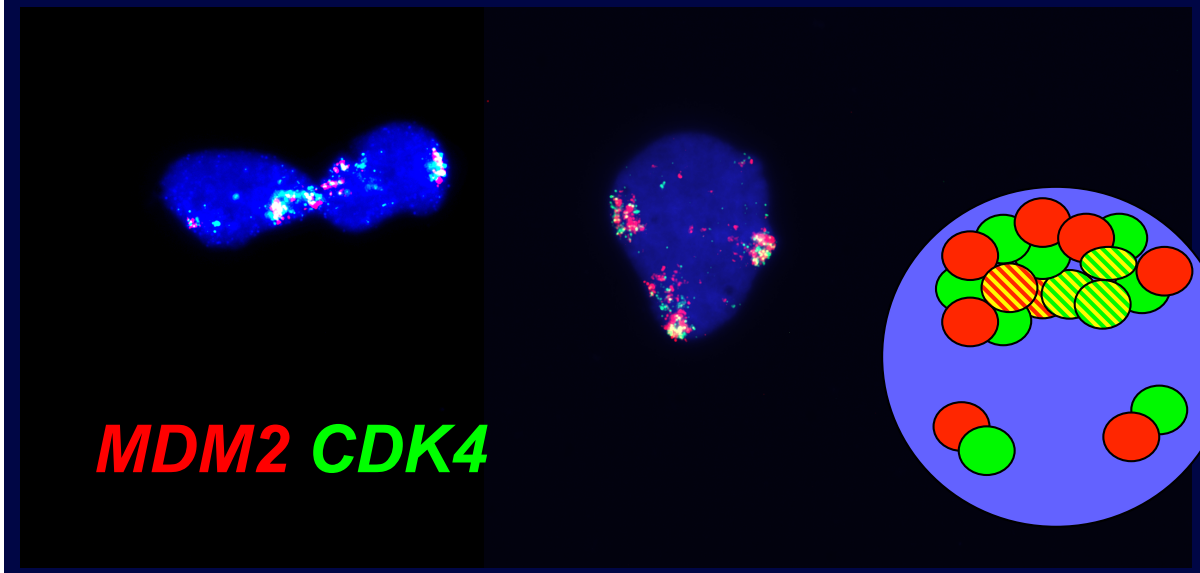


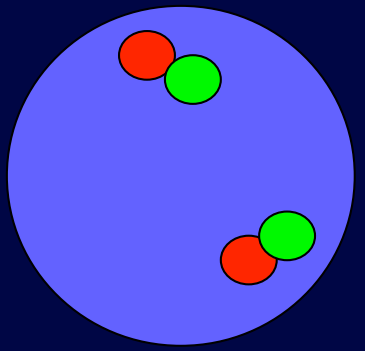
CDK4 (signal rouge) et anticorps anticentromère (signal vert)
Technique de fixation ménagée

Liposarcomes bien différenciés/dédifférenciés

Application : recherche de l'amplification de *MDM2* dans l'aide au diagnostic des tumeurs adipocytaires

1) Diagnostic différentiel tumeur adipeuse bénigne versus liposarcome bien différencié
2) Diagnostic différentiel liposarcome dédifférencié versus sarcome peu différencié ou autre tumeur maligne peu différenciée

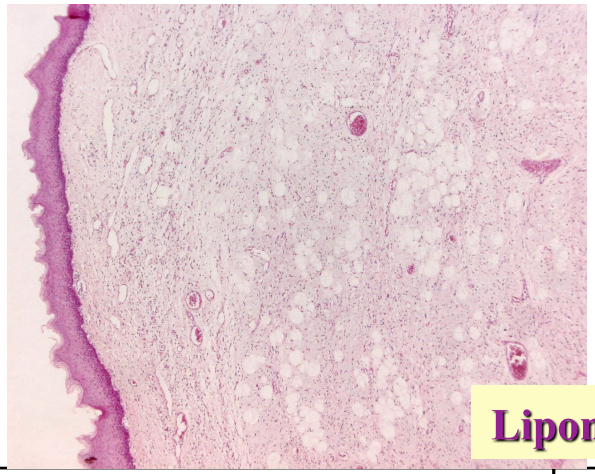


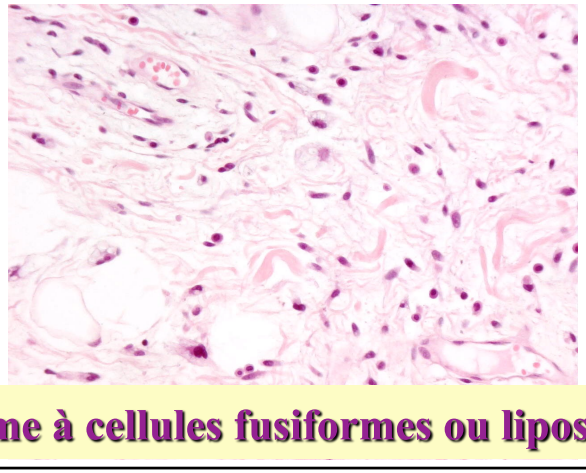


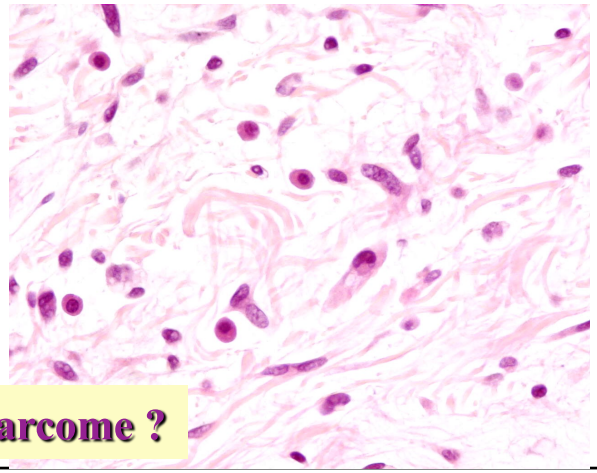
non amplifié=
autre tumeur

Amplifié = liposarcome bien différencié ou dédifférencié

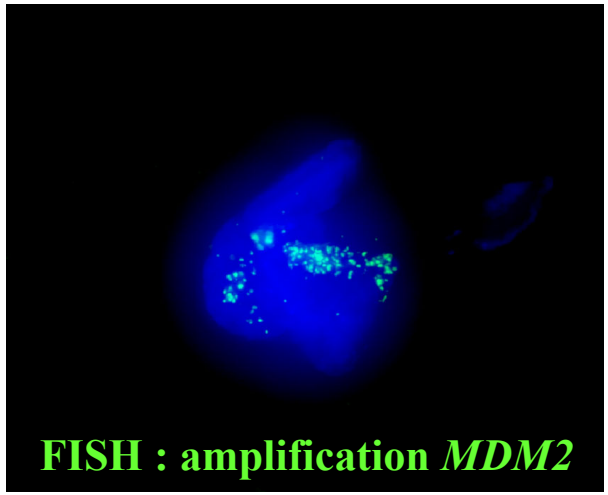
Homme 75 ans - Tumeur pharyngée

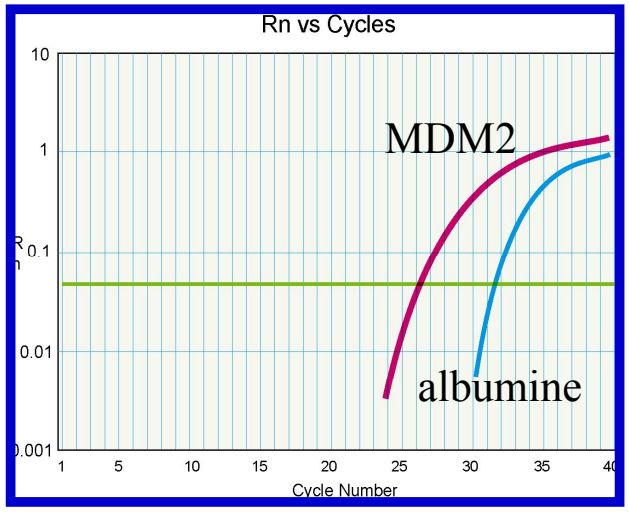


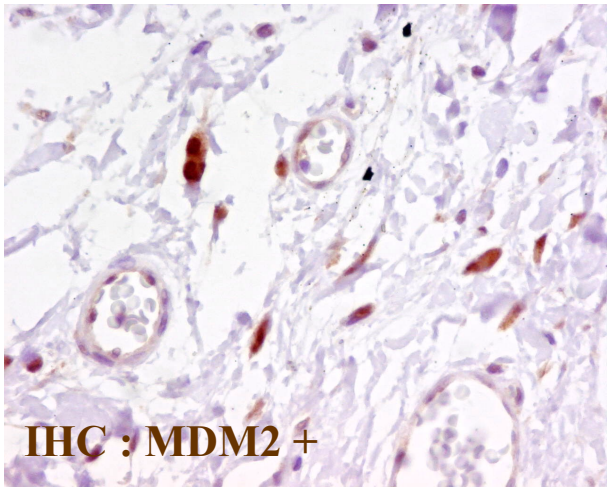




Lipome à cellules fusiformes ou liposarcome ?



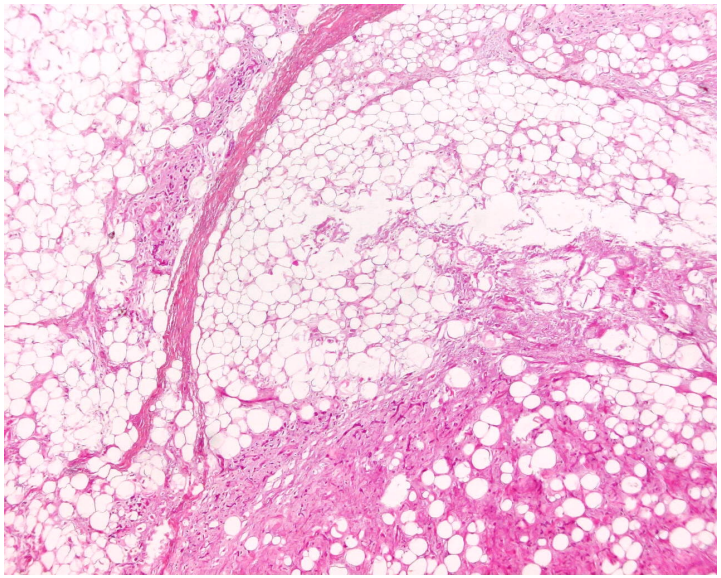


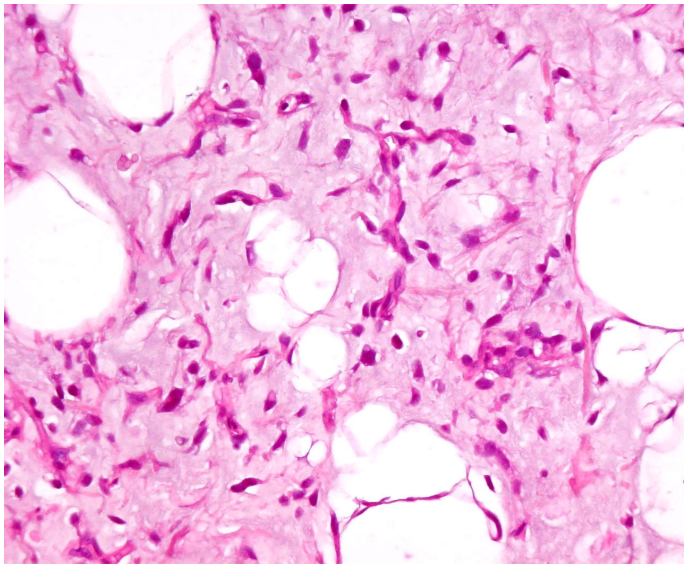


Conclusion : liposarcome bien différencié sclérosant

Femme 26 ans - Tumeur rétropéritonéale 15 cm

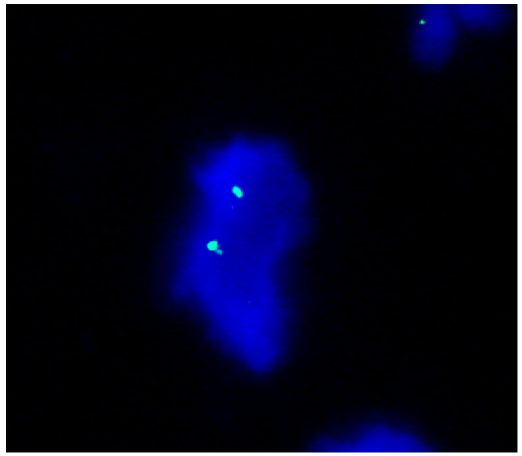
Tumeur adipeuse bien différenciée avec zones myxoïdes comportant des cellules à noyau modérément atypique



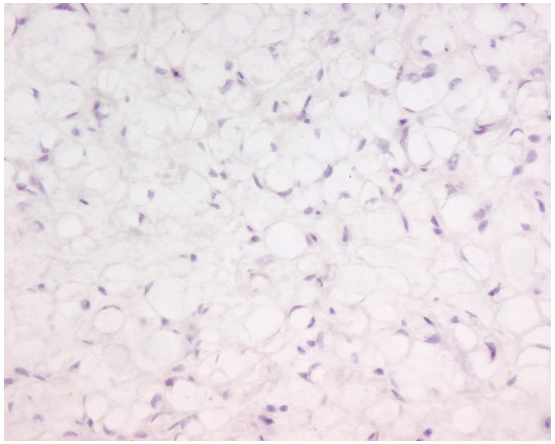


Liposarcome bien différencié ou lipoblastome ?

FISH *MDM2*-

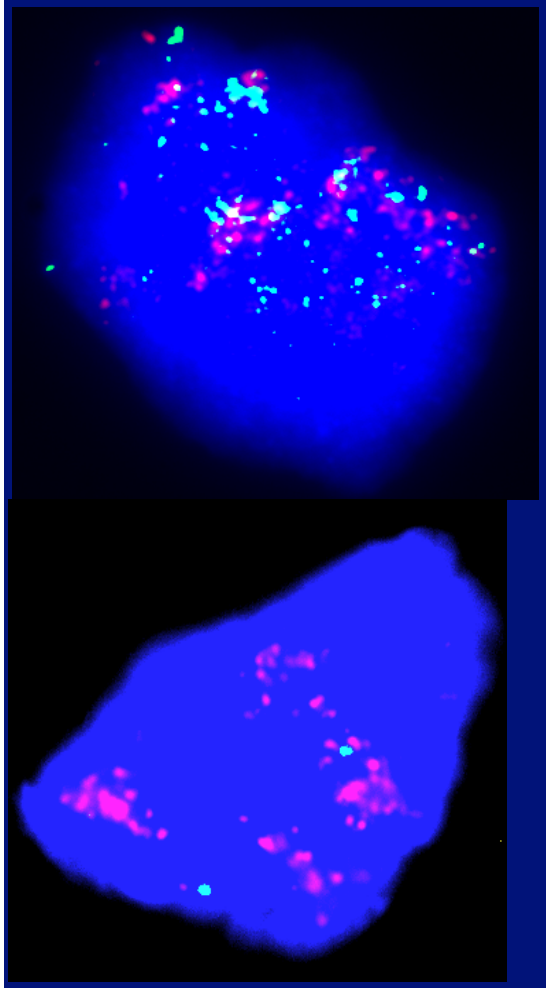


HIC MDM2-



Conclusion : lipoblastome - à vérifier par analyse du remaniement de *PLAG1* (8q12)

TUMEUR ADIPOCYTAIRE DE DIAGNOSTIC DIFFICILE

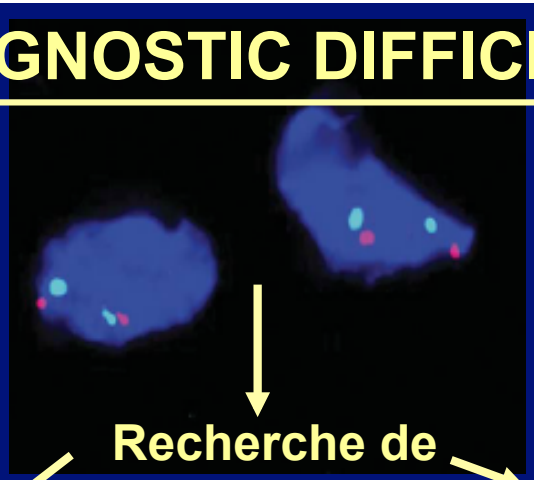


AMPLIFICATION

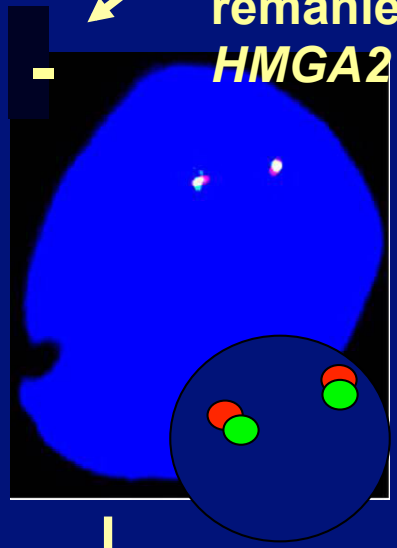
MDM2
CDK4

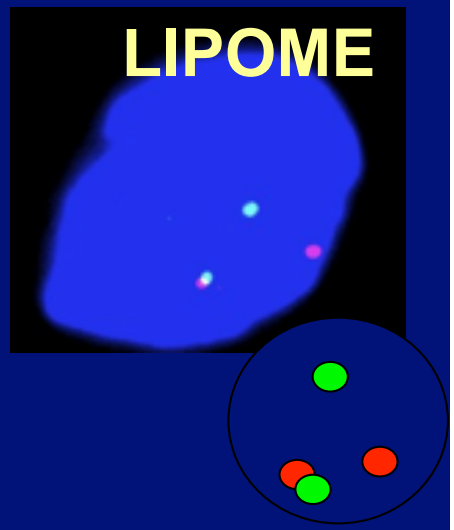
LIPOSARCOME BIEN DIFFÉRENCIÉ OU DEDIFFERENCIE

NON AMPLIFIE



Recherche de remaniement *HMGA2*

\- 

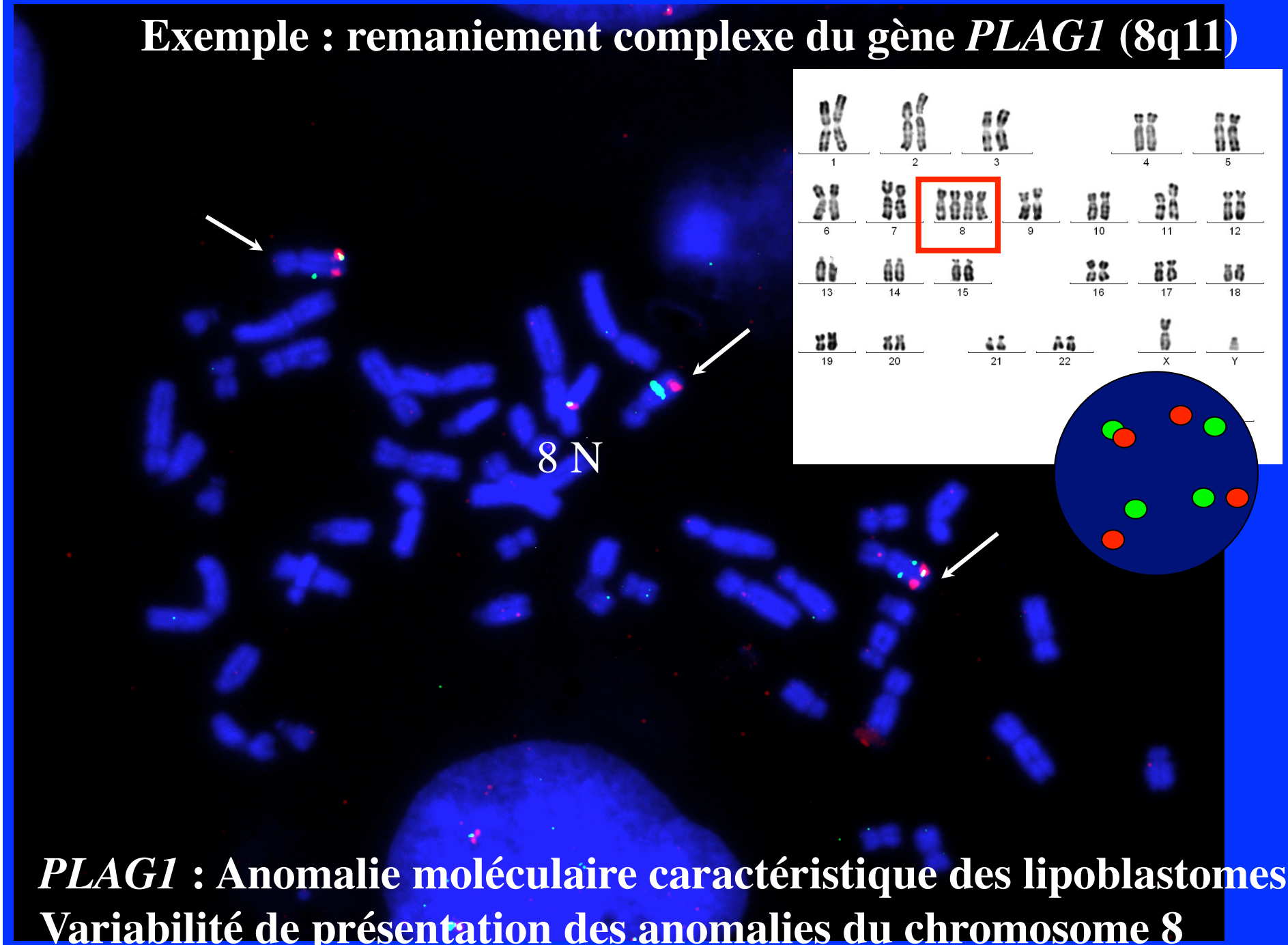
\+ 

LIPOME

?

Autres recherches :
PLAG1 (8q11)
HMGA1 (6p21)
del(13)(q 14) …

Exemple : remaniement complexe du gène *PLAG1* (8q11)



PLAG1 : Anomalie moléculaire caractéristique des lipoblastomes
Variabilité de présentation des anomalies du chromosome 8

Sarcomes à caryotypes « complexes »

Fibrosarcomes

Ostéosarcomes

Chondrosarcomes

Angiosarcomes

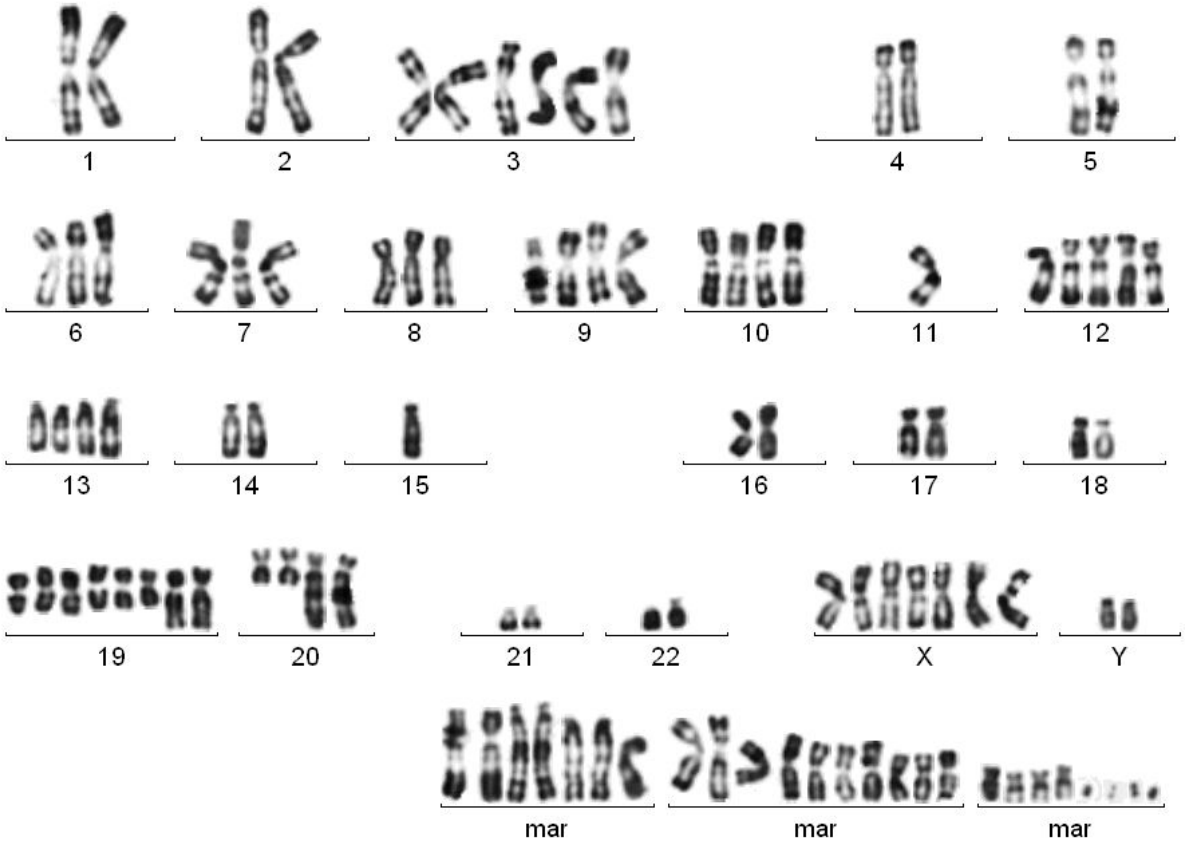
Léiomyosarcomes

« MFH » : histiocytomes fibreux malins…

« MFH » : histiocytomes fibreux malins…

Démembrement de ce groupe « fourre-tout » grâce à des méthodes de type array-CGH

= sarcomes indifférenciés



CONCLUSIONS

FISH et sarcomes : utilité +++

Découverte des anomalies spécifiques des sarcomes et tumeurs mésenchymateuses bénignes en complément du caryotype

Diagnostic des translocations, amplifications, délétions dans sarcomes et tumeurs mésenchymateuses bénignes

Choix de la méthode FISH et/ou PCR à discuter au cas par cas

Qualité de l'échantillon déterminante

Importance du contexte clinique et histologique dans l'interprétation des résultats +++