

SECTION PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE (MPA)

Chef

Dr Hiroko Ohgaki

Secrétaire

Anne-Sophie Hameau

Editeur technique

Dr Heidi Mattock

Base de données

Sébastien Antoni
(jusqu'en juin 2011)
Alberto Machado

Assistants techniques

Anne Marie Camus
(jusqu'en janvier 2011)
Christine Carreira

Chercheurs invités et boursiers

Dr Sumihito Nobusawa
(jusqu'en juin 2010)
Dr Young Ho Kim
Dr Robert Stawski
(jusqu'en février 2011)
Dr Masaya Nagaiishi
(jusqu'en septembre 2011)
Dr Daniela Pierscianek
Dr Naosuke Nonoguchi
Dr Kasuya Motomura

LA SECTION PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE (MPA) ÉTUDIE LES BASES MOLÉCULAIRES DES NÉOPLASMES CHEZ L'HOMME, EN PARTICULIER DES TUMEURS DU CERVEAU, EN UTILISANT DES ÉCHANTILLONS DE TUMEUR PRÉLEVÉS CHEZ DES PATIENTS POUR LESQUELS ON DISPOSE DE DONNÉES CLINIQUES ET D'UN SUIVI EXCELLENTS. NOUS CORRÉLONS DES PHÉNOTYPES HISTOLOGIQUEMENT RECONNUS AVEC DES GÉNOTYPES ET DES PROFILS D'EXPRESSION POUR : ÉLUCIDER LES BASES MOLÉCULAIRES ET LES VOIES GÉNÉTIQUES QUI INTERVIENNENT DANS LA FORMATION DE TUMEURS CHEZ L'HOMME ; IDENTIFIER DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES AFIN D'AMÉLIORER LE DIAGNOSTIC ET LA CLASSIFICATION DES TUMEURS ; IDENTIFIER LES FACTEURS GÉNÉTIQUES PRÉDICTIONNELS DE LA SENSIBILITÉ AU TRAITEMENT, DE LA PROGRESSION TUMORALE ET DE L'ISSUE DE LA MALADIE ; ET IDENTIFIER L'ÉTIOLOGIE DES CANCERS HUMAINS À L'AIDE DES DONNÉES GÉNÉTIQUES. DEPUIS 2006, LA SECTION MPA ASSURE ÉGALEMENT LA PRÉPARATION DE LA 4^{ÈME} ÉDITION DE LA SÉRIE CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS (*WHO BLUE BOOKS*). LE TROISIÈME VOLUME (CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS DE L'APPAREIL DIGESTIF) A ÉTÉ PUBLIÉ EN 2010 ; LE QUATRIÈME (CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS DU SEIN) ET LE CINQUIÈME (CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS DES TISSUS MOUS ET DES OS) SONT EN COURS D'ÉDITION.

Quelques-uns des projets les plus importants de la Section MPA, pendant ce biennium, sont détaillés ci-dessous.

PROFILS INTRA-TUMORAUX DES DÉSÉQUILIBRES GÉNOMIQUES DANS LES GLIOBLASTOMES

Les glioblastomes sont morphologiquement et génétiquement hétérogènes, mais on sait très peu de choses concernant les profils régionaux des déséquilibres génomiques présents dans ces tumeurs. À l'aide d'une méthode fiable d'amplification du génome entier (WGA), récemment mise au point dans notre laboratoire pour amplifier de façon aléatoire et avec un minimum d'artéfacts l'ADN extrait de coupes de tissus incluses en paraffine, nous avons examiné le déséquilibre chromosomique par hybridation génomique comparative

(Agilent 105K) dans l'ADN entier de 2 à 5 régions tumorales distinctes de 14 glioblastomes primitifs (soit un total de 41 régions tumorales). Les déséquilibres chromosomiques étaient très différents selon les glioblastomes. La perte du chromosome 10q, un gain sur 7p et la perte de 10p ont été les seules altérations observées dans 6 cas et plus. Les altérations génétiques communes à l'ensemble des régions analysées dans une seule tumeur correspondaient à des gains sur 1q32.1 (*PIK3C2B*, *MDM4*), 4q11-q12 (*KIT*, *PDGFRA*), 7p12.1-11.2 (*EGFR*), 12q13.3-12q14.1 (*GLI1*, *CDK4*) et 12q15 (*MDM2*), et des pertes sur 9p21.1-24.3 (*p16^{INK4a}/p14^{ARF}*), 10p15.3-q26.3 (*PTEN*, etc) et 13q12.11-q34 (*SPRY2*, *RB1*). Ces altérations jouent très probablement un rôle causal dans la pathogenèse des glioblastomes (mutations conductrices).

Par ailleurs, nous avons noté plusieurs déséquilibres génomiques spécifiques d'une région tumorale qui pourraient être fonctionnels ou non (mutations passagères), mais qui constituent des événements secondaires reflétant une instabilité génomique progressive, caractéristique des glioblastomes.

VOIES GÉNÉTIQUES INTERVENANT DANS LA PATHOGENÈSE DES GLIOMES DIFFUS

Les gliomes diffus de bas grade, grade II de la Classification OMS (astrocytome diffus, oligoastrocytome, oligodendrogliome), se caractérisent par une fréquence élevée de mutations *IDH1/2* (plus de 80 %) qui apparaissent à un stade très précoce. Par ailleurs, la majorité des astrocytomes diffus (environ 60 %) portent des mutations *TP53*, qui constituent un marqueur pronostique de survie plus courte. A l'inverse, dans les oligodendrogliomes, on constate fréquemment la perte de 1p/19q (environ 70 % des cas), associée à une survie plus longue. Les mutations *IDH1/2* sont fréquentes (> 80 %) dans les glioblastomes secondaires qui se sont développés à partir d'astrocytomes de bas grade ou anaplastiques. En revanche, elles sont très rares dans les glioblastomes primaires (de novo) (< 5%), qui présentent une répartition selon l'âge et un profil génétique identiques à ceux des glioblastomes secondaires et sont donc probablement mal classés. Si l'on se fie aux mutations *IDH1/2* comme critère de diagnostic, les glioblastomes secondaires comptent pour 10 % environ de tous les glioblastomes. Les mutations *IDH1/2* constituent le plus important facteur prédictif d'une issue favorable de la maladie chez les patients souffrant d'un glioblastome. Leur fréquence élevée dans les oligodendrogliomes, les astrocytomes et dans les glioblastomes secondaires qui en dérivent, suggèrent que ces tumeurs puissent avoir en commun une même population de cellules progénitrices. En revanche, l'absence de ce marqueur moléculaire dans les glioblastomes primaires suggère une origine cellulaire différente. Par conséquent, si les deux sous-types de glioblastome ont un phénotype histologique identique, c'est à cause d'altérations génétiques courantes, notamment la perte des gènes suppresseurs de tumeur sur le chromosome 10q.

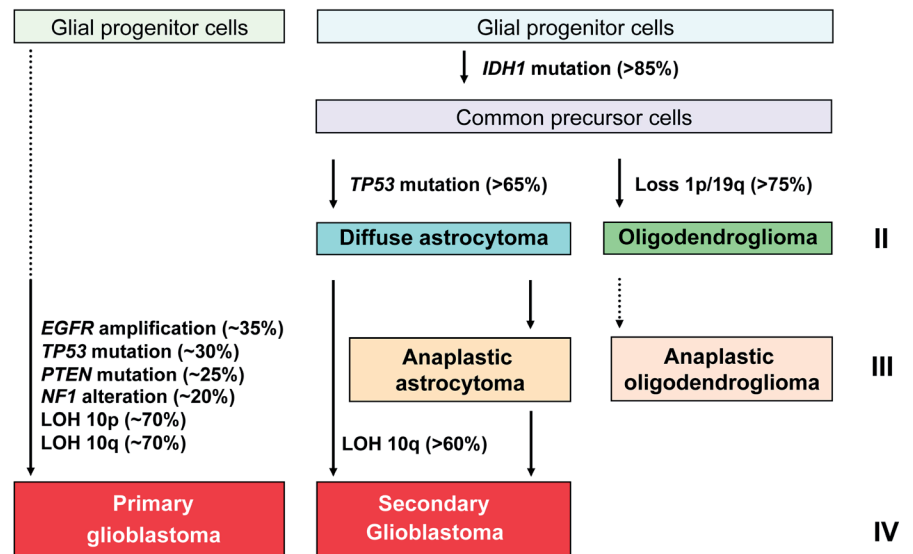


Figure 1. Voies génétiques intervenant dans la pathogenèse des gliomes

Les critères diagnostiques des gliomes diffus de bas grade sont hautement subjectifs, surtout en ce qui concerne les oligoastrocytomes. Afin d'établir les profils génétiques des gliomes diffus et estimer leur impact prédictif, nous avons analysé 360 gliomes de grade II (classification OMS) pour y dépister des mutations dans les gènes *IDH1*, *IDH2* et *TP53*, ainsi que la perte de 1p/19q. Nous avons ensuite corrélé ces résultats avec l'issue clinique de la maladie. La plupart des tumeurs (86 %) étaient génétiquement caractérisées par les mutations de *TP53* et *IDH1/2* (32 %), la perte de 1p/19q et la mutation de *IDH1/2* (37 %), ou la mutation *IDH1/2* seulement (17 %). Les tumeurs portant seulement des mutations de *TP53* ou une délétion de 1p/19q étaient rares (2 % et 3 %). La survie des patients porteurs d'une mutation de *TP53*, accompagnée ou non d'une mutation *IDH1/2*, était nettement plus courte que celle des patients porteurs d'une délétion 1p/19q accompagnée ou non d'une mutation de *IDH1/2*, à la fois dans les analyses univariées et multivariées. Par conséquent, la classification moléculaire s'appuyant sur les mutations *IDH1/2*, *TP53* et la perte de 1p/19q, est aussi efficace que la classification histologique et évite les ambiguïtés inhérentes au diagnostic de l'oligoastrocytome.

ALTÉRATIONS DE LA VOIE RB1 DANS LES GLIOMES DIFFUS DE BAS GRADE NE PRÉSENTANT AUCUNE DES ALTÉRATIONS GÉNÉTIQUES COURANTES

La plupart des gliomes diffus de bas grade (> 90 %) portent au moins une des altérations génétiques suivantes : mutation *IDH1/2*, mutation *TP53* ou perte de 1p/19q. Seulement 7 % des cas ne présentent aucune de ces trois altérations (triple négatif). Nous avons utilisé l'hybridation génomique comparative pour étudier 15 gliomes de grade II, triple négatifs (8 astrocytomes diffus et 7 oligodendrogliomes). Nous avons détecté une perte de 9p21 (loci *p14^{ARF}*, *p15^{INK4b}* et *p16^{INK4a}*) dans 3 cas et une perte de 13q14-13q32 (contenant le locus *RB1*) dans 2 cas. Des analyses supplémentaires réalisées sur 31 cas triple-négatifs, ainsi que sur un total de 160 cas qui n'étaient pas triple-négatifs, ont montré que les altérations dans la voie RB1 (délétion homozygote et méthylation du promoteur des gènes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* et *RB1*) étaient nettement plus fréquentes chez les triple-négatifs (26 %) que chez ceux ne l'étant pas (11 % ; P = 0,0371). Selon ces résultats, une fraction des gliomes diffus de bas grade, ne portant pas d'altérations génétiques courantes, pourrait se développer par le biais d'une voie génétique différente, impliquant peut-être la perte de contrôle du cycle cellulaire régulé par la voie RB1.

MÉTHYLATION DU PROMOTEUR DE *TET2* DANS LES GLIOMES DIFFUS DE BAS GRADE NE PORTANT PAS DE MUTATIONS *IDH1/2*

Le gène *TET2* code pour l'enzyme α-KG-dépendante qui catalyse la conversion de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine, entraînant ainsi une déméthylation de l'ADN. Des mutations du gène *TET2* ont été détectées dans 10 à 25 % des leucémies myéloïdes chroniques ne portant pas de mutations *IDH1/2*. La plupart des gliomes diffus de bas grade portent des mutations *IDH1/2* (> 85 %), mais pour ceux qui n'en portent pas, les mécanismes moléculaires de la pathogenèse restent à élucider. Nous avons donc recherché la présence de mutations et de méthylation du promoteur de *TET2*, dans 29 gliomes diffus de bas grade, ne portant pas de mutations *IDH1/2*. L'étude du polymorphisme conformationnel simple brin, suivie d'un séquençage direct, a montré l'absence de mutations dans le gène *TET2*. En revanche, l'étude de la méthylation par PCR a révélé une méthylation du promoteur de *TET2* dans 5 des 35 cas (14 %). Au contraire, aucun des 38 cas de gliomes diffus de bas grade, porteurs de mutations *IDH1/2*, ne présentaient de méthylation du promoteur de *TET2*. D'après ces résultats, c'est la méthylation du promoteur de *TET2*, et non la mutation de ce gène, qui pourrait constituer un mécanisme alternatif de pathogenèse dans une petite fraction des gliomes diffus de bas grade ne portant pas de mutations *IDH1/2*.

ALTÉRATIONS GÉNÉTIQUES DANS LES MICROARN DES MÉDULLOBLASTOMES

Les microARN (miARN) contrôlent toute une variété de processus cellulaires via la régulation de nombreux gènes cibles. Nous avons analysé 48 médulloblastomes pour y dépister les mutations, délétions et amplifications dans 9 gènes de miARN, sélectionnés en raison de la présence de séquences cibles potentielles dans la région 3' non traduite de l'ARNm de *MYCC*. La PCR différentielle a mis en évidence des délétions dans les gènes miR-186 (15 %), miR-135a-1 (33 %), miR-548d-1 (42 %), miR-548d-2 (21 %) et miR-512-2 (33 %) ; tandis qu'une délétion ou une amplification était détectée dans les gènes miR-135b (23 %) et miR-135a-2 (15 %). Dans 10 %

des médulloblastomes, miR-33b portait une délétion, une amplification ou une mutation sur le miARNm précurseur. Dans l'ensemble, 35 des 48 (73 %) médulloblastomes portaient au moins une altération. La PCR en temps réel a révélé une surexpression de *MYCC* dans 11 des 37 (30 %) médulloblastomes. Cette surexpression était corrélée avec la délétion de miR-512-2 (P = 0,0084). Une réduction de l'expression de miR-512-5p par ARN anti-sens (séquence mature de miR-512-2) entraînait une nette régulation positive de l'expression de *MYCC* dans des cellules HeLa et A549. En revanche, la surexpression forcée de miR-512-2 dans des lignées cellulaires DAOY de médulloblastome/PNET, UW-228-2 et PFSK, se traduisait par une régulation négative de la protéine *MYCC*. Par ailleurs, les résultats des

luciférases reporter-tests indiquent que miR-512-2 cible le gène *MYCC*. D'après toutes ces observations, les altérations dans les gènes des miARN pourraient constituer un mécanisme alternatif entraînant une surexpression de *MYCC* dans les médulloblastomes.

CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS (WHO BLUE BOOKS)

L'objectif de ce projet consiste à établir un système de classification pathologique, génétique et de stadification des tumeurs chez l'homme, qui soit accepté et utilisé partout dans le monde. 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,

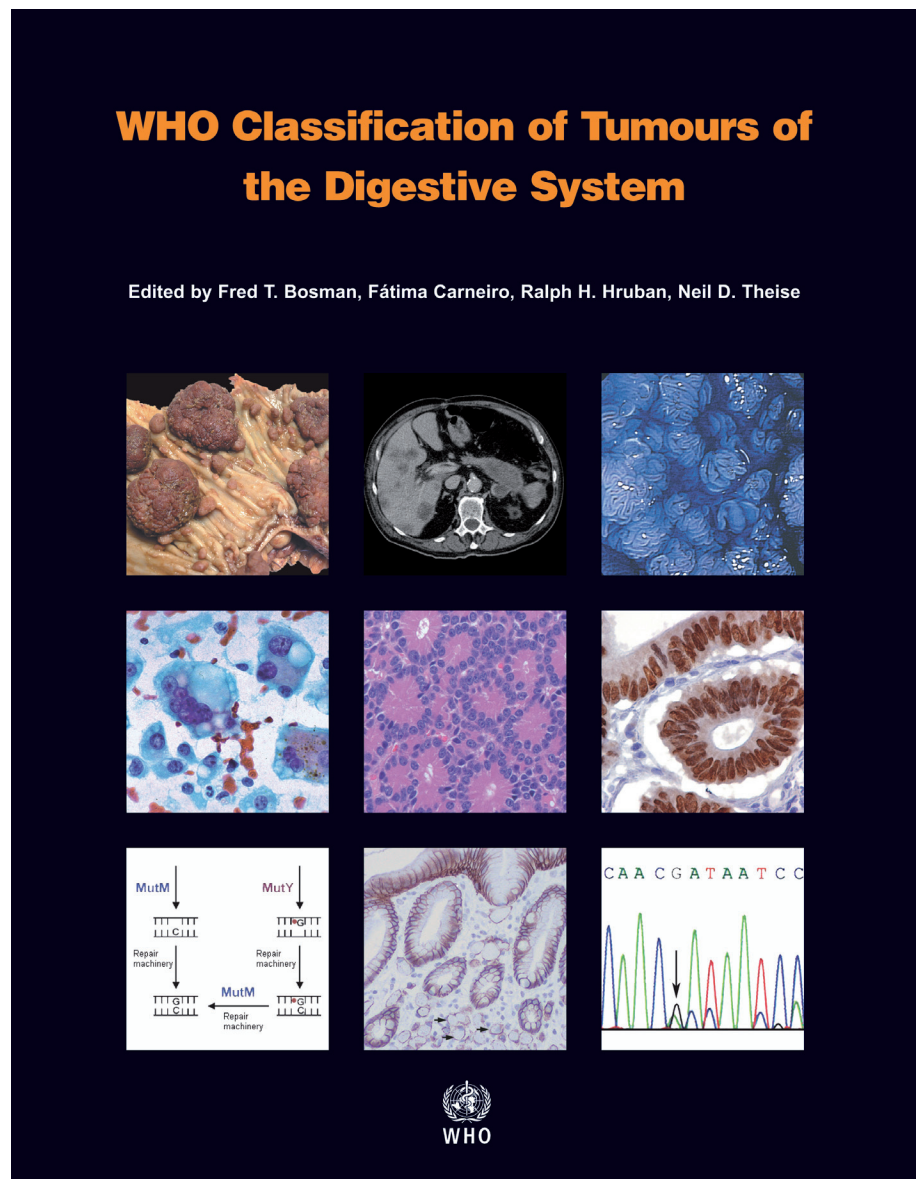


Figure 2. Couverture du livre WHO Classification of Tumours of the Digestive System

en l'absence de profils d'expression et de profils génétiques. Par conséquent, ce projet de classification des tumeurs présente un intérêt considérable, pas seulement pour la communauté des pathologistes, mais aussi pour les registres du cancer, les études épidémiologiques, les essais cliniques et la recherche sur le cancer en général.

Le CIRC est chargé des WHO Blue Books depuis la 3^{ème} édition de cette série (2000–2005), qui couvrait toutes les localisations en 10 volumes et décrivait, de façon strictement orientée sur la maladie, les critères diagnostiques, les caractéristiques pathologiques et les altérations génétiques associées. Chaque volume a été imprimé entre 10 000 et 35 000 exemplaires distribués dans le monde entier.

La préparation de l'édition en cours (4^{ème} édition) a débuté en 2006, avec quatre nouvelles séries d'éditeurs (Dr Fred Bosman, Université de

Lausanne, Suisse ; Dr Elaine Jaffe, National Institutes of Health, Bethesda, USA ; Dr Sunil Lakhani, University of Queensland, Brisbane, Australie ; et Dr Hiroko Ohgaki, CIRC). Le premier volume de cette 4^{ème} édition, *Tumours of the Nervous System*, a été publié en juin 2007. Le second volume, *Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, a été publié en septembre 2008, et plus de 35 000 exemplaires ont déjà été imprimés et distribués dans le monde. Le troisième volume, *Tumours of the Digestive System*, avec quatre éditeurs (Dr F. Bosman, Lausanne, Suisse ; Dr F. Carneiro, Porto, Portugal ; Dr R.H. Hruban, Baltimore, USA ; et Dr N.D. Theise, New York, USA) a été publié en 2010, et plus de 8000 exemplaires ont été distribués. Le quatrième volume, *Tumours of the Breast*, est en préparation avec cinq éditeurs (Dr Sunil R. Lakhani, University of Queensland, Brisbane, Australie ; Dr Ian Ellis, University of Nottingham, Royaume-Uni ; Dr Stuart Schnitt, Beth Israel Deaconess Medical

Center, Boston, USA ; Dr Puay Hoon Tan, Singapore General Hospital, Singapour ; et Dr Marc J. van de Vijver, Academic Medical Center, Amsterdam, Pays-Bas). Une réunion éditoriale et de consensus a eu lieu au CIRC, en septembre 2011, et la publication de l'ouvrage est programmée pour l'été 2012. La préparation du cinquième volume, *Tumours of Soft Tissue and Bone*, a débuté avec quatre éditeurs (Dr Christopher D. Fletcher, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA ; Dr Pancras C.W. Hogendoorn, Leiden University Medical Center, Leyde, Pays-Bas ; Dr Julia A. Bridge, University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA ; et Dr Fredrik Mertens, Lund University, Suède). La réunion éditoriale et de consensus est programmée en avril 2012.

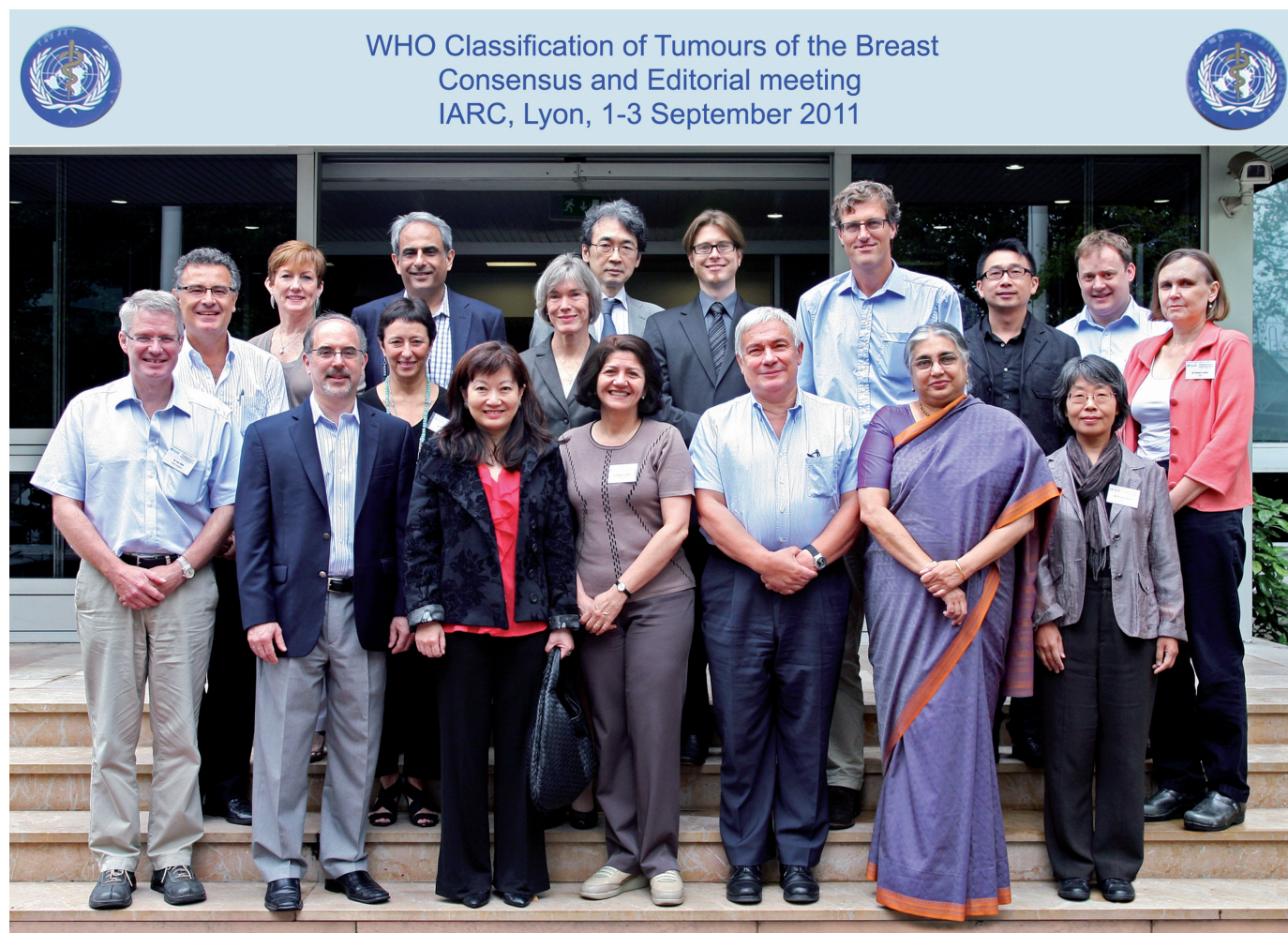


Figure 3. Photo du Groupe de travail de la réunion éditoriale et de consensus du quatrième volume de la Classification OMS, *Tumours of the Breast*

La Section MPA remercie les chercheurs suivants pour leur collaboration :

Dr T. Pietsch, Bonn, Dr U. Sure, Essen, Dr M. Mittelbronn, Francfort, Dr B. Radlwimmer, Dr P. Lichter, Heidelberg, Dr W. Paulus, Münster, Allemagne ; Dr S. R. Lakhani, Brisbane, Australie ; Dr A. Vital, Bordeaux, Dr J. Lachuer, Bron, France ; Dr F. Giangaspero, Rome, Italie ; Dr Y. Nakazato, Gunma, Japon ; Dr M.J. van de Vijver, Amsterdam, Dr P.C.W. Hogendoorn, Leyde, Pays-Bas ; Dr F. Carneiro, Porto, Portugal ; Dr P.H Tan, Singapour ; Dr F. Mertens, Lund, Suède ; Dr L. Mariani, Basle, Dr F. Bosman, Lausanne, Dr M.A. Grotzer, Dr P. Kleihues, Dr T. Shalaby, Dr M. Weller, Zurich, Suisse ; Dr I. Ellis, Nottingham, Royaume-Uni ; Dr R.H. Hruban, Baltimore, Dr E.S. Jaffe, Bethesda, Dr Ch.D. Fletcher, Dr S. Schnitt, Boston, Dr J.A. Bridge, Omaha, Dr N.D. Theise, New York, USA.

La Section MPA exprime sa gratitude aux organismes suivants pour leur contribution financière :

MEDIC Foundation

PUBLICATIONS

Antonelli M, Buttarelli F, Arcella A *et coll.* (2010). Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 99:209–215. doi:10.1007/s11060-010-0129-5 PMID:20174854

Fiaschetti G, Castelletti D, Zoller S *et coll.* (2011). Bone morphogenetic protein-7 is a MYC target with prosurvival functions in childhood medulloblastoma. *Oncogene*, 30:2823–2835. doi:10.1038/onc.2011.10 PMID:21317922

Grunder E, D'Ambrosio R, Fiaschetti G *et coll.* (2011). MicroRNA-21 suppression impedes medulloblastoma cell migration. *Eur J Cancer*, 47:2479–2490. doi:10.1016/j.ejca.2011.06.041 PMID:21775132

Kim YH, Lachuer J, Mittelbronn M *et coll.* (2011). Alterations in the RB1 pathway in low-grade diffuse gliomas lacking common genetic alterations. *Brain Pathol*, 21:645–651. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00492.x PMID:21470325

Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M *et coll.* (2010). Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol*, 177:2708–2714. doi:10.2353/ajpath.2010.100680 PMID:21075857

Kim YH, Pierscianek D, Mittelbronn M *et coll.* (2011). TET2 promoter methylation in low-grade diffuse gliomas lacking IDH1/2 mutations. *J Clin Pathol*, 64:850–852. doi:10.1136/jclinpath-2011-200133 PMID:21690245

Lv S-Q, Kim YH, Giulio F *et coll.* (2011). Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas. *Brain Pathol*. Sous presse. PMID:21793975

Nobusawa S, Lachuer J, Wierinckx A *et coll.* (2010). Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol*, 20:936–944. PMID:20406234

Nobusawa S, Stawski R, Kim YH *et coll.* (2011). Amplification of the PDGFRA, KIT and KDR genes in glioblastoma: a population-based study. *Neuropathology*, 31:583–588. doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01204.x PMID:21382095

Ohgaki H, Kim YH, Steinbach JP (2010). Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes. *Curr Opin Neurol*, 23:583–591. doi:10.1097/WCO.0b013e3283405b5f PMID:21042217

Ohgaki H, Kleihues P (2011). Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*, 28:177–183. doi:10.1007/s10014-011-0029-1 PMID:21442241

Toedt G, Barbus S, Wolter M *et coll.* (2011). Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status. *Int J Cancer*, 128:1095–1103. doi:10.1002/ijc.25448 PMID:20473936