

SECTION PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MPA)

Chef

Dr Hiroko Ohgaki

Secrétariat

Anne-Sophie Hameau

Assistant de projet

Asiedua Asante

Assistants base de données

Alberto Machado

Delphine Nicolas

Assistants de recherche

Christine Carreira

Aurélie Salle

Chercheurs extérieurs et boursiers

Dr Shintaro Fukushima

(jusqu'en mars 2015)

Dr Xiang Jiao

(jusqu'en juillet 2014)

Dr Cong Li

(jusqu'en août 2015)

Dr Ji Eun Oh

Dr Takashi Ohta

(jusqu'en avril 2014)

Dr Kaishi Satomi

Dr Kei Seno

(jusqu'en août 2015)

Dr Koichiro Sumi

LA SECTION PATHOLOGIE MOLECULAIRE (MPA) CONDUIT DES RECHERCHES ORIGINALES DESTINEES A ELUCIDER LES BASES MOLECULAIRES ET LES VOIES GENETIQUES INTERVENANT DANS LA FORMATION DE TUMEURS CHEZ L'HOMME. LES OBJECTIFS SPECIFIQUES DE LA SECTION MPA CONSISTENT A I) PRODUIRE DES INFORMATIONS GENETIQUES QUI PERMETTRONT LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE ET LA CLASSIFICATION DES TUMEURS CEREBRALES, II) IDENTIFIER DES MARQUEURS GENETIQUES POUR LE PRONOSTIC ET LES NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES, ET III) UTILISER LES DONNEES GENETIQUES POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX INDICES PERMETTANT DE COMPRENDRE L'ETIOLOGIE DES CANCERS HUMAINS (KIM ET COLL., 2014A ; LOUIS ET COLL., 2014 ; OHGAKI ET COLL., 2014). LA SECTION MPA CONDUIT DES ETUDES GENETIQUES A PARTIR DE BIOPSIES TUMORALES DE PATIENTS DISPOSANT D'EXCELLENTE DONNEES CLINIQUES, RECUEILLIES AU NIVEAU DE LA POPULATION OU A L'ECHELLE INTERNATIONALE, POUR PRODUIRE UN ENSEMBLE DE DONNEES UNIQUES COMBINANT CARACTERISTIQUES PATHOLOGIQUES, GENETIQUES, CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES TUMEURS. LE PROGRAMME DE RECHERCHE DE LA SECTION MPA CONSTITUE UN ELEMENT ESSENTIEL DES OBJECTIFS DU CIRC QUI CONSISTENT A ELUCIDER LES MECANISMES DE CANCEROGENESE ET A COMPRENDRE L'ETIOLOGIE DU CANCER.

La Section MPA assure également la préparation de la série Classification OMS des Tumeurs (WHO *Blue*

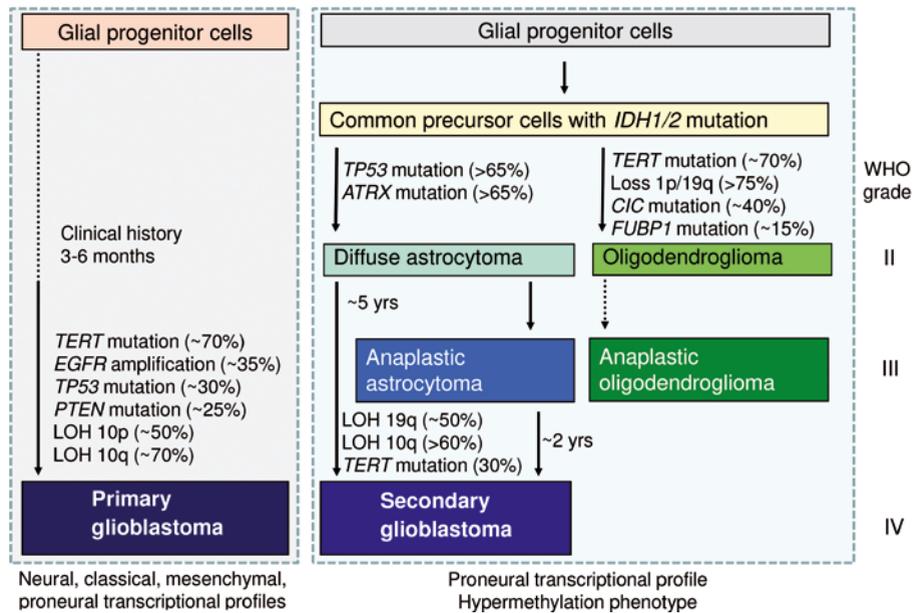
Books). A cette fin, elle collabore avec des pathologistes de renommée internationale dans le monde entier pour parvenir à un consensus concernant cette classification. Jusqu'à tout récemment, le diagnostic et la classification de la plupart des tumeurs humaines s'appuyaient presque exclusivement sur des caractéristiques histologiques. Mais de nos jours, grâce aux rapides progrès de la génétique des tumeurs humaines, on utilise de plus en plus fréquemment des marqueurs moléculaires pour définir certaines maladies.

Les principaux projets de la Section MPA au cours du biennium 2014–2015 sont détaillés ci-dessous.

ALTERATIONS DES GENES *RRAS* ET *ERCC1* AU LOCUS 19q13 DANS LES ASTROCYTOMES GEMISTOCYTIQUES

L'astrocytome gémistocytique (OMS grade II), variante rare de l'astrocytome diffus, se caractérise par la présence de gémistocytes néoplasiques et une tendance régulière à évoluer en glioblastome secondaire (OMS grade IV) et par un mauvais pronostic. En dehors de mutations fréquentes de *TP53* (> 80 %), on en sait peu sur son profil moléculaire. On a donc réalisé un séquençage d'exome sur des astrocytomes gémistocytiques qui a permis d'identifier des délétions homozygotes au locus 19q13, c'est-à-dire concernant les gènes *RRAS* et *ERCC1*. Des analyses complémentaires ont en effet mis en évidence la délétion homozygote de *RRAS* dans 7 des 42 (17 %) astrocytomes gémistocytiques et dans 3 des 24 (13 %) glioblastomes secondaires. La survie des patients souffrant d'astrocytome gémistocytique et de glioblastome secondaire, porteurs d'une délétion de *RRAS*, avait tendance à être plus courte que celle des non-porteurs. On a également détecté une délétion homozygote du gène *ERCC1* ou la méthylation de son promoteur dans 10 des 42 (24 %) astrocytomes gémistocytiques et 8 des 24 (33 %) glioblastomes secondaires. En revanche, les gliomes diffus de bas grade ou les glioblastomes primitifs (*de novo*) ne présentaient aucune délétion homozygote de *RRAS* et *ERCC1* (Ohta et coll., 2014).

Figure 1. Voies génétiques conduisant aux glioblastomes primitifs et secondaires. Noter que les glioblastomes secondaires partagent une même origine cellulaire avec les oligodendrogliomes. © CIRC.



PERTE D'EXPRESSION DE *FUBP1* DANS LES GLIOMES, PREDICTIVE D'UNE MUTATION *FUBP1* ET ASSOCIEE A LA DIFFERENCIATION OLIGODENDROGLIALE, AUX MUTATIONS *IDH1* ET A LA PERTE DES CHROMOSOMES 1p/19q

FUBP1, protéine de liaison 1 à *FUSE* (pour *far upstream element*), régule plusieurs gènes cibles tels que *MYC* et *p21*. Surexprimée dans un certain nombre de tumeurs, elle agit comme une oncoprotéine en stimulant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose. L'étude de ses profils d'expression dans les gliomes par immunohistochimie et immunofluorescence a confirmé sa surexpression dans tous les sous-types de gliomes par rapport au tissu cérébral normal. Cette surexpression était associée à une prolifération cellulaire plus importante. A contrario, la perte d'expression de *FUBP1*, prédictive d'une mutation *FUBP1* avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 90 %, est associée à la différenciation oligodendrogliale, aux mutations *IDH1* et à la perte des chromosomes 1p/19q. Par conséquent, la recherche de *FUBP1* par immunohistochimie est utile au diagnostic des gliomes (Baumgarten et coll., 2014).

CORRELATION DE L'INDEX DE MARQUAGE *OLIG2* AVEC LES CLASSIFICATIONS HISTOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES GLIOMES DIFFUS DE BAS GRADE

Le diagnostic des gliomes diffus de bas grade, reposant uniquement sur l'examen histologique, est extrêmement subjectif, compte tenu d'une forte variabilité inter-observateurs. On a utilisé des techniques d'immunohistochimie pour étudier l'expression d'*Olig2* dans les astrocytomes diffus, les oligoastrocytomes et les oligodendrogliomes de grade II de la Classification OMS. L'index moyen de marquage *Olig2* atteignait 44 % dans les astrocytomes diffus, 59 % dans les oligoastrocytomes et 76 % dans les oligodendrogliomes. Cet index était nettement plus élevé dans les gliomes présentant une perte des chromosomes 1p/19q avec ou sans mutation *IDH1/2*, que dans les gliomes porteurs d'une mutation *TP53* avec ou sans mutation *IDH1/2* ou porteurs uniquement d'une mutation *IDH1/2* (Suzuki et coll., 2014).

MUTATIONS GERMINALES DE *TP53*, *MSH4* ET *LATS1* DANS UNE FAMILLE REGROUPANT DES CAS DE TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX

Le séquençage d'exome réalisé sur les prélèvements sanguins des membres d'une famille présentant un syndrome de Li-Fraumeni, caractérisé par une

mutation germinale de *TP53* et de multiples tumeurs du système nerveux, a permis de détecter d'autres mutations germinales. Des mutations non-sens ont ainsi été détectées dans le gène de réparation de l'ADN *MSH4* (c.2480T > A ; p.I827N) chez trois des membres de cette famille atteints de gliomes. Deux autres membres ne présentant pas de mutation germinale de *TP53*, ayant cependant développé un schwannome périphérique, étaient également porteurs d'une mutation germinale de *MSH4* et d'une mutation germinale supplémentaire dans *LATS1* (c.286C > T ; p.R96W). *LATS1*, un médiateur en aval de *NF2*, n'avait encore jamais été impliqué dans le développement de schwannomes. On a donc réalisé un criblage de la séquence codante complète de *LATS1* dans des schwannomes sporadiques ; la délétion d'une seule base au codon 827 a été détectée dans un seul schwannome de la racine spinale. La perte de fonction *LATS1* par mutation pourrait donc jouer un rôle dans le développement de certains schwannomes héréditaires, mais serait exceptionnelle dans les cas de schwannome sporadique. Concernant *MSH4*, c'est la première fois qu'une étude rapporte une mutation germinale dans ce gène. Dans la mesure où tous les patients étaient porteurs de cette mutation, il est possible qu'elle ait contribué à l'acquisition ultérieure des mutations germinales de *TP53* et *LATS1* (Kim et coll., 2014a).

ALTERATIONS DE LA VOIE NF2/LATS1/LATS2/YAP DANS LES SCHWANNOMES

Le schwannome est une tumeur bénigne des gaines nerveuses, constituée de cellules de Schwann bien différenciées. En dehors de fréquentes mutations *NF2* (50–60 %), on ne connaît pas très bien les bases moléculaires des schwannomes. *LATS1* et *LATS2*, deux molécules en aval de *NF2*, sont des régulateurs négatifs de l'oncogène *YAP* qui intervient dans la voie de signalisation Hippo. La Section MPA a étudié les mutations des gènes *NF2*, *LATS1* et *LATS2*, la méthylation des promoteurs de *LATS1* et *LATS2*, ainsi que l'expression de *YAP*, sous sa forme phosphorylée (*YAPp*) et non phosphorylée, dans 82 schwannomes sporadiques. Le séquençage ciblé à l'aide du système Ion Torrent Proton a permis de détecter des mutations *NF2* dans 45 des

82 schwannomes (55 %), des mutations *LATS1* dans 2 d'entre eux (2 %) et des mutations *LATS2* dans un seul (1 %). L'amplification en chaîne par polymérase (PCR pour *polymerase chain reaction*) a montré une méthylation du promoteur de *LATS1* et *LATS2* dans 14 cas (17 %) et 25 cas (30 %) respectivement. Dans l'ensemble, 62 cas (76 %) comportaient au moins une altération dans les gènes *NF2*, *LATS1* et/ou *LATS2*. L'immunohistochimie a mis en évidence l'expression nucléaire de *YAP* dans 18 cas sur 42 schwannomes analysés (soit 43 %) et une expression cytoplasmique réduite de *YAPp* dans 15 cas sur 49 schwannomes analysés (soit 31 %), tous portant au moins une altération dans les gènes *NF2*, *LATS1* et/ou *LATS2*. D'après ces résultats, une voie de signalisation Hippo anormale pourrait participer à la pathogenèse de la plupart des schwannomes sporadiques (Oh et coll., 2015).

RÔLE DES MICROARN DANS LA PATHOGENESE ET L'ÉVOLUTION DES MEDULLOBLASTOMES

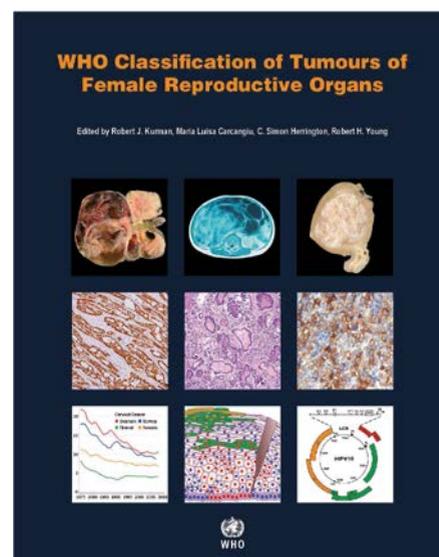
Le médulloblastome est la tumeur maligne du système nerveux central la plus fréquente chez l'enfant. Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants qui interagissent avec leurs ARN cibles, codants ou non codants, et interviennent dans différents processus cellulaires en régulant de nombreuses cibles.

La Section MPA étudie l'expression de miR-22 et ses effets sur la prolifération cellulaire et l'apoptose dans les médulloblastomes. La RT-PCR quantitative (transcription inverse suivie d'une PCR : RT-PCR pour *reverse transcription polymerase chain reaction*) révèle une nette diminution d'expression de miR-22 dans 19 des 27 (70 %) médulloblastomes et 3 lignées cellulaires de médulloblastome, par rapport au niveau d'expression observé dans les tissus cérébraux normaux. L'expression forcée de miR-22 dans les lignées cellulaires de médulloblastome DAOY et ONS-76 par transfection lentivirale diminue la prolifération cellulaire et induit l'apoptose, tandis que sa répression augmente l'activité prolifératrice. L'analyse par microarray (puces à ADN) du transcriptome de cellules DAOY transfectées (expression forcée de miR-

22) a révélé d'importantes modifications des profils d'expression génique ; *PAPST1* étant le gène le plus réprimé (10 fois). La RT-PCR quantitative a montré une activation de l'ARNm de *PAPST1* dans 18 des 27 médulloblastomes (soit 67 %). Par ailleurs, les résultats d'un test du gène rapporteur luciférase suggèrent une interaction directe de miR-22 avec le gène *PAPST1*. Enfin, la répression de *PAPST1* dans les cellules de médulloblastome DAOY et ONS-76 transfectées par lentivirus supprime la prolifération cellulaire. D'après ces résultats, la répression fréquente de l'expression de miR-22 serait associée à la prolifération cellulaire observée dans les médulloblastomes, en partie peut-être par l'intermédiaire de *PAPST1*, nouveau gène cible de miR-22 (Xu et coll., 2014).

L'expression de miR-9, régulateur clé du développement neuronal, est aberrante dans les tumeurs cérébrales. La Section MPA a montré que cette expression est souvent réprimée dans les médulloblastomes, et que c'est en partie dû à la méthylation du promoteur. Il existe une nette corrélation entre une faible expression de miR-9 et le diagnostic de variants histopathologiques défavorables, ainsi qu'un mauvais pronostic. Par ailleurs, *HES1* a été identifiée comme cible directe de miR-9 dans le médulloblastome. Il a également été démontré que la restauration de miR-9 déclenche l'arrêt du cycle cellulaire,

Figure 2. Couverture de la Classification OMS *Tumours of Female Reproductive Organs*, quatrième édition.



inhibe la croissance des cellules clonales et promeut la différenciation cellulaire. La ré-expression de miR-9 pourrait constituer une nouvelle stratégie de régulation épigénétique contre les médulloblastomes (Fiaschetti et coll., 2014).

CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS (WHO BLUE BOOKS)

L'objectif de ce projet consiste à établir un système de classification histopathologique, moléculaire et de stadification des tumeurs humaines, qui soit accepté et utilisé dans le monde entier. Il est difficile de mener des études épidémiologiques et des essais cliniques en l'absence de critères diagnostiques histopathologiques et cliniques clairement définis, et plus récemment, en l'absence de profils d'expression et de profils génétiques. Par conséquent, ce projet est d'un grand intérêt, non seulement pour la communauté des pathologistes, mais aussi pour l'enregistrement des cancers, les études épidémiologiques, les essais cliniques et la recherche sur le cancer en général.

Le CIRC est chargé de ce projet depuis la troisième édition (2000–2005 ; 10 volumes). La préparation en cours de la quatrième édition a débuté en 2006, avec quatre nouveaux éditeurs (Dr Fred Bosman, Université de Lausanne, Suisse ; Dr Elaine Jaffe, *National Institutes of Health*, Bethesda, Etats-Unis ; Dr Sunil Lakhani, *University of Queensland*, Brisbane, Australie ; et Dr Hiroko Ohgaki, CIRC). A ce jour, sept volumes ont été publiés, avec entre 20 000 et 50 000 exemplaires de chaque imprimés et diffusés dans le monde.

Au cours de ce biennium 2014–2015, le sixième volume (*Tumours of Female Reproductive Organs*) et le septième (*Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*) ont été publiés. Le huitième volume (*Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*), le neuvième (*Head and Neck Tumours*) et le dixième (*Tumours of Endocrine Organs*) sont en préparation. Enfin, des mises à jour du premier et du deuxième volumes de la quatrième édition, *Tumours of the Central Nervous System* et *Tumours of Haematopoietic et Lymphoid Tissues*, sont en cours.

Figure 3. Membres du Groupe de travail lors de la Réunion éditoriale et de consensus de la Classification OMS *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. La réunion a eu lieu au CIRC du 24 au 26 avril 2014. © CIRC/Roland Dray.



Le sixième volume, *Tumours of Female Reproductive Organs*, a été publié en avril 2014, avec quatre éditeurs (Dr Robert J. Kurman, *Johns Hopkins University*, Baltimore, Etats-Unis ; Dr Maria Luisa Carcangiu, *Fondazione IRCCS, Institute Nazionale dei Tumori*, Milan, Italie ; Dr Simon Herrington, *Centre for Oncology and Molecular Medicine, Ninewells Hospital et Medical School*, Dundee, Royaume-Uni ; et Dr Robert H. Young, *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School*, Boston, Etats-Unis) ; 92 auteurs originaires de 18 pays ont participé à sa préparation.

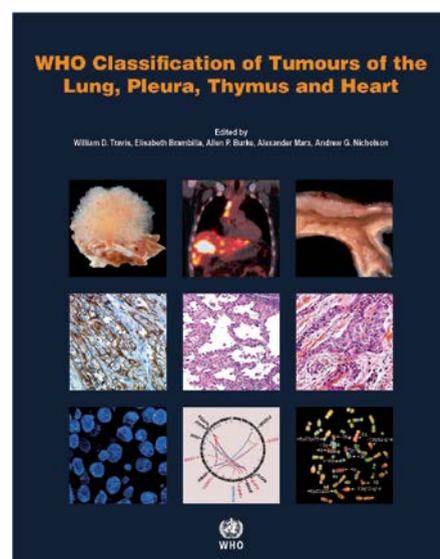
Le septième volume, *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, a été publié en mars 2015, avec cinq éditeurs (Dr William D. Travis, *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, New York, Etats-Unis ; Dr Elisabeth Brambilla, *Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble*, France ; Dr Allen Burke, *University of Maryland*, Baltimore, Etats-Unis ; Dr Alexander Marx, *University Medical Centre Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim*, Allemagne ; et Dr Andrew Nicholson, *Royal Brompton Hospital*, Londres, Royaume-Uni) ; 157 auteurs originaires de 29 pays ont participé à sa préparation.

Le huitième volume, *Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, est en cours de préparation avec quatre éditeurs (Dr Holger Moch, *University Hospital Zurich*, Zurich, Suisse ; Dr Peter Humphrey, *Yale University School of Medicine*, New Haven, Etats-Unis ;

Dr Thomas Ulbright, *IU Health Pathology Laboratory*, Indianapolis, Etats-Unis ; et Dr Victor Reuter, *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, New York, Etats-Unis) et 103 auteurs originaires de 19 pays. La réunion éditoriale et de consensus a eu lieu en collaboration avec l'Université de Zurich du 11 au 13 mars 2015, et la publication de l'ouvrage est programmée début 2016.

Le neuvième volume, *Head and Neck Tumours*, est en préparation avec cinq éditeurs (Dr Adel K. El-Naggar, *MD Anderson Cancer Center*, Houston, Etats-Unis ; Dr John K.C. Chan, *Queen Elizabeth Hospital*, Région

Figure 4. Couverture de la Classification OMS *Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, quatrième édition.



administrative spéciale de Hong Kong, Chine ; Dr Jennifer R. Grandis, *Clinical and Translational Science Institute, UCSF School of Medicine*, San Francisco, Etats-Unis ; Dr Takashi Takata, *Hiroshima University*, Hiroshima, Japon ; et Dr Pieter J. Slootweg, *Radboud University Nijmegen Medical Centre*, Nimègue, Pays-Bas). La réunion éditoriale et de consensus aura lieu en janvier 2016.

La Section MPA remercie les personnes suivantes pour leur collaboration :

H. Stein, Berlin, Jürgen Thiele, Cologne, G. Reifenberger, Düsseldorf, U. Sure, Essen, M. Mittelbronn, Francfort, A. von Deimling, O.D. Wiestler, Heidelberg, R. Siebert, Kiel, A. Marx, Mannheim, G. Kloppel, Munich, W. Paulus, Münster, Allemagne ; S.R. Lakhani, Brisbane, K. McDonald, Sydney, Australie ; S.Q. Lv, Chongqing, J.K.C. Chan, Région administrative spéciale de Hong Kong, Chine ; E. Campo, Barcelone, Espagne ; A. Burke, R. Kurman, Baltimore, E.S. Jaffe, Bethesda, R.P. Hasserjian, N.L. Harris, D.N. Louis, R. Young, Boston, M.M. Le Beau, Chicago, A.K. El-Naggar, Houston, T.M. Ulbright, Indianapolis, D.W. Ellison, Memphis, P.A. Humphrey, New Haven, A. Orazi, V.E. Reuter, W.D. Travis, New York, J.R. Grandis, S.H. Swerdlow, Pittsburgh, W.K. Cavenee, San Diego, A. Perry, San Francisco, D.A. Arber, Stanford, Etats-Unis ; A. Vital, Bordeaux, E. Brambilla, Grenoble, J. Lachuer, Lyon, D. Figarella-Branger, Marseille, France ; S.A. Pileri, Bologne, F. Giangaspero, Rome, Italie ; Y. Nakazato, Gunma, T. Takata, Hiroshima, H. Yokoo, Maebashi, Japon ; P.J. Slootweg, Nimègue, Pays-Bas ; S. Herrington, Dundee, A. Nicholson, Londres, Royaume-Uni ; F. Bosman, Lausanne, M.A. Grotzer, P. Kleihues, H. Moch, T. Shalaby, M. Weller, Zurich, Suisse.

La Section MPA remercie les organismes suivants pour leur contribution financière :

Fondation Charles Rodolphe Brupbacher, Suisse
Krebsliga Zürich, Suisse
Fondation MEDIC, Suisse