



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



DU TISSU SAIN AU TISSU PATHOLOGIQUE

TUMEURS DES TISSUS CONJONCTIFS

Eric Frouin, MD PhD

1.Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU de Nîmes

2.Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (U1194)

Liens d'intérêts

- MSD, Roche

Plan du cours

- **Caractéristiques et classification des tumeurs des tissus conjonctifs**
- **Biologie moléculaire des tumeurs appliquées aux tumeurs des tissus conjonctifs**
- **Techniques d'analyse des anomalies moléculaires - FISH**
- **Exemples pratiques de diagnostic de tumeurs des tissus conjonctifs**



Caractéristiques et classification des tumeurs des tissus conjonctifs

Nomenclature

- Dépend :
 - Du tissu d'origine
 - Du caractère bénin ou malin de la tumeur
- Principes :
 - Racine = cellule ou tissu d'origine
 - Suffixe = caractère bénin ou malin

Nomenclature de quelques tumeurs conjonctives

Cellule ou tissu d'origine	Tumeur bénigne	Tumeur maligne
Fibroblastes		
Cellules musculaires lisses		
Cellules musculaires striées		
Adipocytes		
Cellules endothéliales		
Cellules cartilagineuses		
Cellules osseuses		

Nomenclature de quelques tumeurs conjonctives

Cellule ou tissu d'origine	Tumeur bénigne	Tumeur maligne
Fibroblastes	Fibrome	Fibrosarcome
Cellules musculaires lisses	Léiomyome	Léiomyosarcome
Cellules musculaires striées	Rhabdomyome	Rabdomyosarcome
Adipocytes	Lipome	Liposarcome
Cellules endothéliales	Angiome	Angiosarcome
Cellules cartilagineuses	Chondrome	Chondrosarcome
Cellules osseuses	Ostéome	Ostéosarcome

Questions

- Quel est le mode de dissémination métastatique préférentiel des sarcomes?
- Comment appelle-t-on un tableau clinique association de nombreux chondromes?

Tumeurs conjonctives

- Sarcomes : rares, 1 % des cancers.
- Taux de renouvellement plus faible des tissus conjonctifs
- Facteurs de risque :
 - Syndromes de prédisposition génétique (rares) :
 - Li Fraumeni (TP53) : rhabdomyosarcome, ostéosarcome
 - Neurofibromatose (NF1) : tumeurs nerveuses malignes.
 - Agents environnementaux.
- **Surtout des tumeurs bénignes** : superficielles, sus aponévrotiques, des membres.
- Evolution sarcomes : parfois rapide avec extension locale et métastases précoces **par voie hématogène**

Classification des tumeurs conjonctives

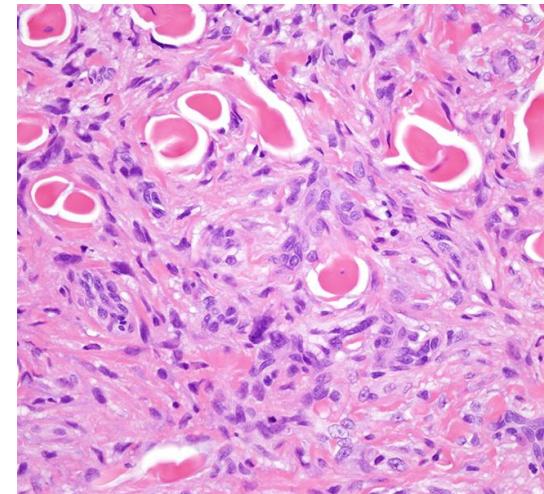
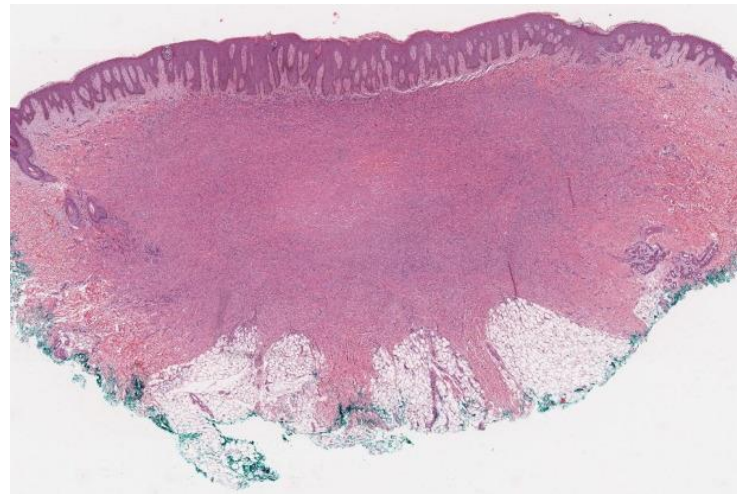
- **Trois niveaux d'agressivité :**
 - **Tumeurs bénignes** : risque très faible de récurrence, pas de métastase, pas de destruction loco-régionale
 - **Tumeurs à malignité locale** : potentiel de récurrence et de destruction locale si réséquées incomplètement, métastases rares.
 - **Tumeurs malignes (sarcomes)** : risque local et général (métastase) ;
Grading

Grade histopronostique des sarcomes

- Grade de la FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer)
 - 3 grades
 - 3 paramètres :
 - **Différenciation**
 - **Nombre de mitoses**
 - **Nécrose**
- Tumeur de grade 1 : tumeur très bien différenciée, à risque métastatique faible
- Tumeur de grade 3 : tumeur peu différenciée, à risque métastatique élevé

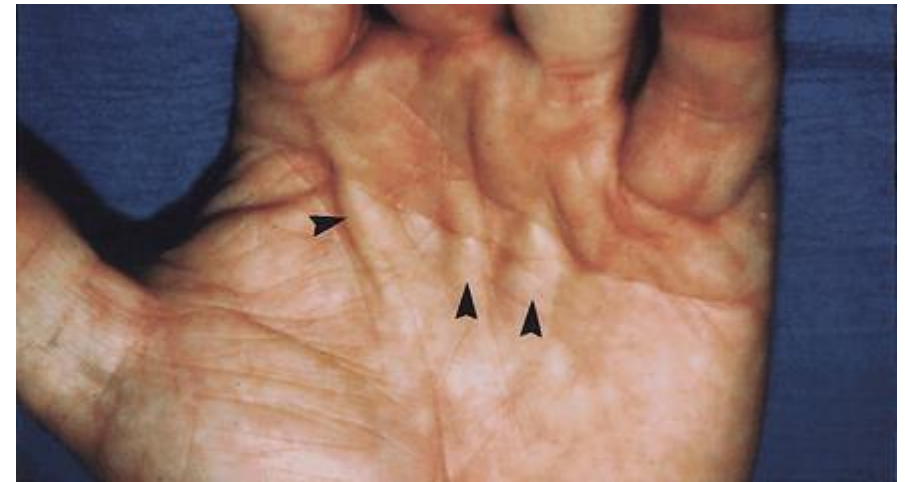
Fibromes

- Prolifération bénigne, croissance lente
- Fibroblastes +/- quantité de tissu conjonctif collagène
- Ubiquitaire :
 - Peau
 - Voies aérodigestives supérieures (Nez, Rhinopharynx)



Fibromatoses

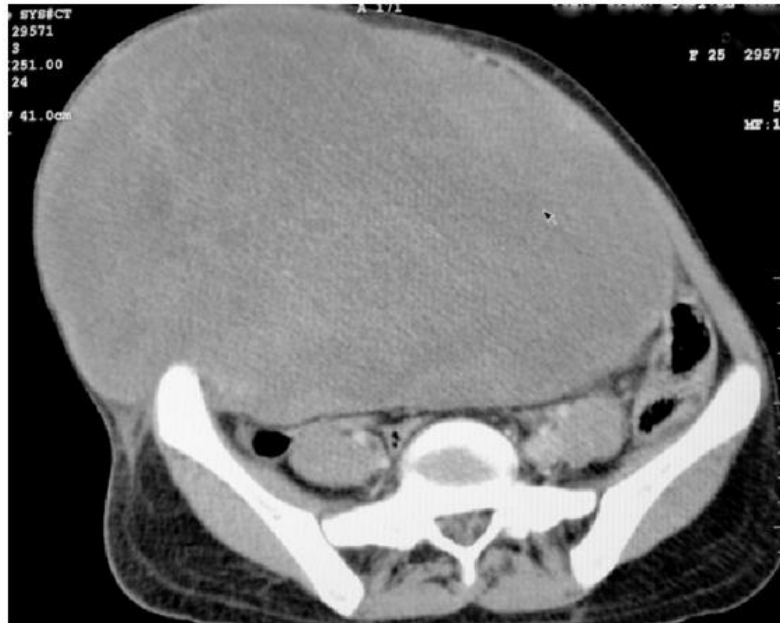
- Exemple de limite dans la classification Tumeur bénigne/Tumeur maligne
 - Tumeurs bénignes (microscopiquement)
 - Localement invasives et récidivantes
 - **NOTION D'AGRESSIVITÉ LOCALE**



**Fibromatose palmaire :
Maladie de Dupuytren**

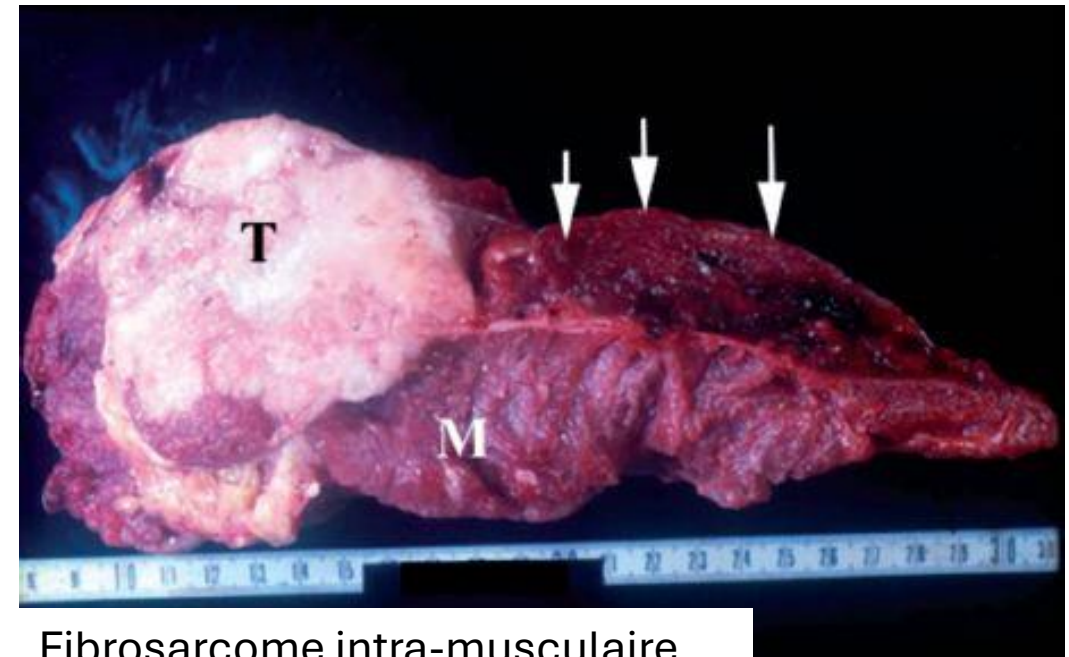
Fibromatoses

- Proliférations fibroblastiques multifocales, évolutives, développées à partir des aponévroses, envahissant et détruisant les muscles, pouvant être volumineuses
- Fibromatose desmoïde (intra ou extra-abdominale)



Autres tumeurs fibroblastiques

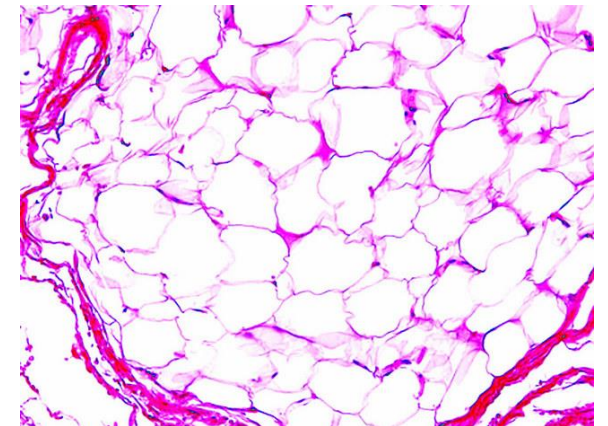
- Tumeur fibreuse solitaire
- Dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand :
 - Peau
 - Malignité locale (intermédiaire)
- Fibrosarcome :
 - Membres et tronc
 - Tumeur maligne



Fibrosarcome intra-musculaire

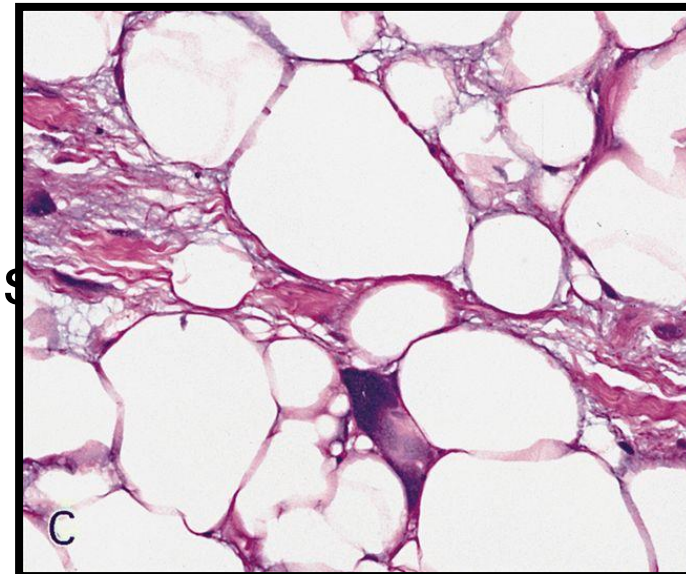
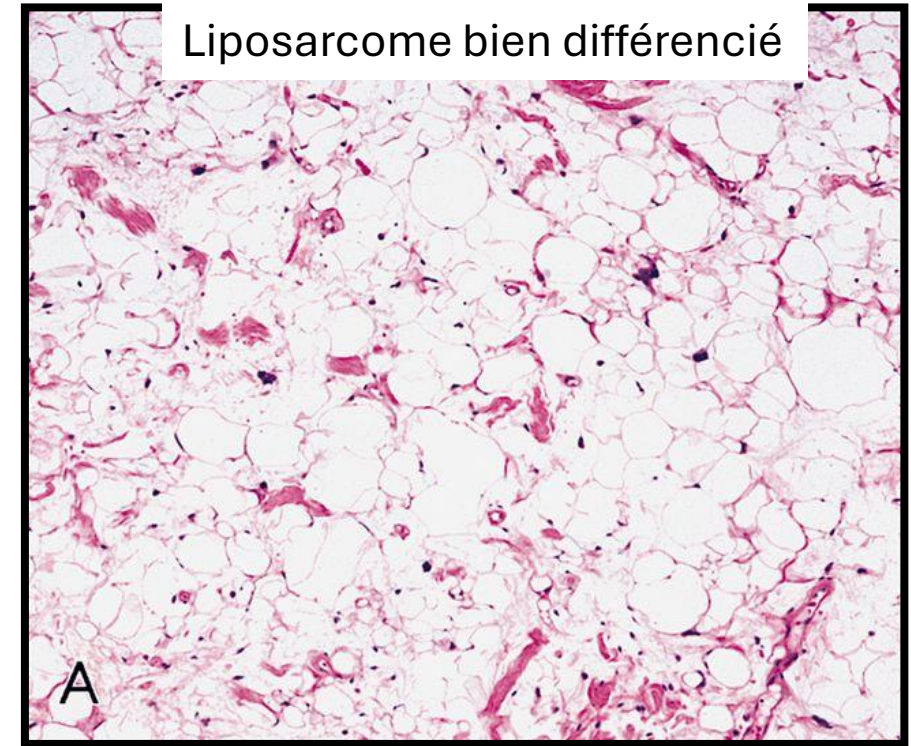
Lipomes

- Tumeurs fréquentes : 1/3 des tumeurs conjonctives
- Bénin, superficiel
- Après 45 ans
- Comme du tissu adipeux mature : jaune, flasque



Liposarcomes

- Tumeurs fréquentes des tissus mous
- Rétropéritoine ou des membres
- Types histologiques :
 - Bien différencié/Dédifférencié
 - Cellules rondes/Myxoïde
 - Pléomorphe
- Anomalies moléculaires spécifiques

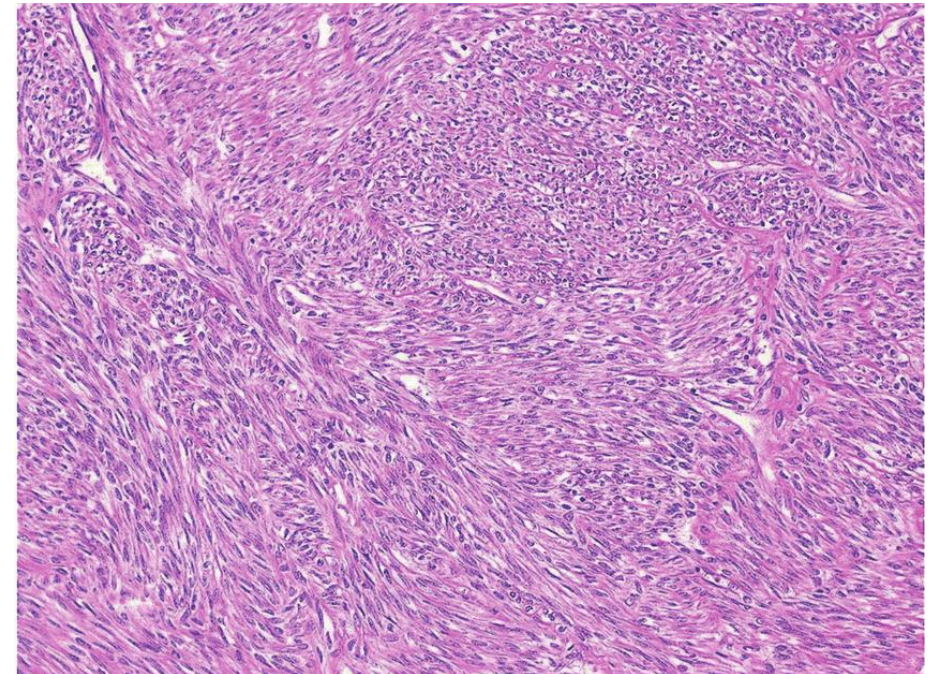


Tumeurs musculaires : classification

- Muscle lisse :
 - Leiomyome
 - Leiomyosarcome
- Muscle strié :
 - *Rhabdomyome*
 - Rhabdomyosarcomes

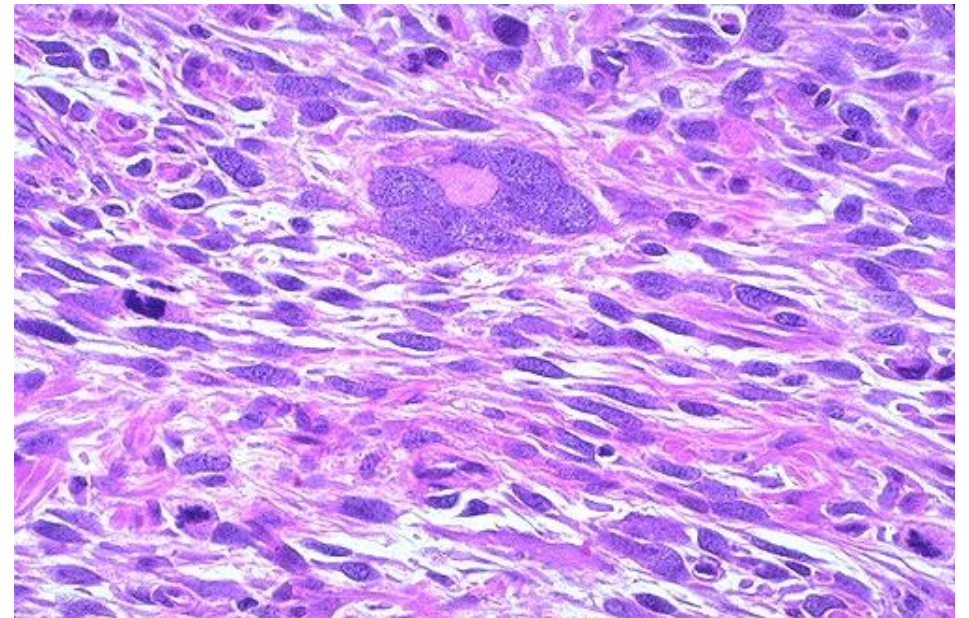
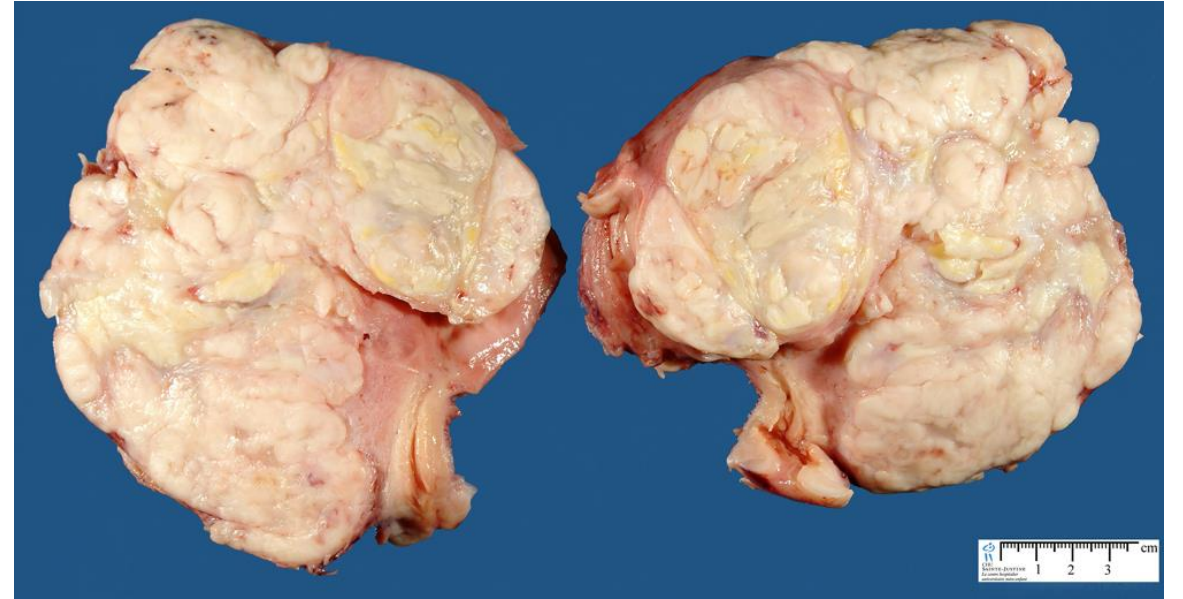
Leiomyomes

- Tumeurs fréquentes
- Bénignes, bien différenciées
- Utérus : « fibromes »
 - Femme, péri ou post-ménopausique
 - Tube digestif, peau, etc.



Leiomyosarcomes

- Tumeurs malignes
- Adulte
- Utérus
- Peau
- Viscères creux



Tumeurs musculaires striées

- **Rhabdomyome :**

- Cardiaque
- Associé à la sclérose tubéreuse de Bourneville

- **Rhabdomyosarcome :**

- Enfant > adulte
- Alvéolaire (anomalies génétiques) ou Embryonnaire
- Cavités céphaliques (orbite, nez, sinus) ou sphère uro-génitale (vessie, prostate, vagin, cordon spermatique)
- Chimiothérapie

Classification des tumeurs vasculaires

- Angiomes
 - Hémangiomes
 - Lymphangiomes
- Angiomatoses : nombreuses lésions vasculaires
- Angiosarcomes

Tumeurs vasculaires bénignes

Angiomes

- Tumeurs bénignes fréquentes
- Prolifération de vaisseaux néoformés entourés de tissu conjonctif
- Surtout dans la peau, les muqueuses, les muscles

Hémangiome

- Terme pour les tumeurs vasculaires bénignes
- Tumeurs et malformations vasculaires (hamartomes)
- *Hémangiome infantile* : tumeur de l'enfant qui a une croissance puis une auto-involution
- *Hémangiome caverneux* : tumeur profonde faite de larges cavités vasculaires +/- kystiques

Angiomes



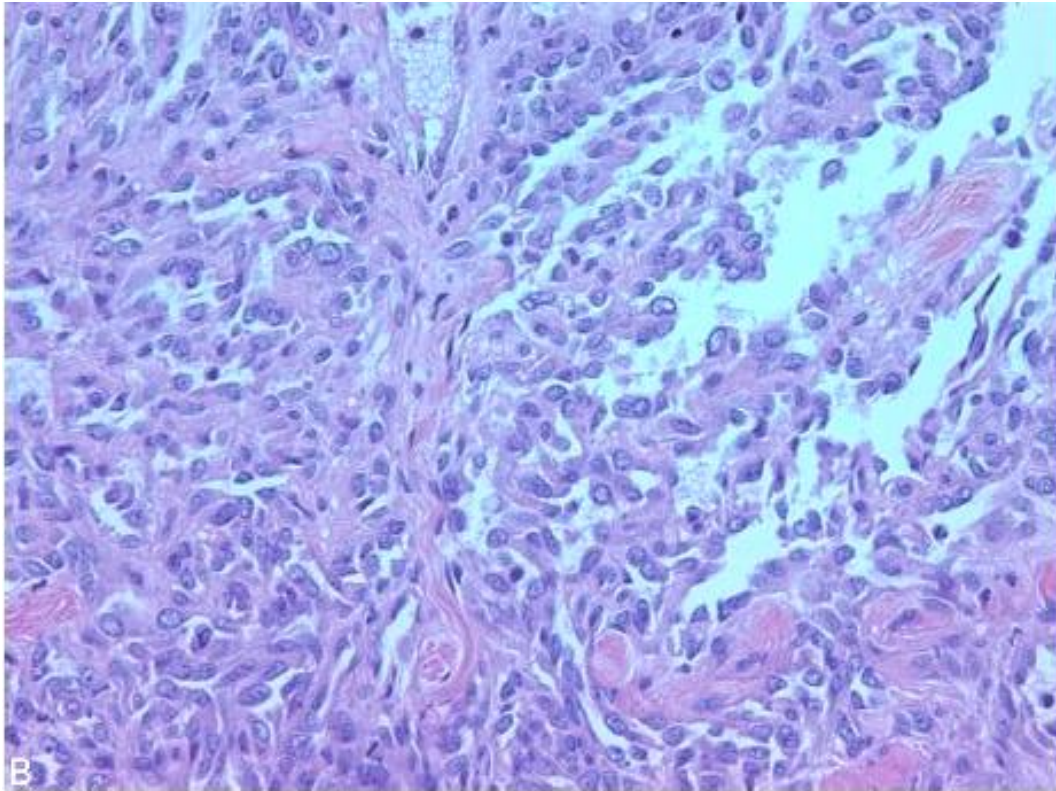
Hémangiome infantile



Lymphangiome

Angiosarcomes

- Tumeurs malignes peu différenciées des vaisseaux
- Peau ou tissus mous

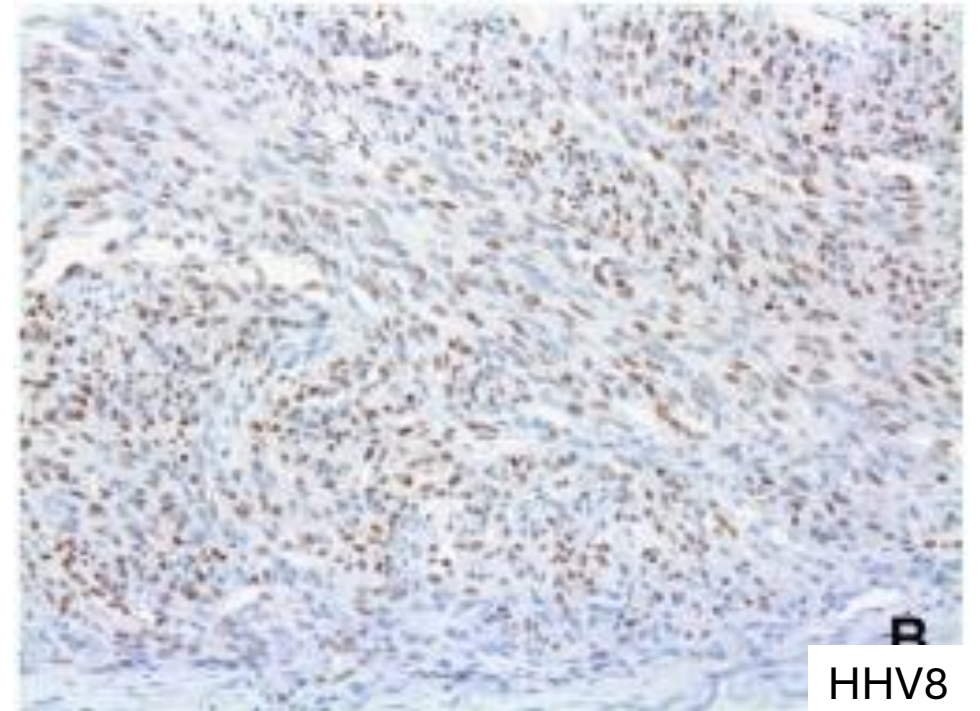


Sachiko Ono. Arch Dermatol. 2012



Sarcome de Kaposi

- Tumeur vasculaire secondaire à une infection par le virus HHV8
- 2 circonstances :
 - Sujet africain
 - Sujet atteint par le VIH en phase SIDA
- Peut régresser avec la correction de l'immunodépression



Classification des tumeurs du squelette

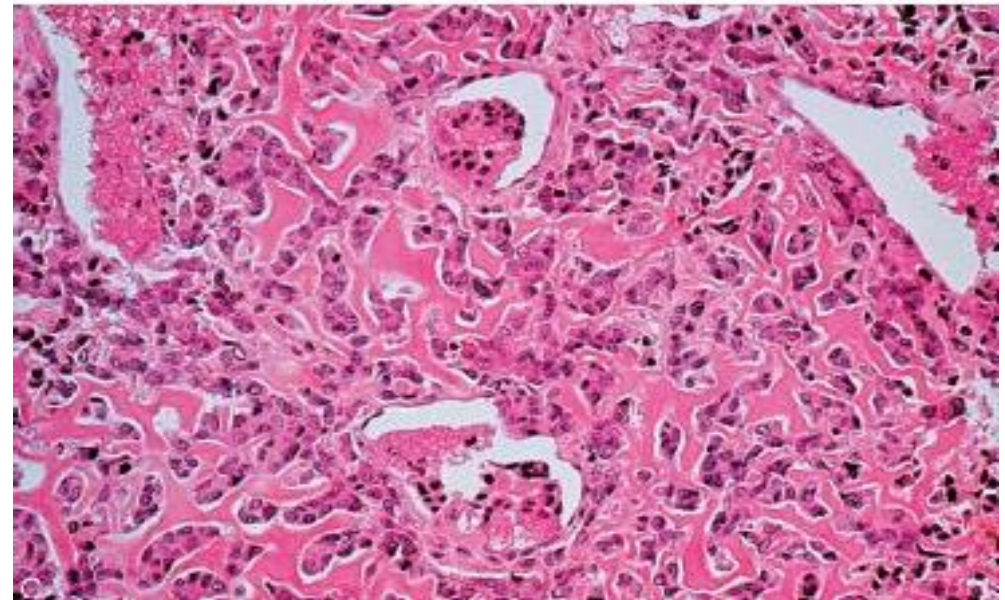
- Tumeurs ostéoformatrices :
 - Bénignes : ostéome ostéoïde et ostéoblastome
 - Malignes : ostéosarcome
- Tumeurs cartilagineuses :
 - Bénignes : ostéochondrome et chondrome
 - Malignes : Chondrosarcomes
- Chordomes
- Sarcome d'Ewing

Tumeurs osseuses bénignes

- Ostéoblastes sans atypies et ostéogénèse immature, stroma richement vascularisé.
- Ostéome ostéoïde : tumeur douloureuse, douleurs calmées par la prise d'AINS

Ostéosarcomes

- Tumeurs malignes de l'adolescence
- Ostéoblastes atypiques produisant un tissu osseux immature
- Détruit l'os préexistant
- Evolution rapide, métastases pulmonaires



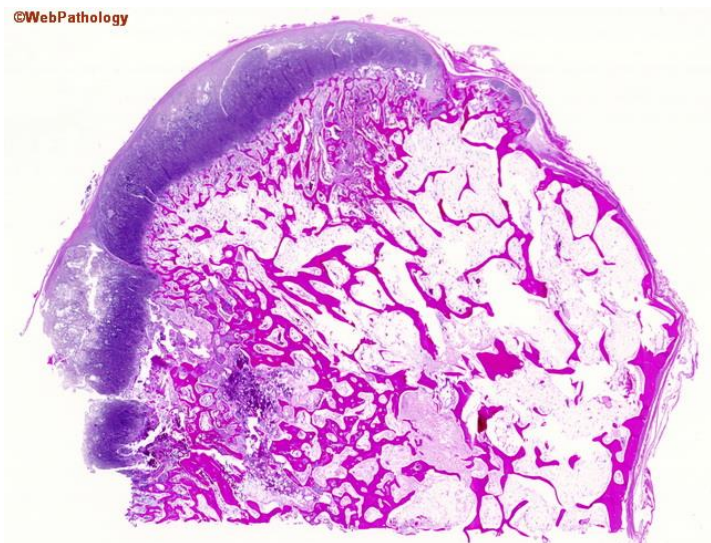
Tumeurs cartilagineuses

bénignes

Ostéochondrome

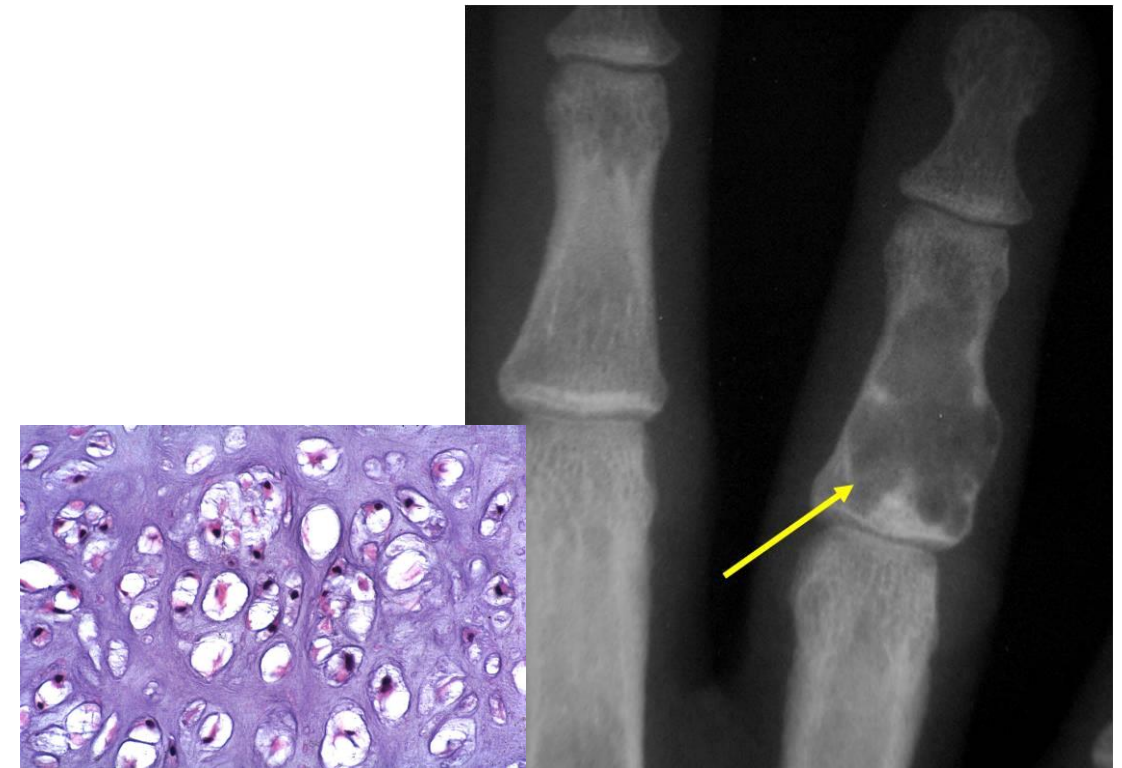
(= exostose ostéogénique)

- Tumeur cartilagineuse la plus fréquente
- Coiffe cartilagineuse (cartilage de croissance)
- Tissu osseux trabéculaire



(En)Chondrome :

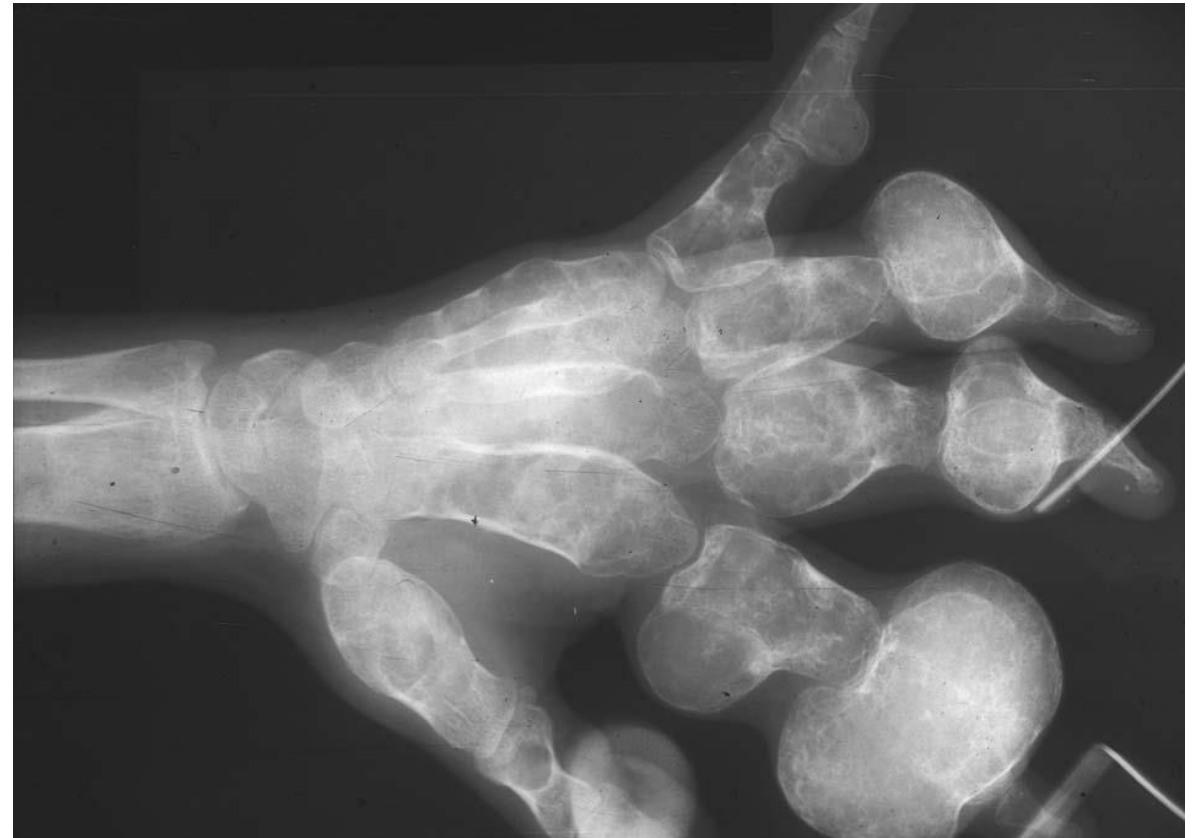
- Nodules cartilagineux de petite taille, chondrocytes sans atypies
- Respecte l'os préexistant



Exostoses multiples

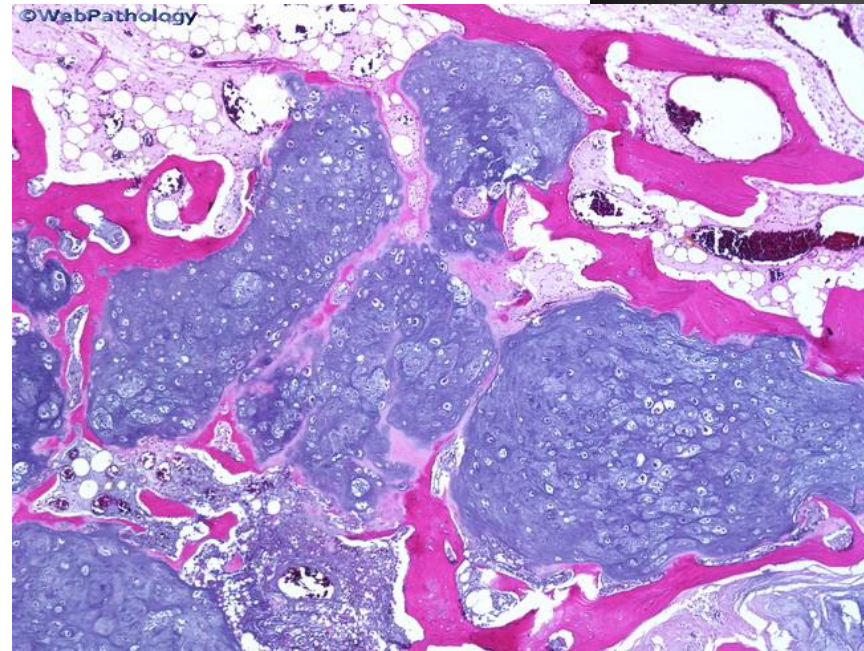
Chondromatose multiple

- Risque de transformation :
 - Surveillance
 - Excision au moindre doute



Chondrosarcomes

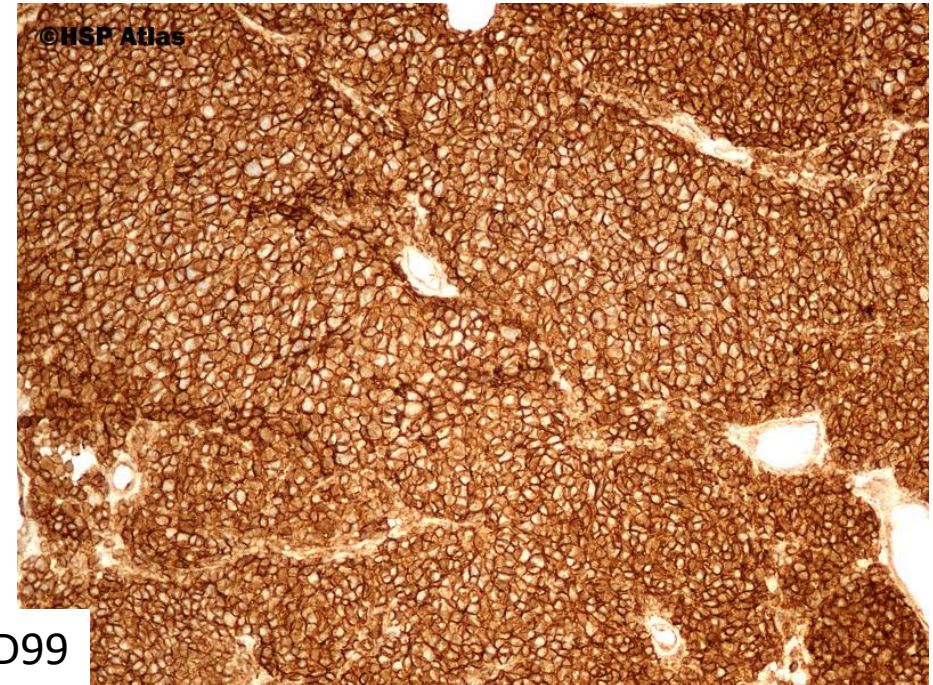
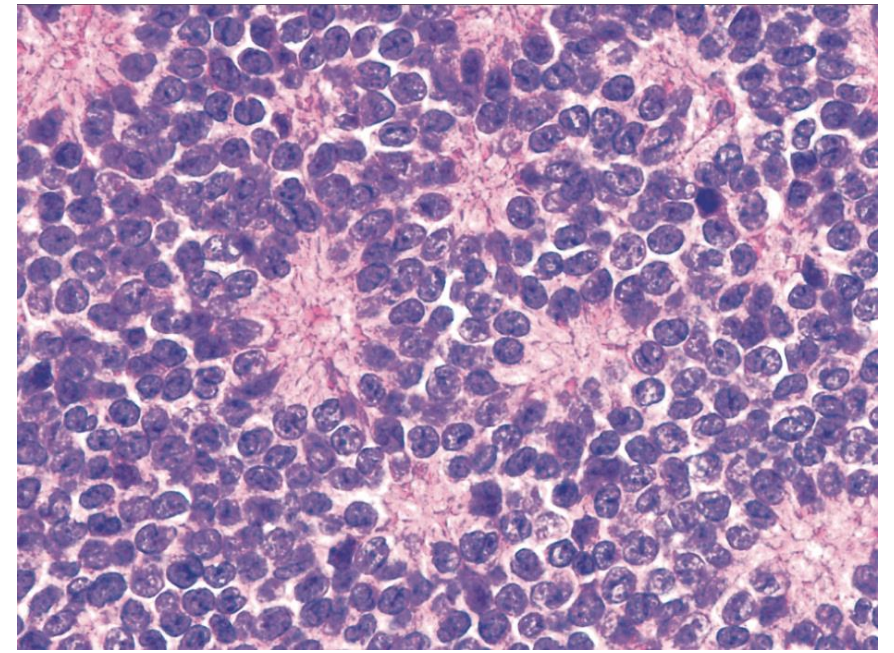
- Tumeurs rares de l'adulte âgé
- Evolution lente
- OS plats des ceintures
- Histologie :
 - Nodules cartilagineux de grande taille
 - Chondrocytes atypiques
 - Détruit l'os
- Grades :
 - Grade I : malignité locale
 - Grade II-III : risque de dissémination métastatique pulmonaire



Chondrosarcome bien différencié

Sarcome d'Ewing

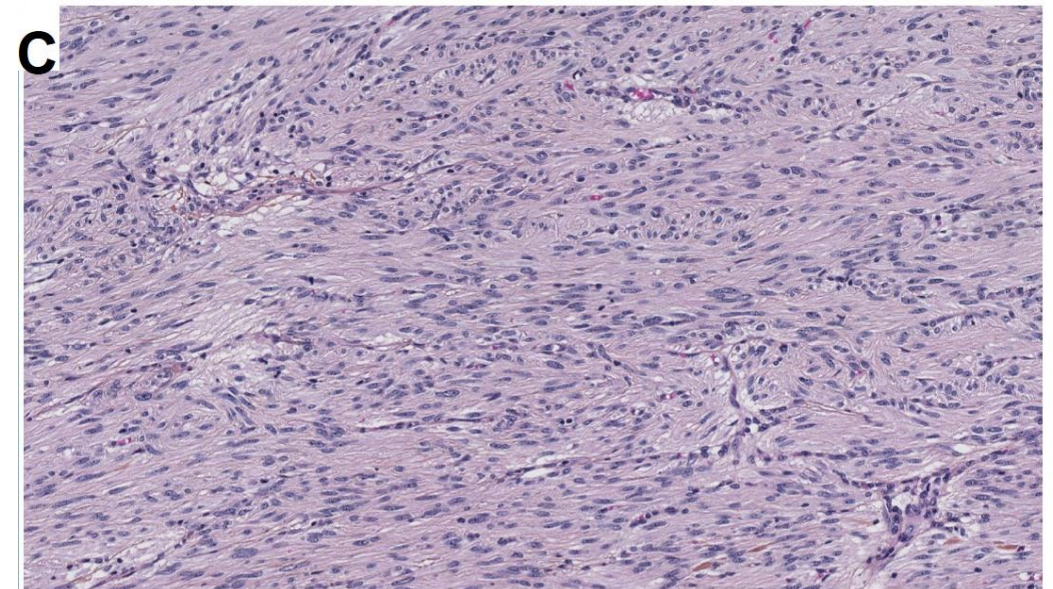
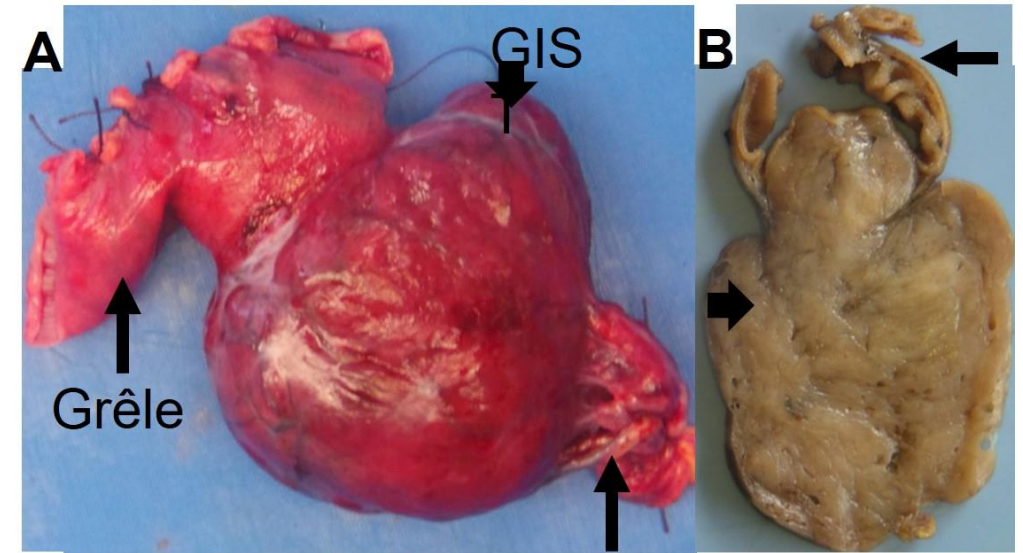
- Tumeur maligne osseuse intra-médullaire, lytique
- Tous les os
- Peut être extra-osseux
- Tumeur indifférenciée
- Translocation spécifique



CD99

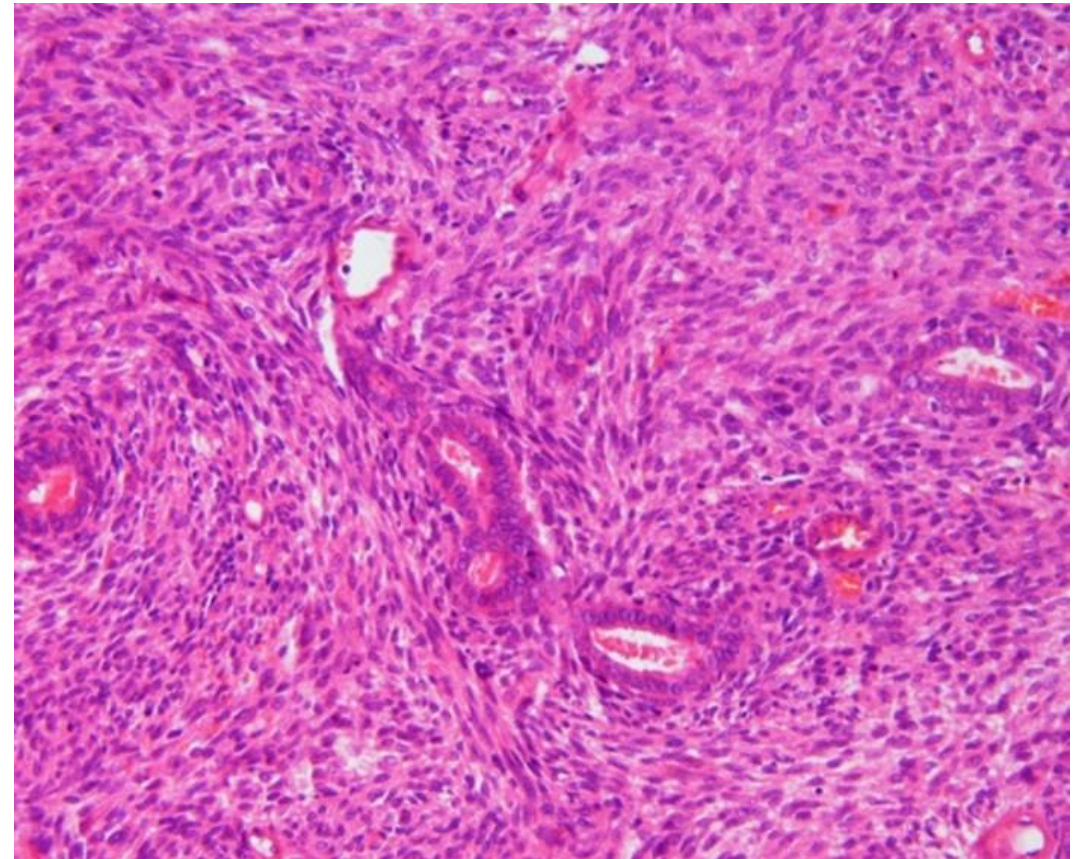
Tumeurs stromales digestives (GIST)

- Estomac ou intestin grêle
- Dérivent des cellules interstitielles de Cajal Associées à :
 - Une expression de KIT (CD117)
 - Une mutation activatrice de *KIT* : diagnostic et traitement
- Evolution très hétérogène



Tumeurs de différenciation incertaine

- Ex : synovialosarcome
- Touche les membres, le poumon, le rein
- Prolifération biphasique :
 - Composante conjonctive fusiforme
 - Composante épithéliale
- Translocation spécifique





Biologie moléculaire des tumeurs appliquées aux tumeurs des tissus conjonctifs

Oncogènes

- Formes altérées de gènes normaux (**proto-oncogènes**)
- Proto-oncogènes :
 - Conservés dans toutes les espèces
 - Rôle essentiel dans des étapes clés de la régulation de l'embryogénèse ou de la croissance cellulaire ou tissulaire
 - **Deviennent oncogènes si remaniés et/ou surexprimés : gain de fonction**
 - **Peuvent induire l'apparition et/ou le développement d'une tumeur**

Gènes suppresseurs de tumeur

- = Anti-oncogènes
- Inhibiteurs de la croissance cellulaire
- Inactivation du produit de ces gènes par perte de fonction bi-allélique : nécessité de 2 évènements moléculaires
- Perte de fonction
- Voies de signalisation, prolifération, différenciation, cycle, apoptose

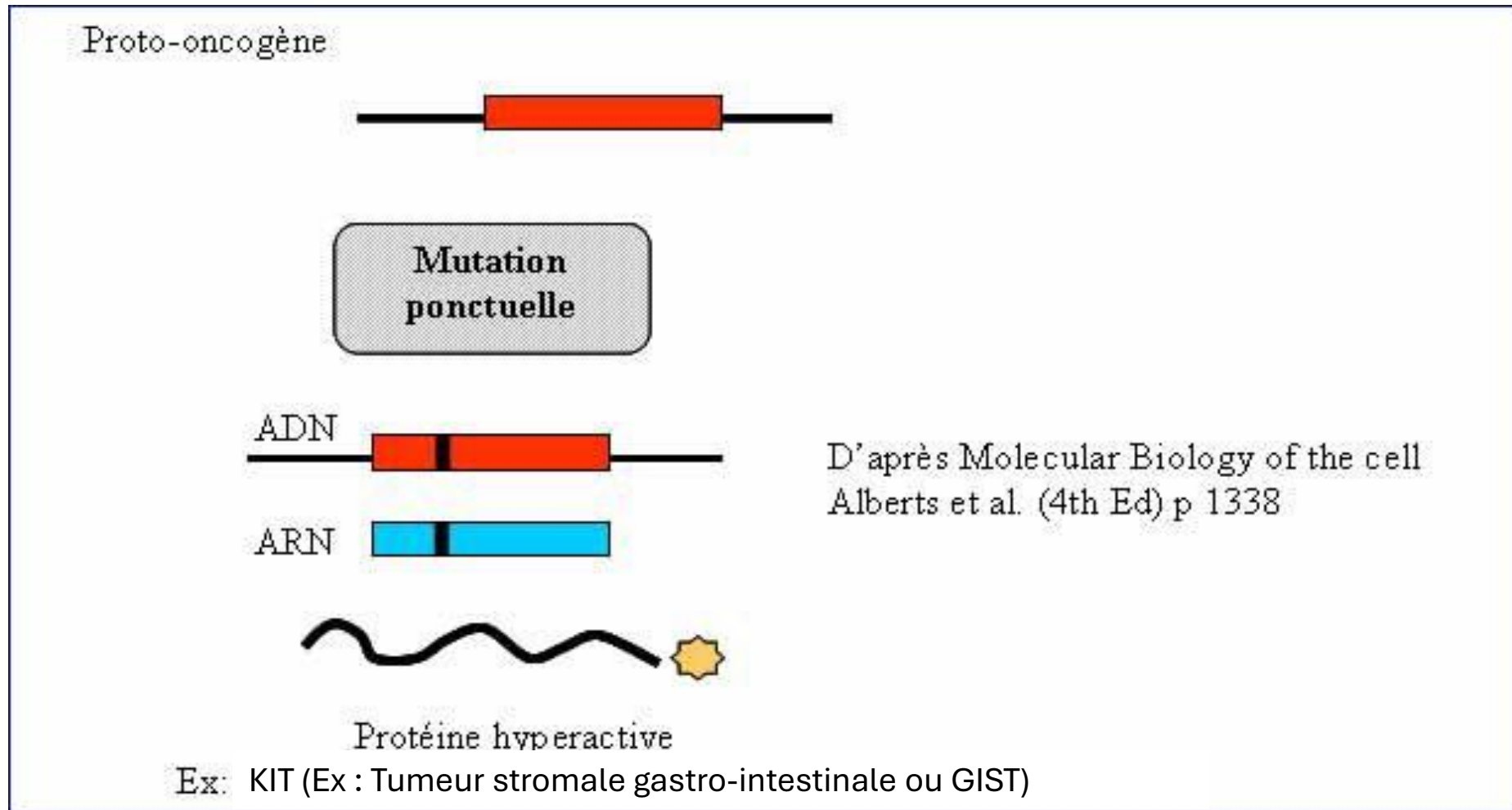
Question

- Quels sont les types d'anomalies moléculaires impliquées dans la biologie des tumeurs que vous connaissez ?

Types d'altérations géniques

- Mutations : mutations ponctuelles, délétions, insertions
- Réarrangements chromosomiques (translocations/inversions)
- Délétions chromosomiques
- Amplifications géniques

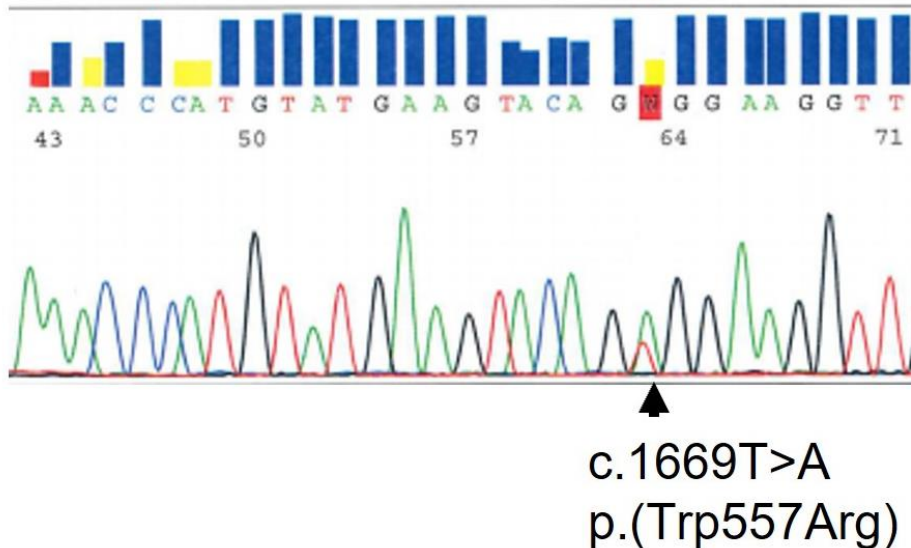
Mutations ponctuelles



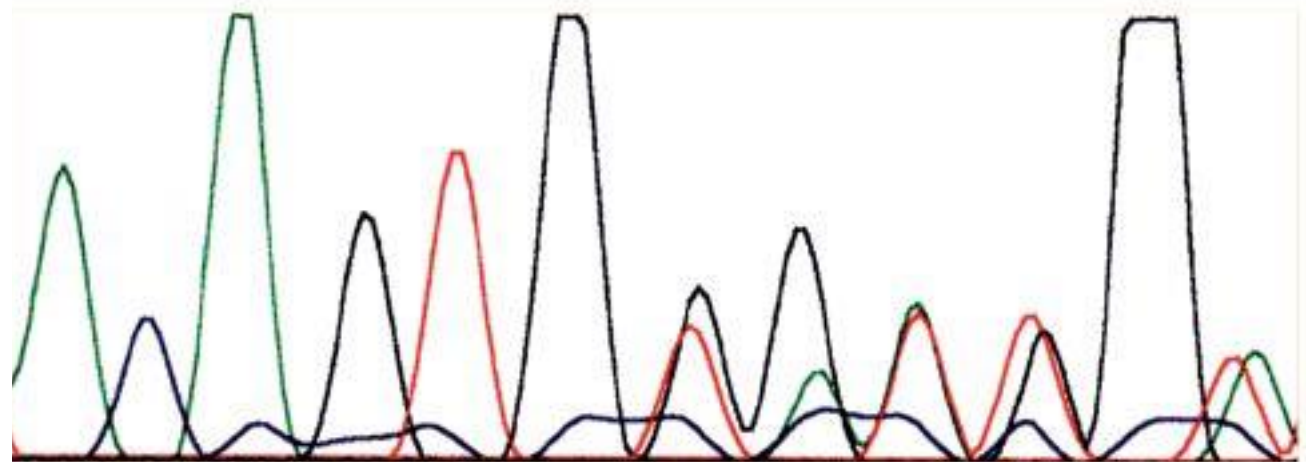
Mutations ponctuelles

- Modification de l'activité
- Proto-oncogènes : 1 seul événement
- Anti-oncogènes : 2 événements (récessif)

E Séquence Exon 11 du gène C-KIT



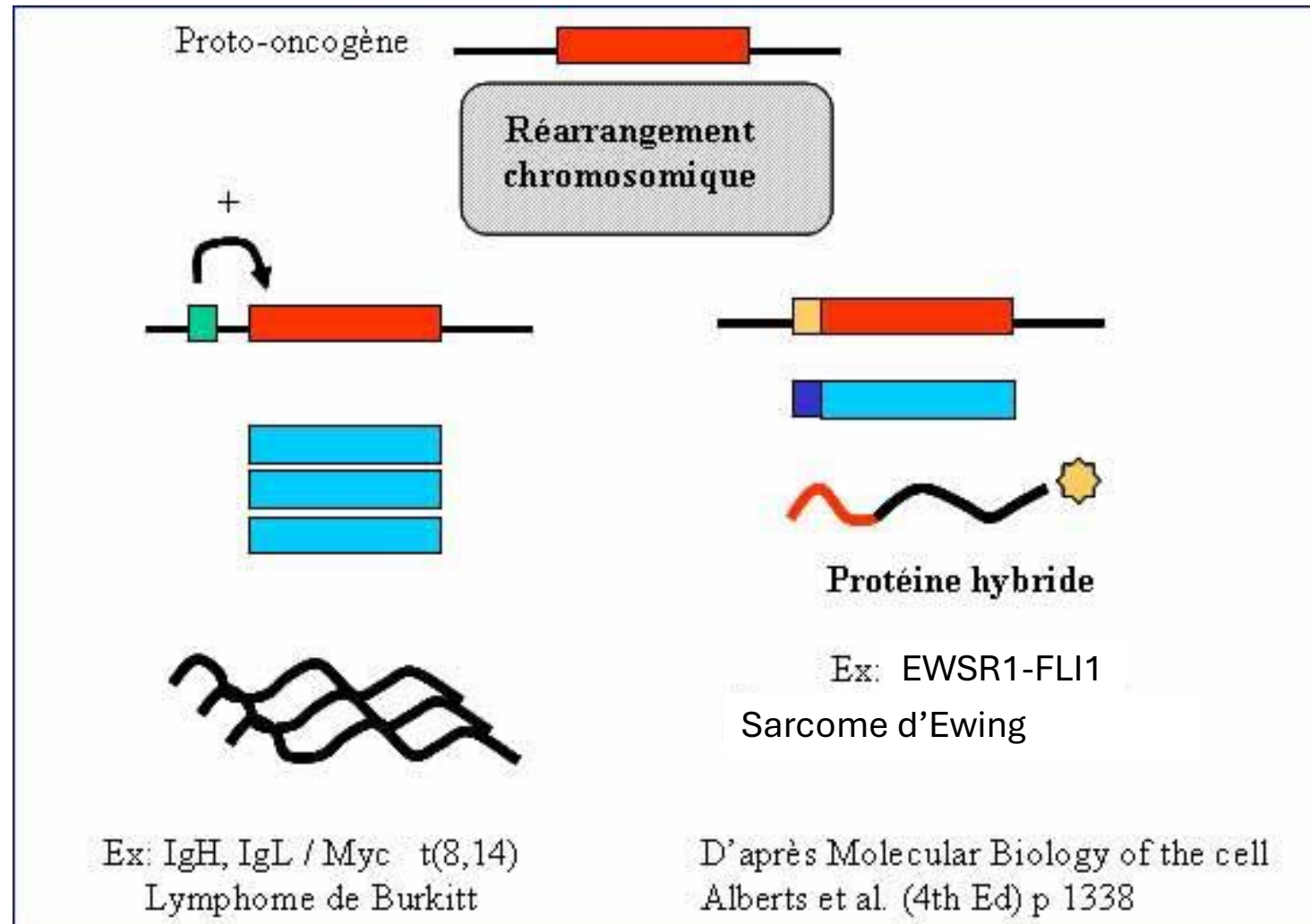
Mutation « gain de fonction » par Délétion de 6 paires de bases du gène KIT dans une GIST



Réarrangements chromosomiques

- Translocation :
 - Obtention d'une protéine hybride/chimérique
 - Hyper-expression d'un oncogène en raison de la transposition de sa région codante à proximité de séquences régulatrices d'autres gènes
- Ex : EWSR1 - FLI1 :
 - t(11; 22)
 - Gène de fusion exons 1-7 de *EWSR1* et exons 5-9 de *FLI1*
 - Protéine chimérique

Réarrangements chromosomiques



Exemple de Translocation avec promoteur Fort

Survenue d'une fusion génique

Situation normale: 1 gène à promoteur « fort »



IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH
IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH
IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH
IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH
IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH
IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH IgH



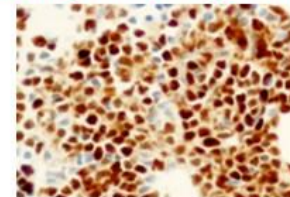
Cycline D1

Cycline D1

Cycline D1



CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD 1 CyclineD1 CyclineD1
CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD 1 CyclineD1 CyclineD1
CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD 1 CyclineD1 CyclineD1
CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD 1 CyclineD1 CyclineD1
CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD1 CyclineD 1 CyclineD1 CyclineD1

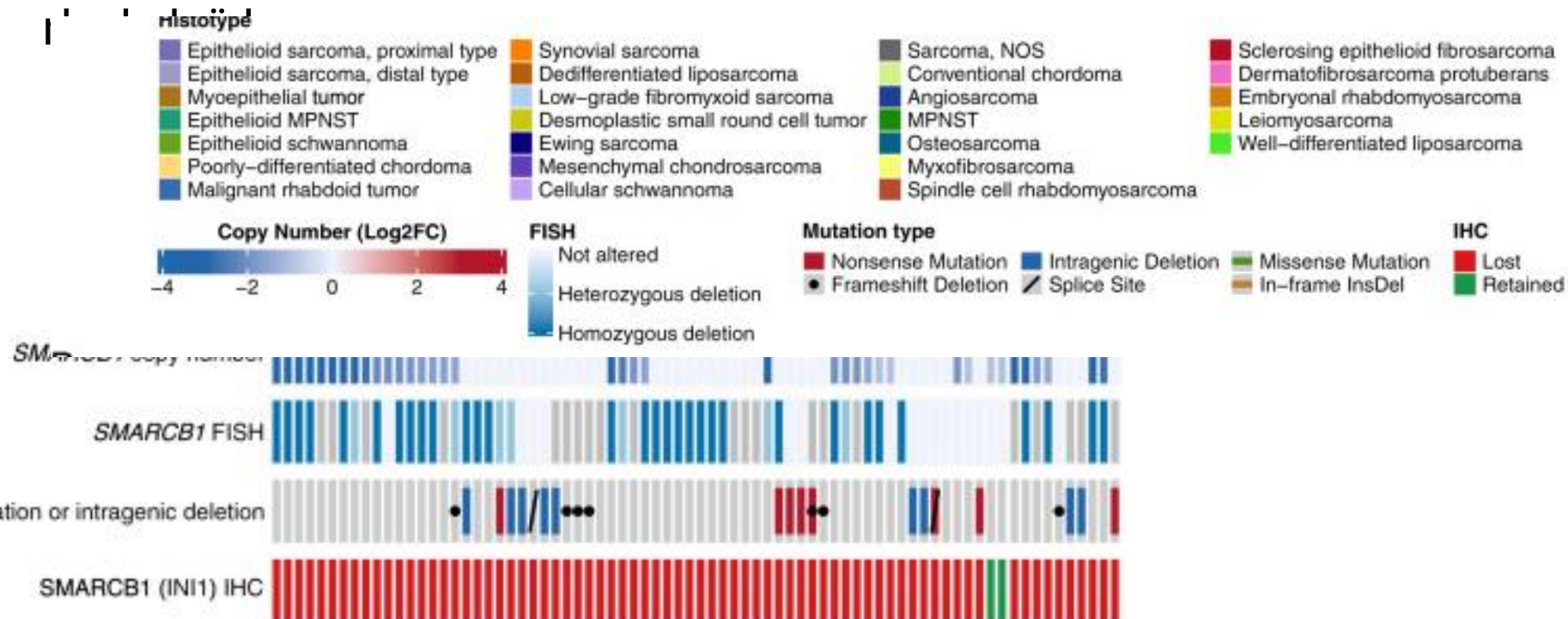


Surexpression de cycline D1 en immunohistochimie

Délétions chromosomiques

- Perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur
 - Ex : protéines du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)
 - Dans les sarcomes : perte du gène *SMARCB1* dans les tumeurs

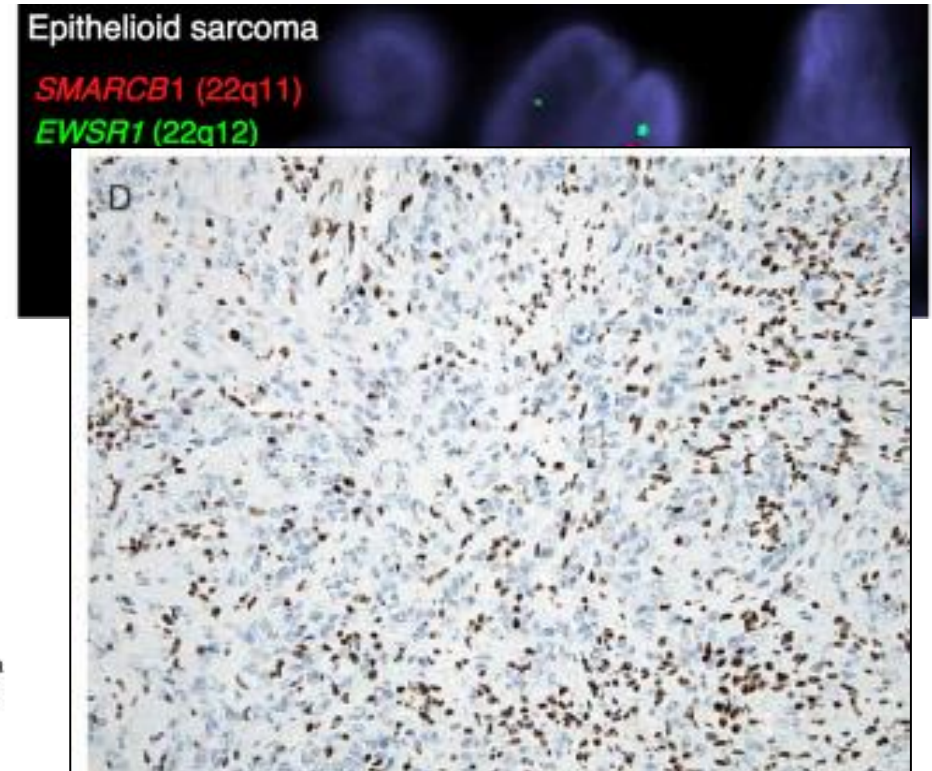
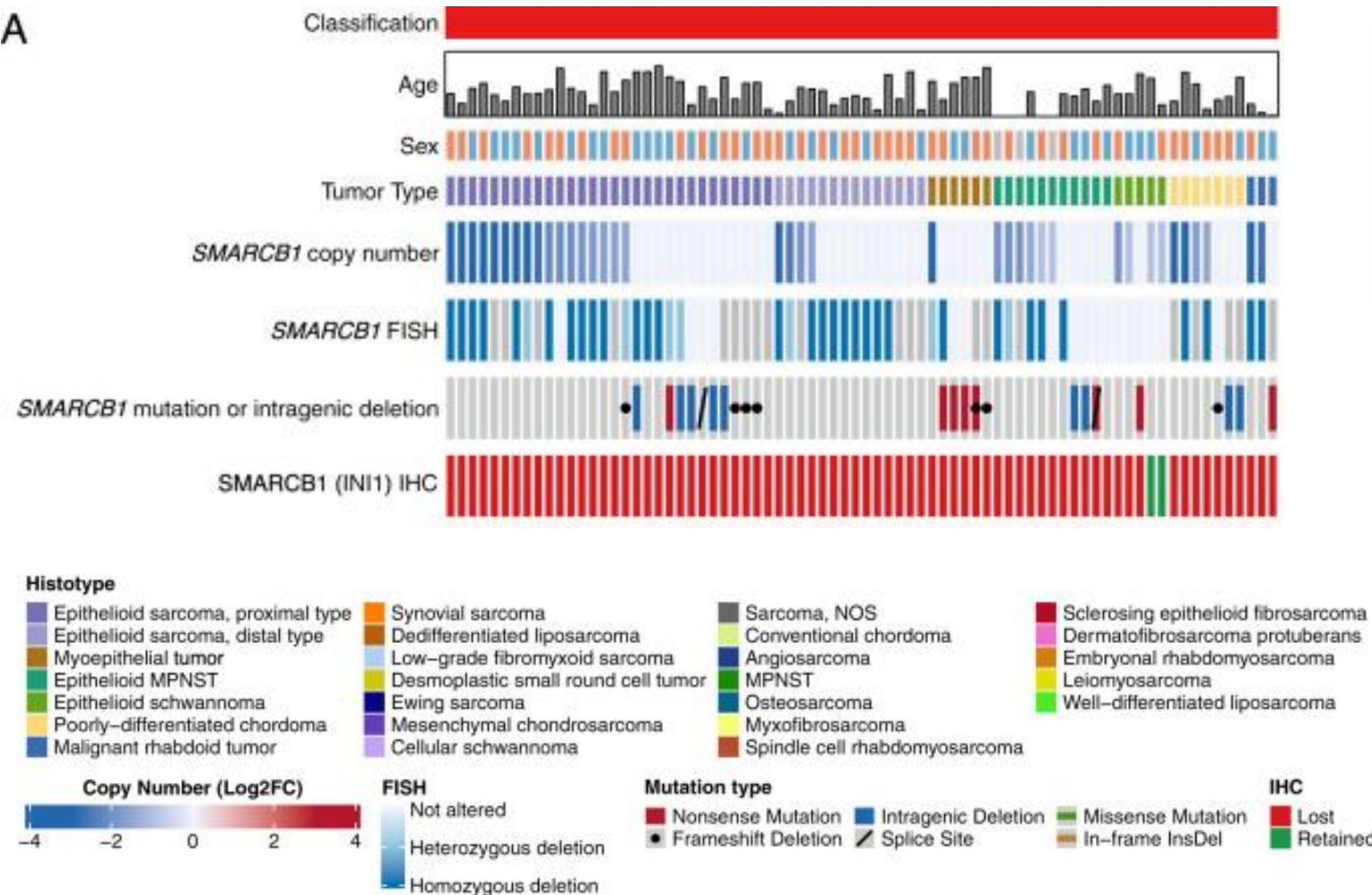
A



Tumeurs *SMARCB1* déficientes

- Groupe très hétérogène de tumeurs, majoritairement sarcomes

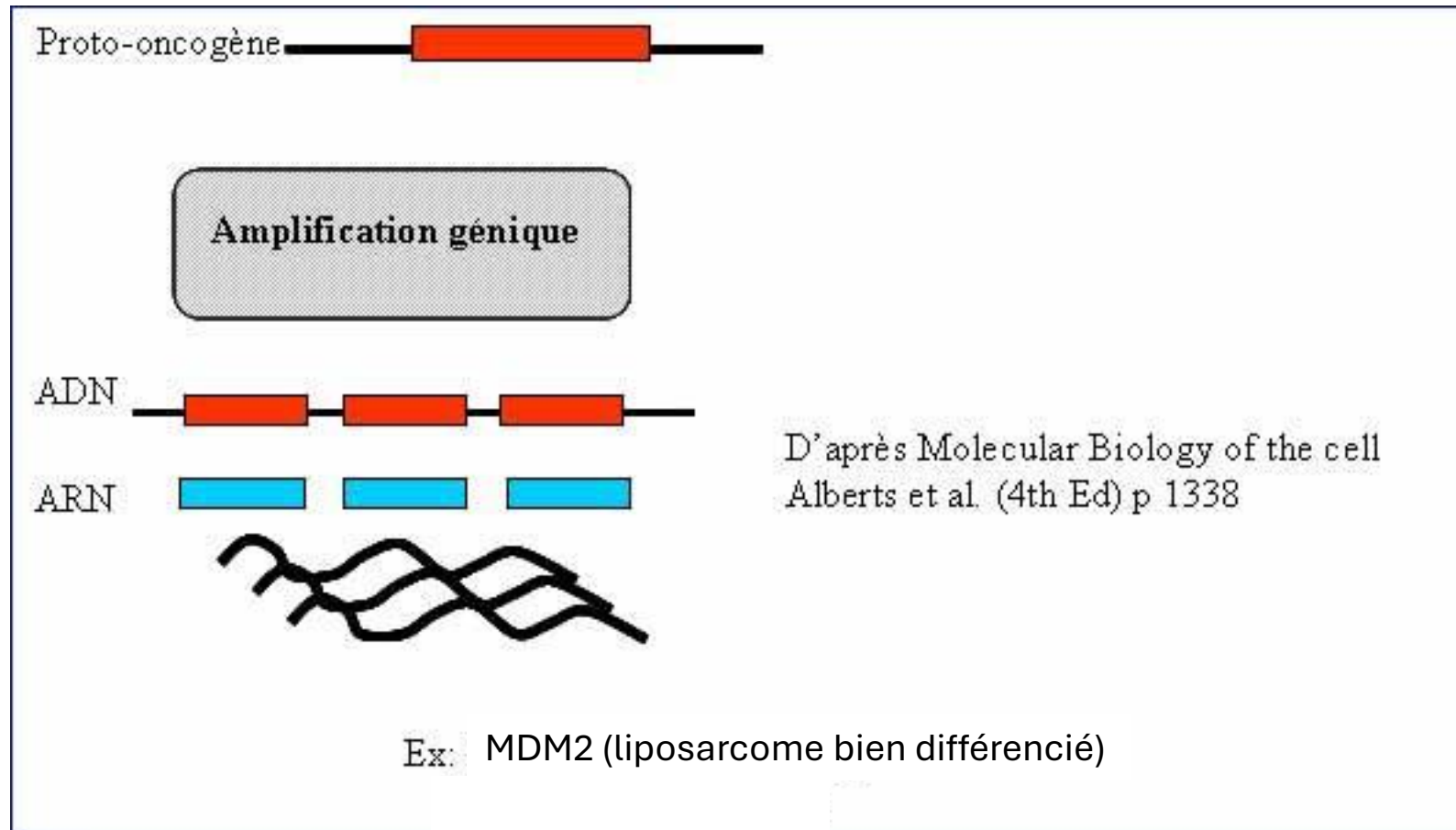
A



Amplification génique

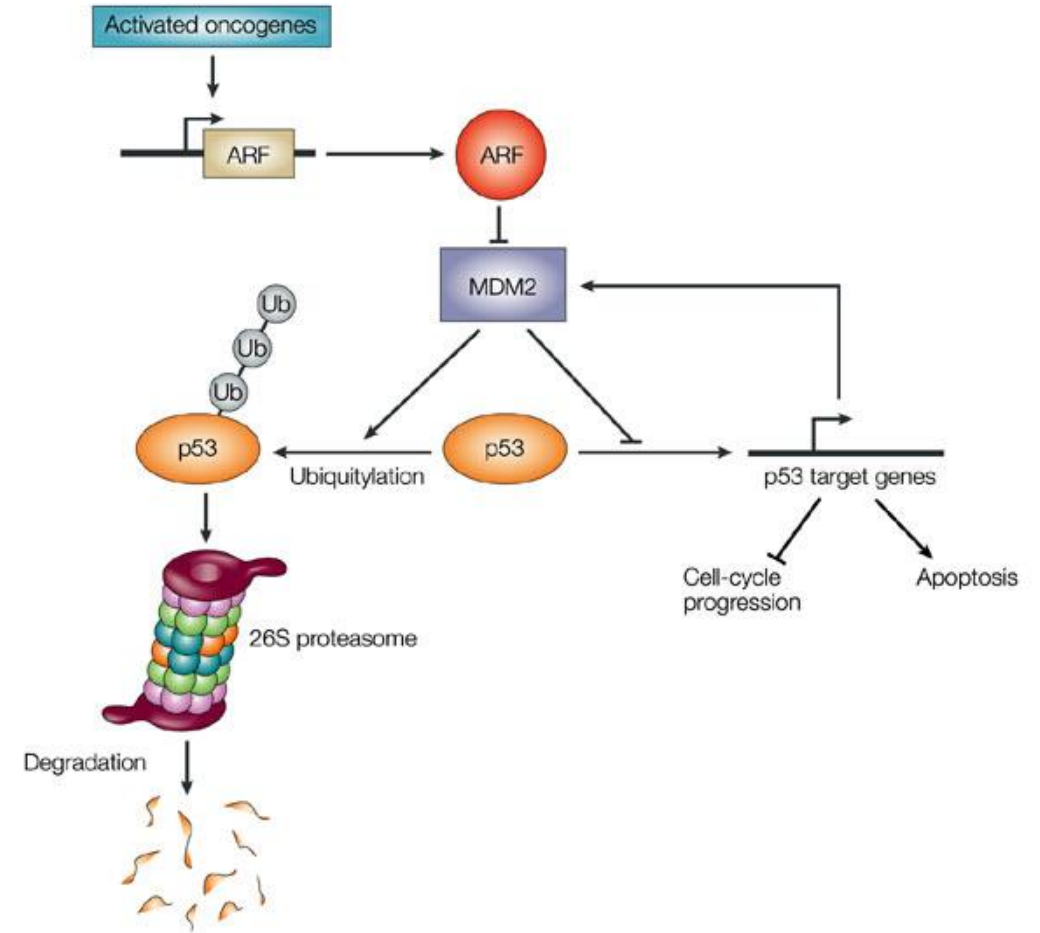
- Multiplication du nombre de copies d'un gène
- Augmentation de son expression
- Etape tardive
- Ex : *MDM2* et Liposarcome

Amplification génique



IHC et amplification diagnostique MDM2

- Protéine E3 ubiquitine ligase
- Chromosome 12q13-15
- Amplifié dans le liposarcome bien différencié/dédifférencié



Exemples de proto-oncogènes et types d'anomalies moléculaires les activant

Tableau 8.1

Exemples de proto-oncogènes impliqués dans des tumeurs humaines

Proto-oncogènes	Type d'anomalie	Exemples de tumeurs impliquées
<i>ERBB1 (EGFR)</i>	sur-expression ou mutation activatrice	nombreux carcinomes
<i>ERBB2 (HER2)</i>	amplification	carcinomes mammaires et ovariens
<i>FLT3</i>	mutation activatrice	leucémies aiguës myéloïdes
<i>RET</i>	mutation activatrice	carcinomes thyroïdiens
<i>PDGFR</i>	mutation activatrice	sarcomes, gliomes
<i>KIT</i>	mutation activatrice	tumeurs stromales gastro-intestinales
<i>KRAS</i>	mutation activatrice	carcinomes coliques, bronchiques, pancréatiques
<i>NRAS</i>	mutation activatrice	leucémies, mélanomes
<i>BRAF</i>	mutation activatrice	mélanomes
<i>ABL</i>	translocation	leucémie myéloïde chronique
<i>CMYC</i>	translocation	lymphome de Burkitt
<i>NMYC</i>	amplification	neuroblastomes
cycline D	translocation	lymphomes du manteau
<i>CDK4</i>	mutation activatrice	mélanomes

Altérations épigénétiques

- Pas de modification de la structure de l'ADN
- Modification de l'expression des gènes
- Hypo ou Hyperméthylation des **régions modulatrices de la transcription**
- EX : *MLH1*

Biologie moléculaire des tumeurs des tissus conjonctifs

- Anomalies moléculaires non spécifiques :
 - Dérégulation de la prolifération cellulaire et du contrôle du cycle cellulaire (TP53)
 - Mutations activatrices ou inhibitrices
- **Anomalies moléculaires spécifiques :**
 - **Amplifications** (MDM2 et liposarcome)
 - **Translocations +++ :** gènes de fusion avec **acquisition de nouvelles fonctions cellulaires** (Ewing).
- Tumeurs bénignes : **souvent des anomalies moléculaires spécifiques, mais ne conférant pas une capacité à disséminer** (diagnostic)

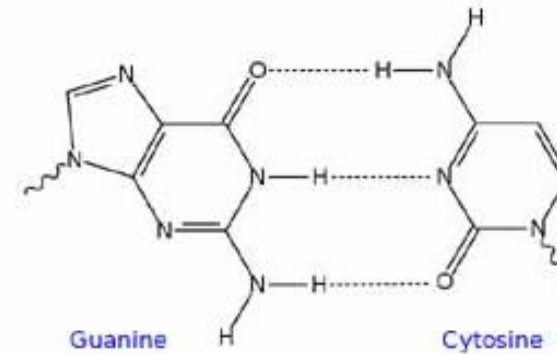
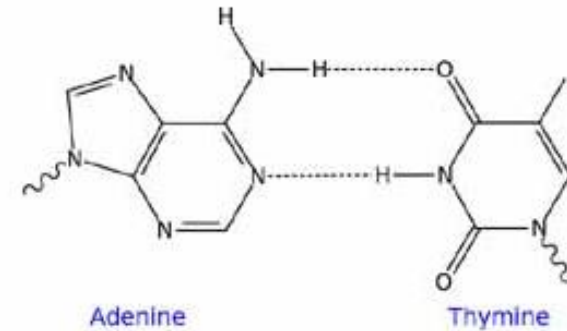
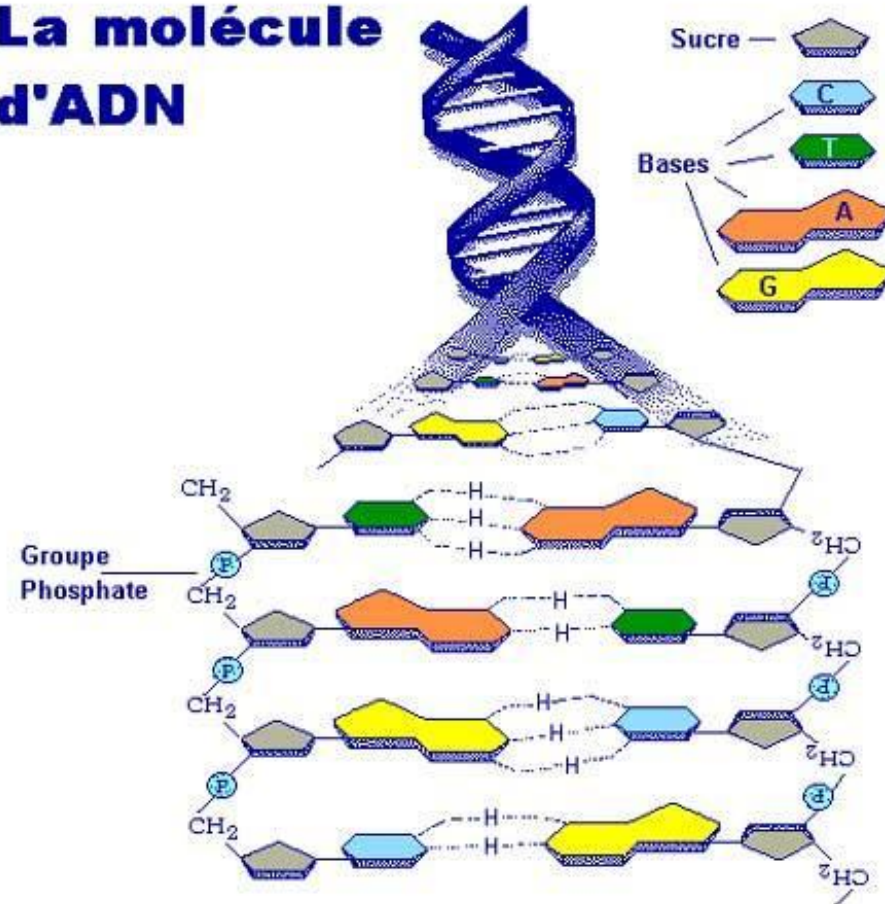


Techniques d'analyse des anomalies moléculaires - FISH

Principe de l'hybridation in situ

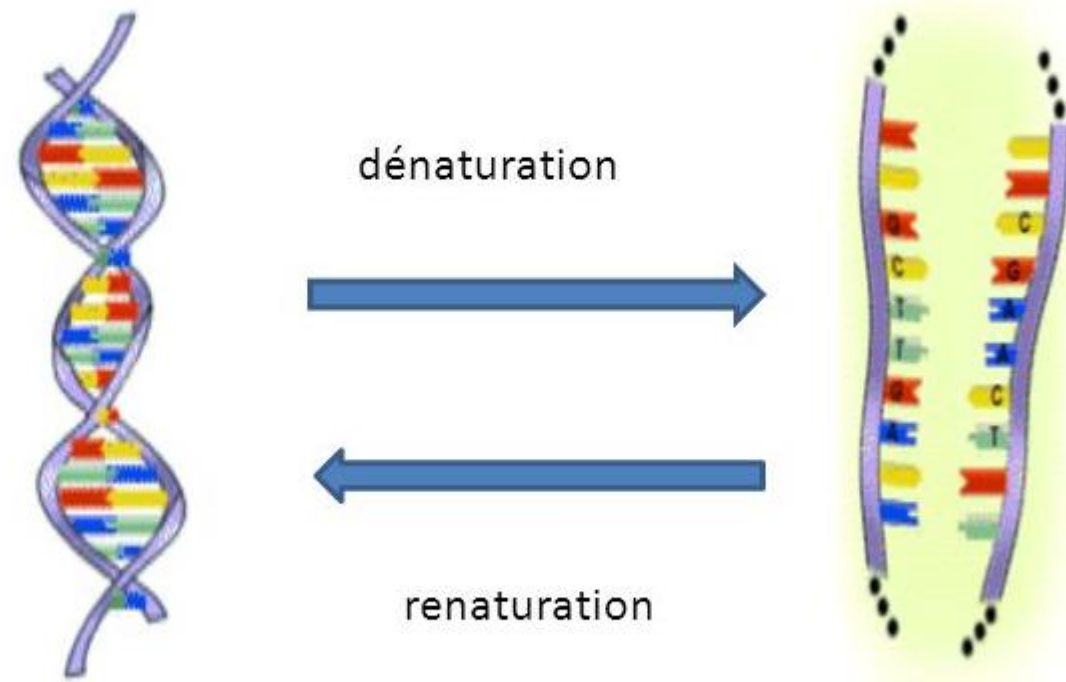
- Basée sur la complémentarité de l'ADN

La molécule d'ADN

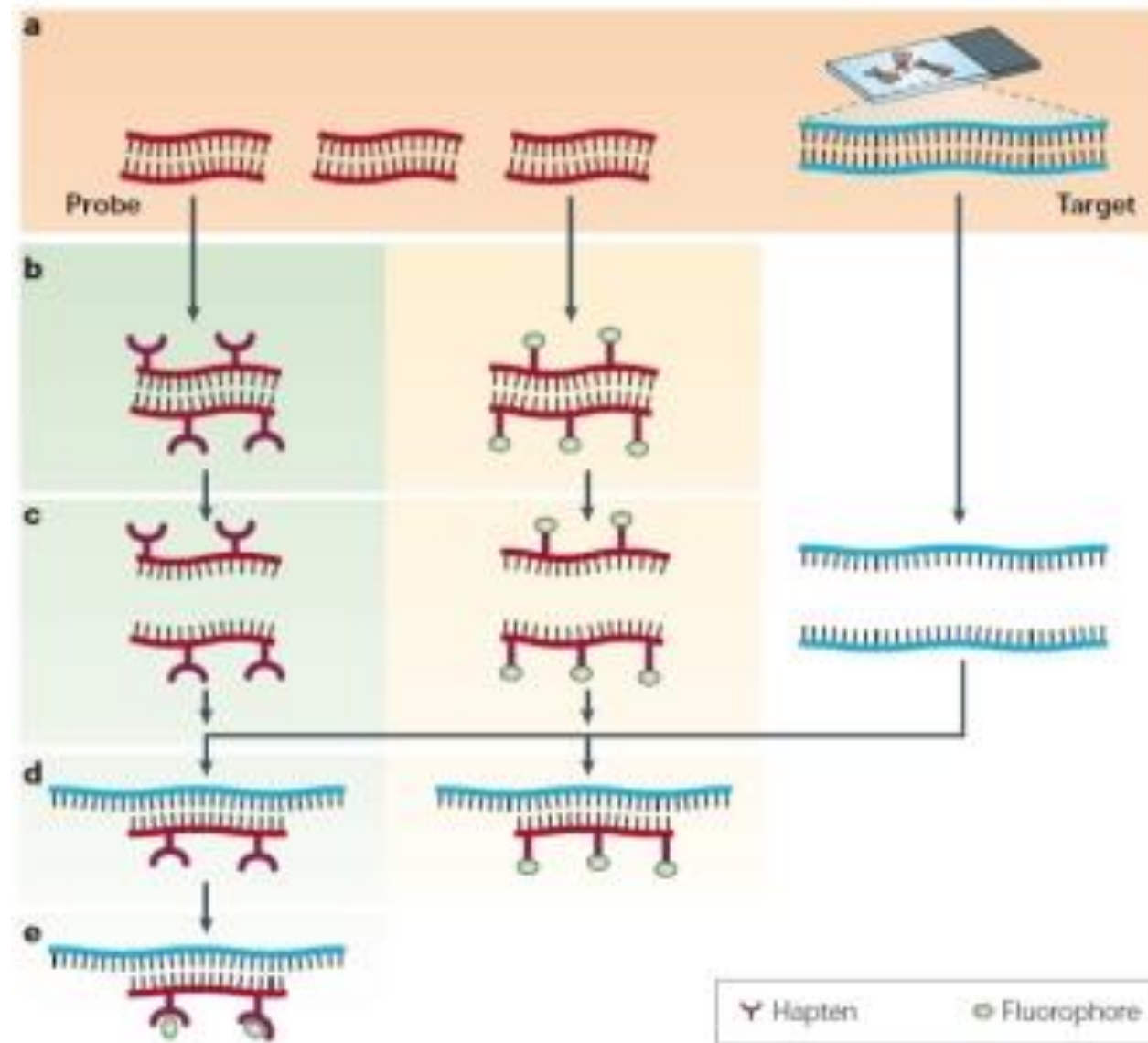


Dénaturation de l'ADN par chauffage

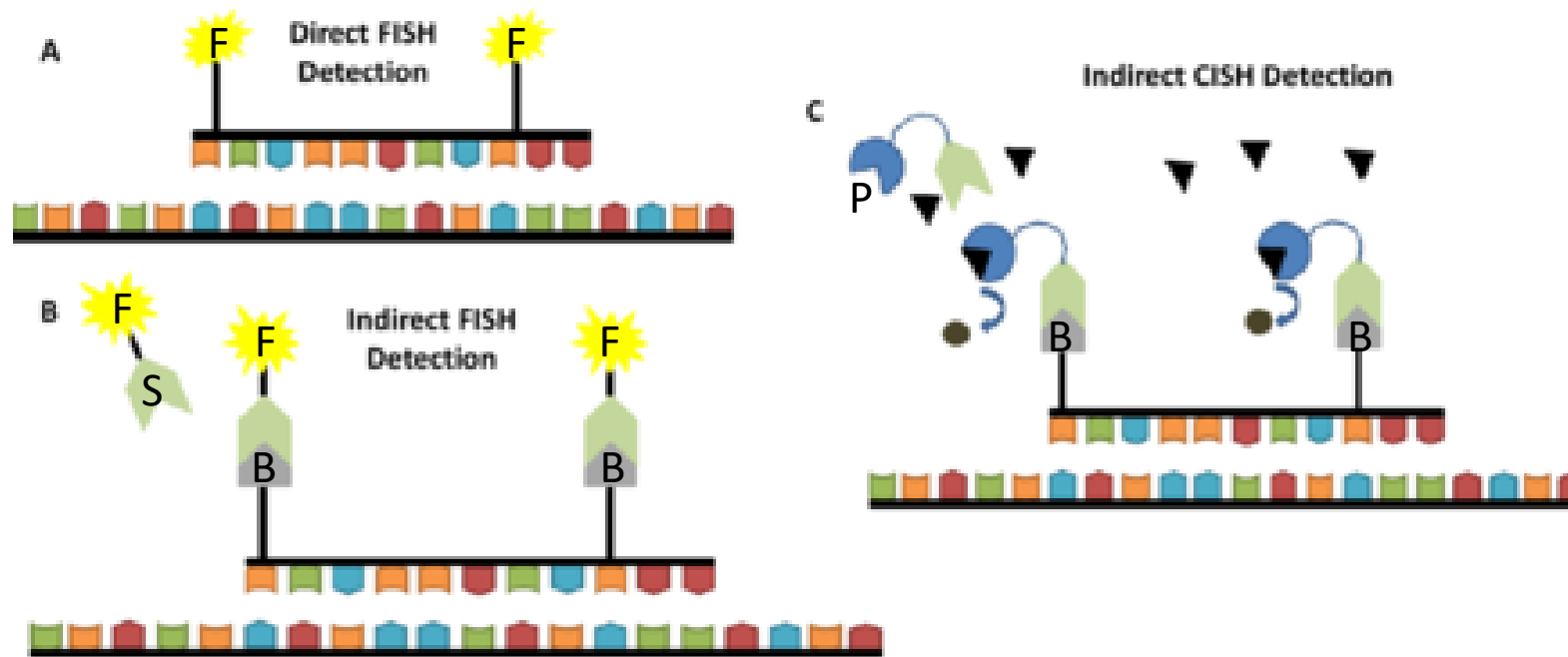
Renaturation par refroidissement lent



Principe de l'HIS



Visualisation de l'hybridation



F : Fluorochrome

B : Biotine

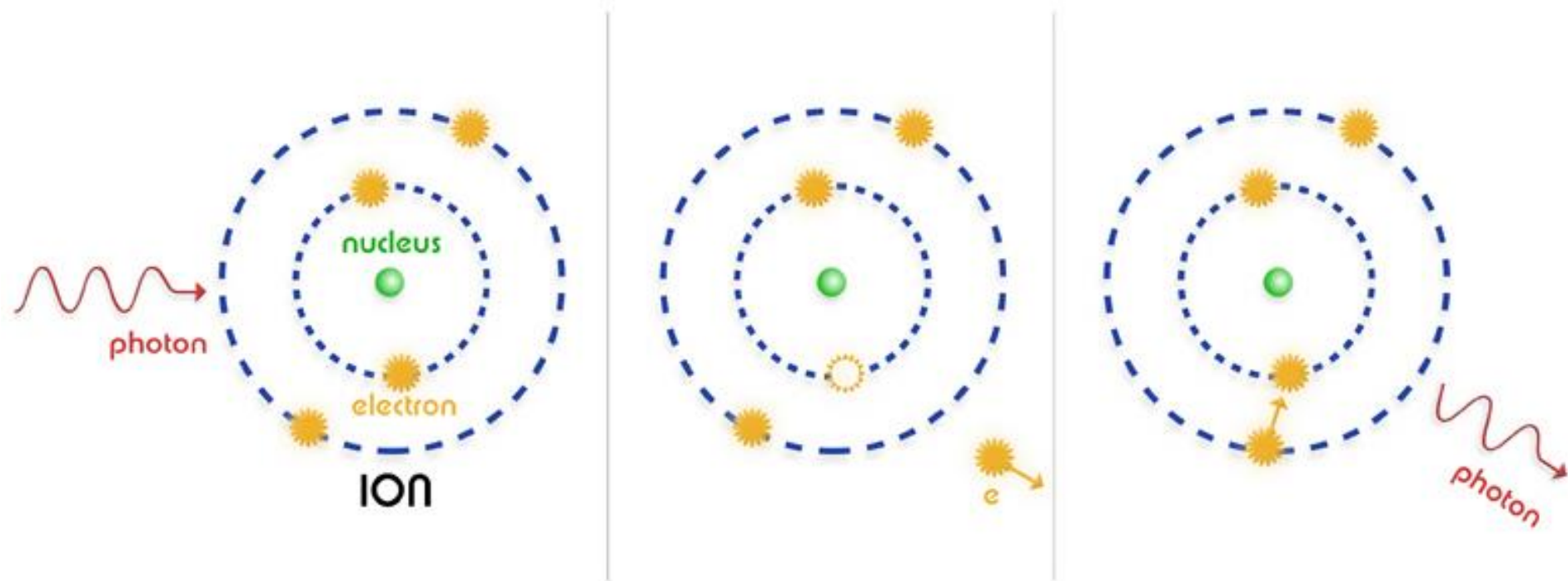
S : Streptavidine

P : Peroxydase

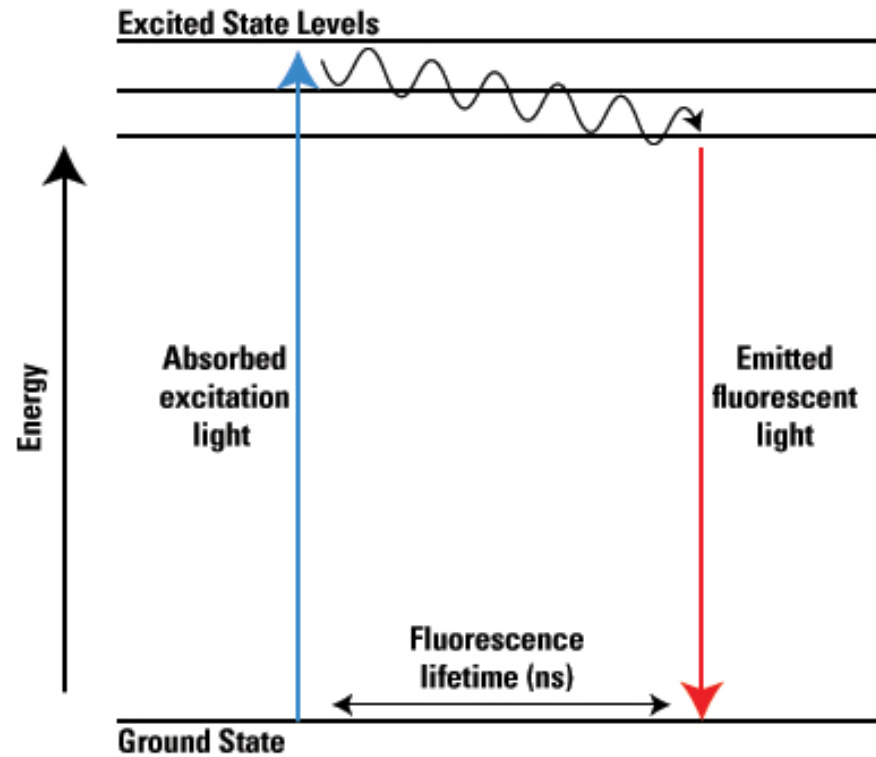
Visualisation de l'hybridation

Microscope fluorescence

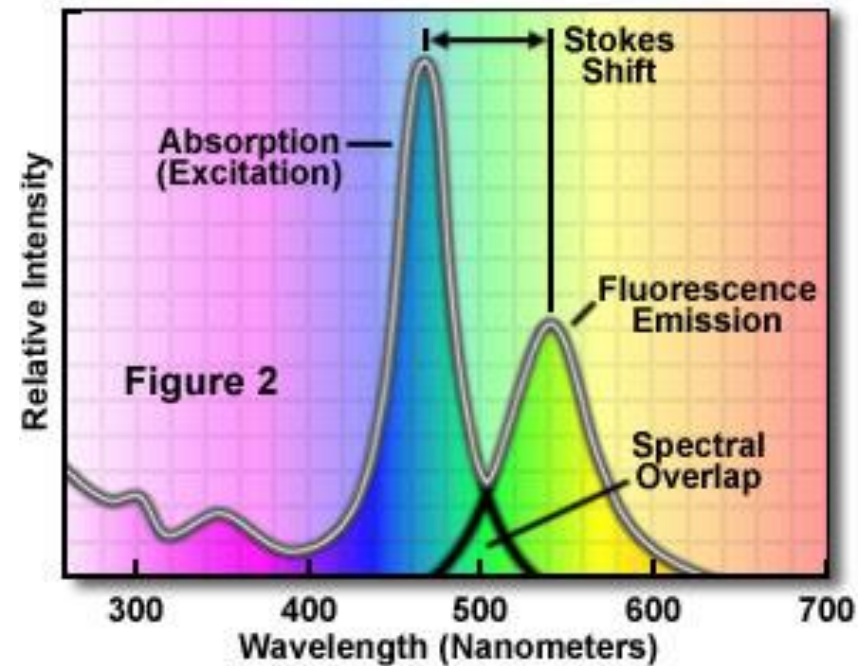
Fluorescence



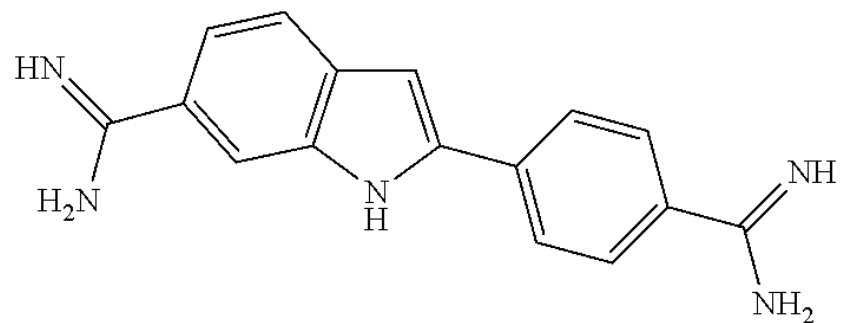
Fluorescence



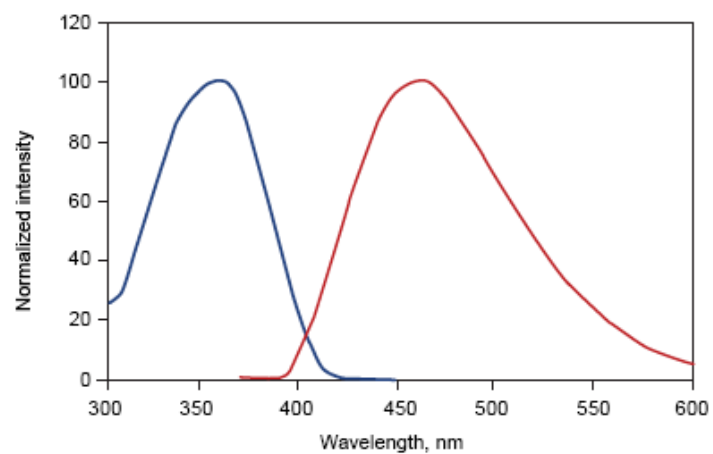
Excitation and Emission Spectral Profiles



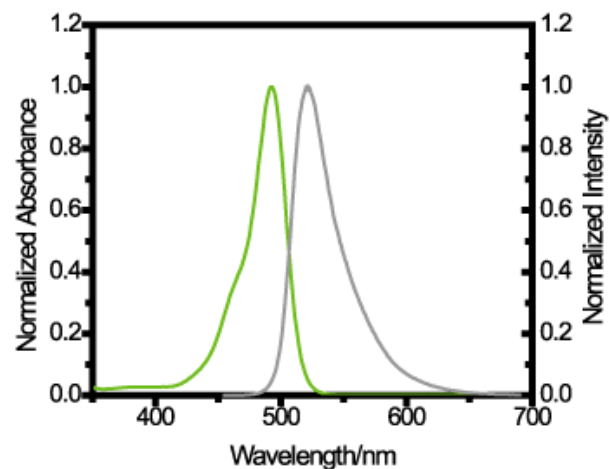
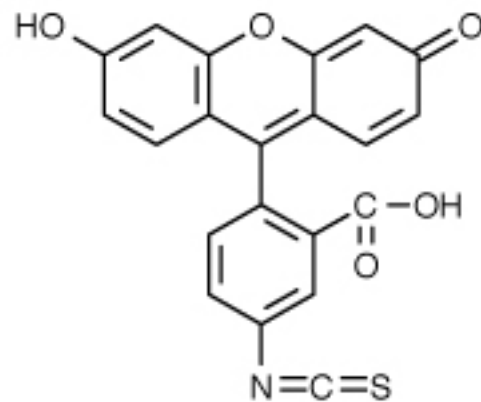
DAPI



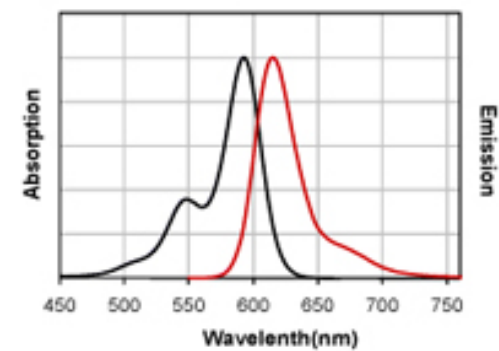
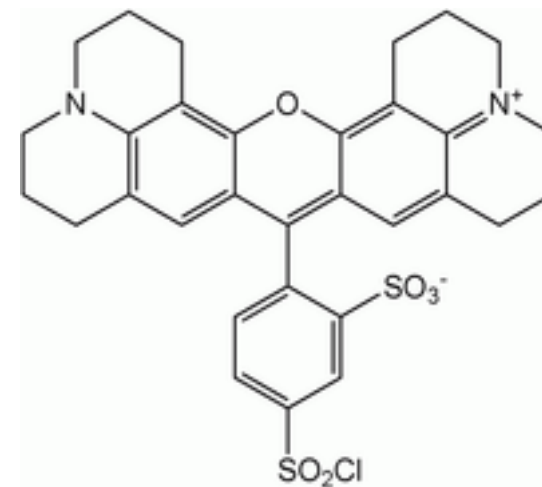
DAPI



FITC

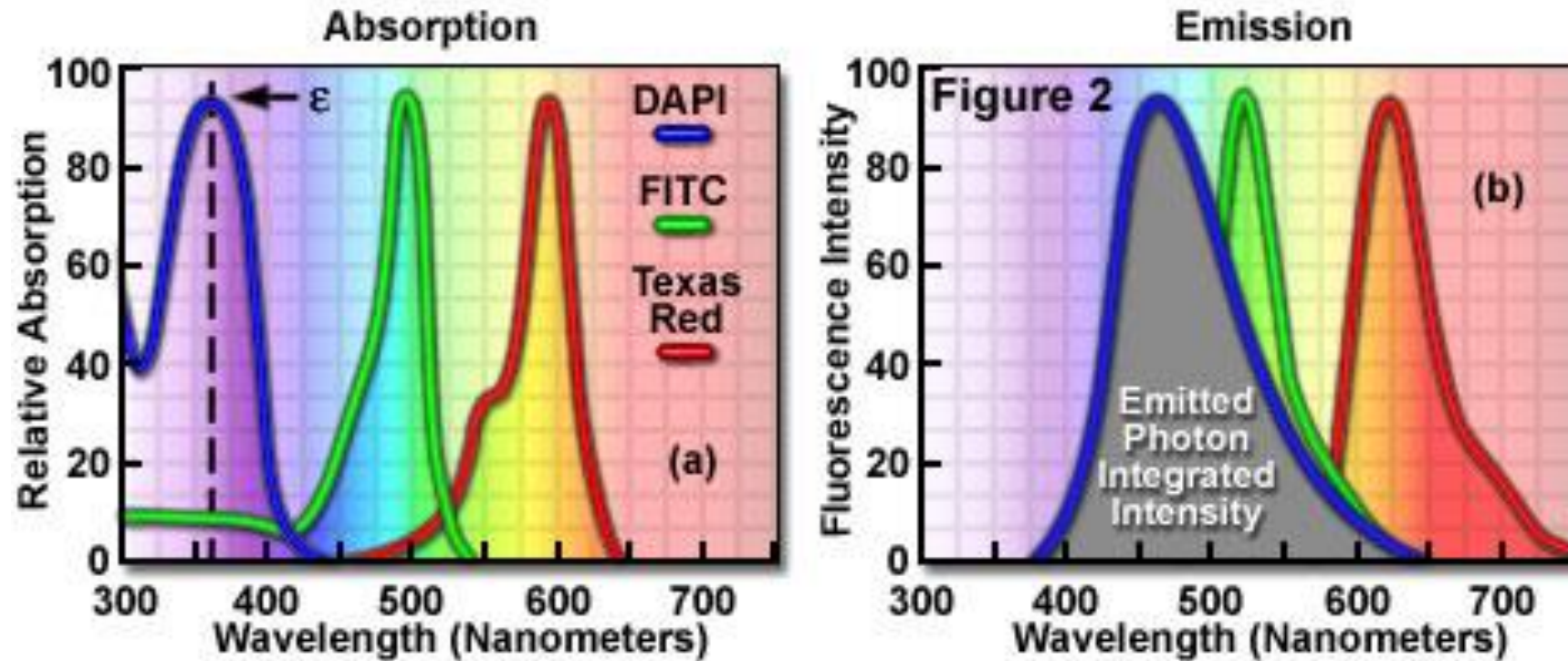


Texas Red

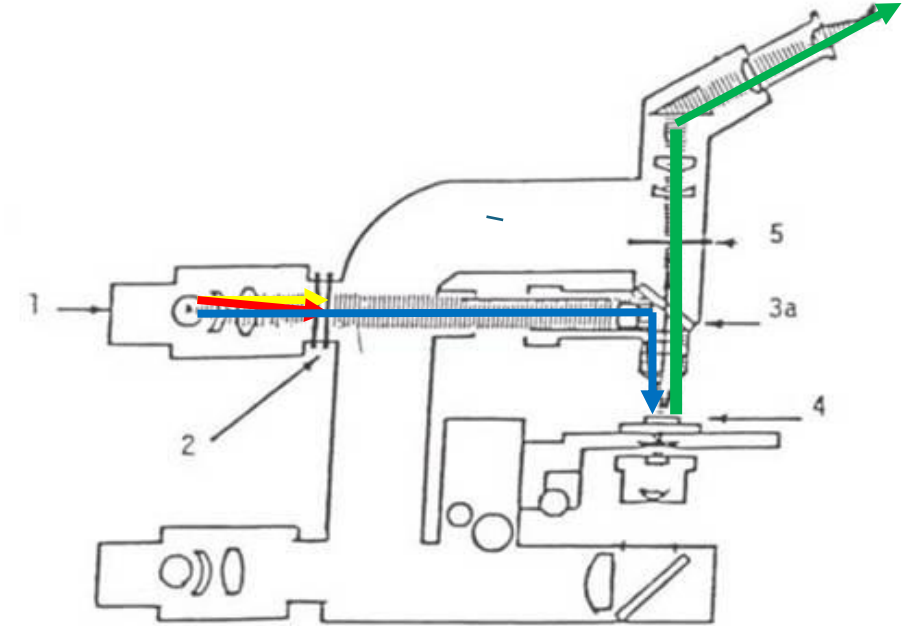


Spectres émission/absorption

Spectral Profiles of Popular Traditional Fluorophores



Microscope pour la FISH



- 1- Source lumineuse
- 2- Filtre d'excitation
- 3a- Miroir dichroïque
- 4 - Préparation
- 5 - Filtre d'arrêt UV

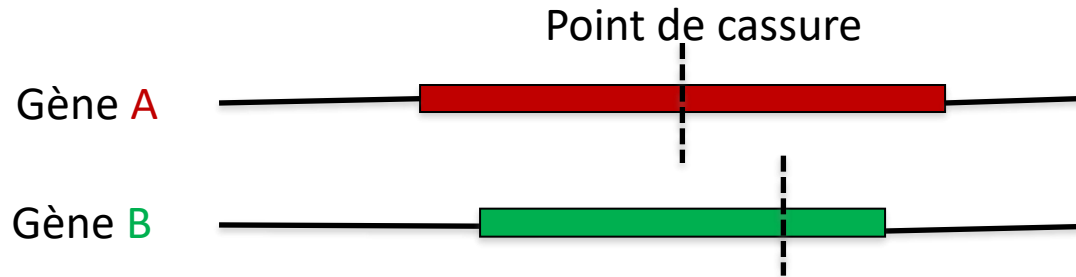
Les sondes de FISH

- Directement couplées à un fluorochrome (Cy3, TR, FITC) ou marquées
- Sondes satellites (CEP ou Chromosome enumeration probes) : sonde DNA de séquences hautement répétées, principalement dans les centromères
- Sondes spécifiques d'un locus (LSI ou Locus specific identifier)

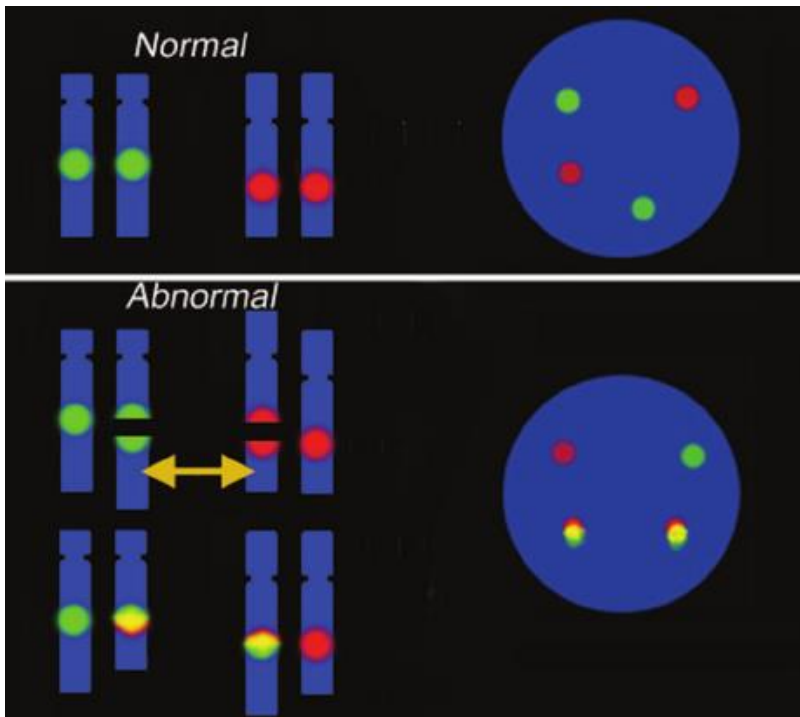
Types de sondes pour HIS

- Sondes de fusion
- Sondes de séparation (« split signal » ou « break-apart »)
- Sondes centromériques

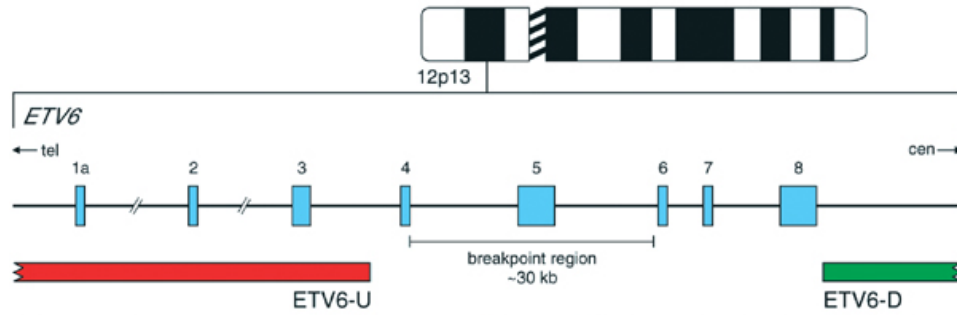
Sondes de fusion



- Principe :
 - 2 sondes de 2 couleurs différentes qui s'hybrident à leur locus respectifs **A** et **B** situés sur 2 chromosomes différents
- Intérêt : détection de translocation
- Nécessite de connaître le partenaire

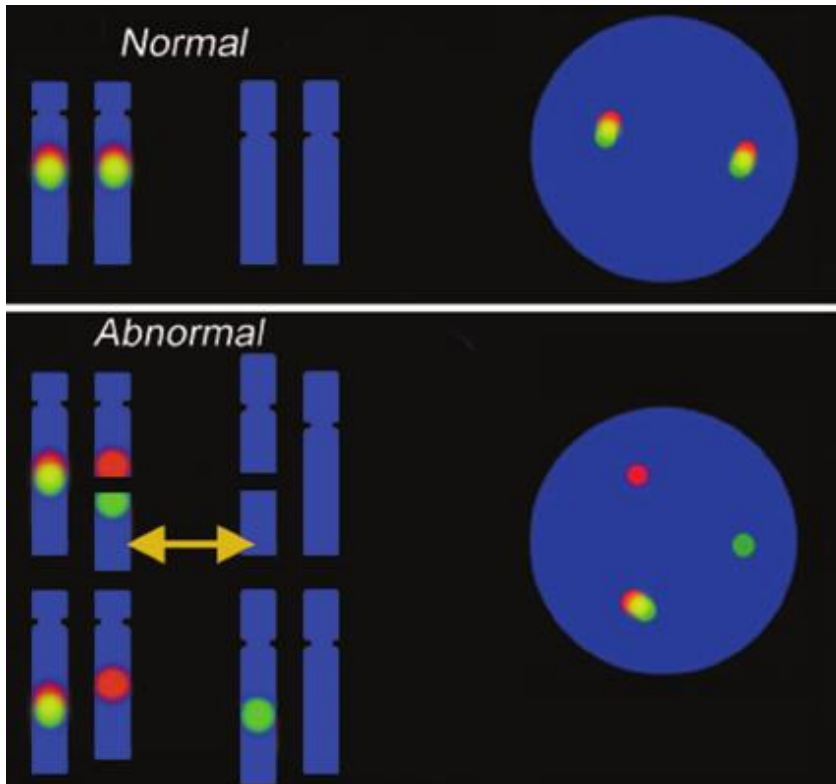


Sondes de split



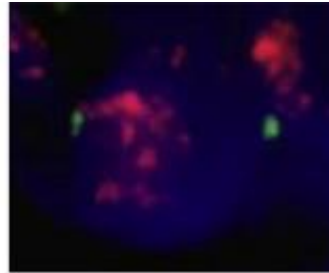
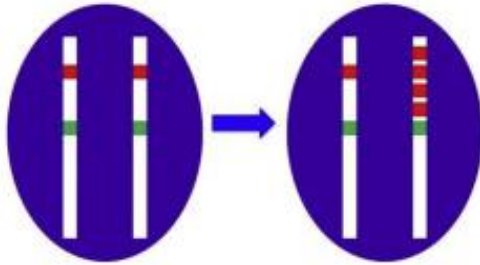
- Principe :

- 2 sondes de 2 couleurs différentes qui flanquent la région de cassure du gène d'intérêt
- Intérêt : détection de translocation
- Ne nécessite pas de connaître le partenaire
- Interprétation plus facile

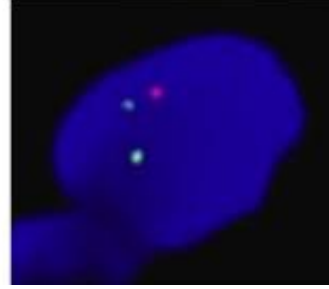
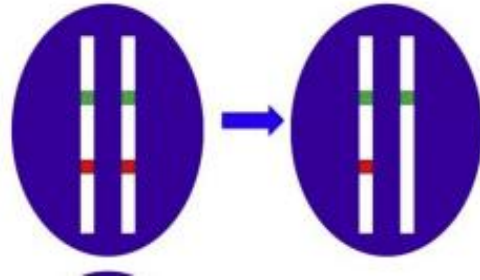


Sondes centromériques

d. Amplification



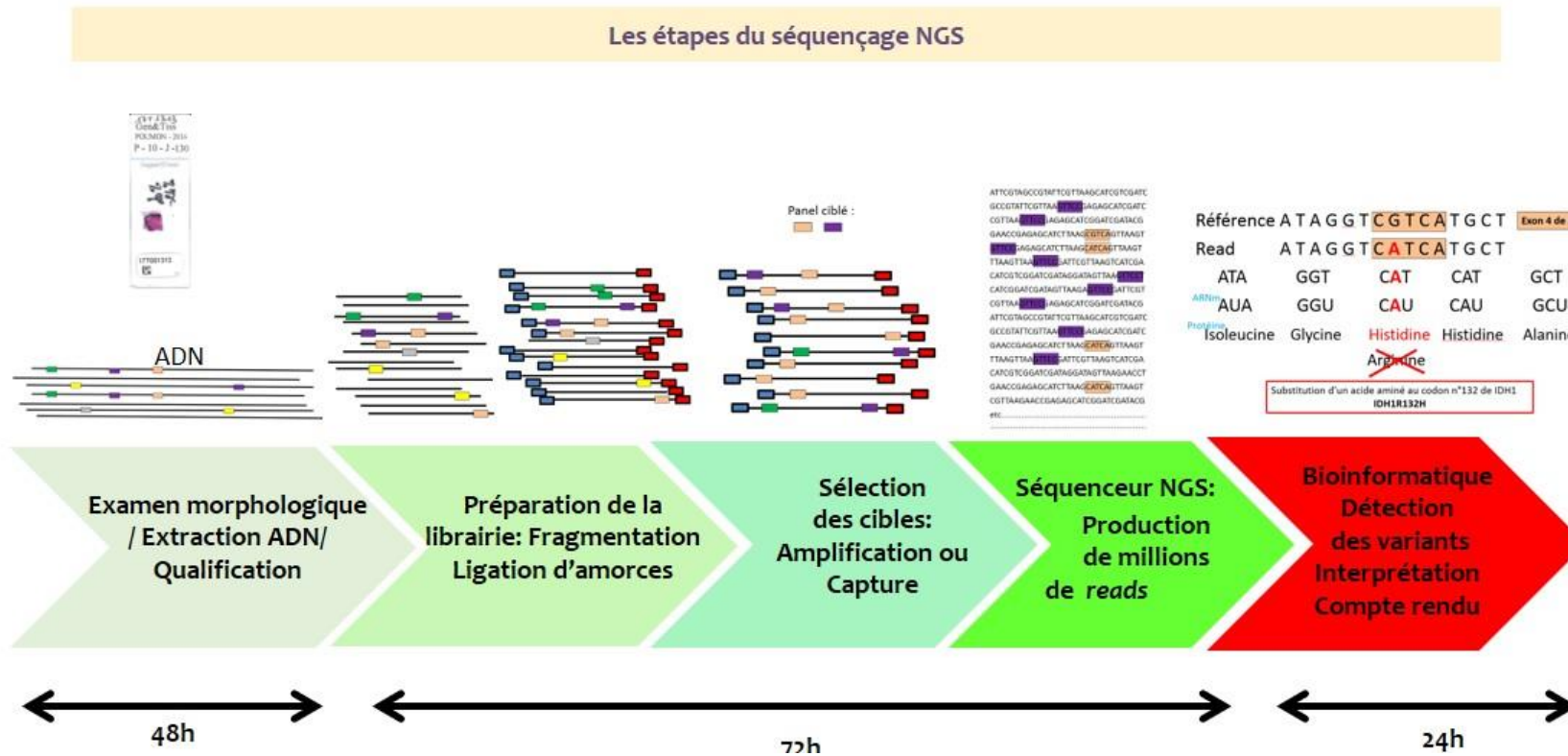
e. Deletion



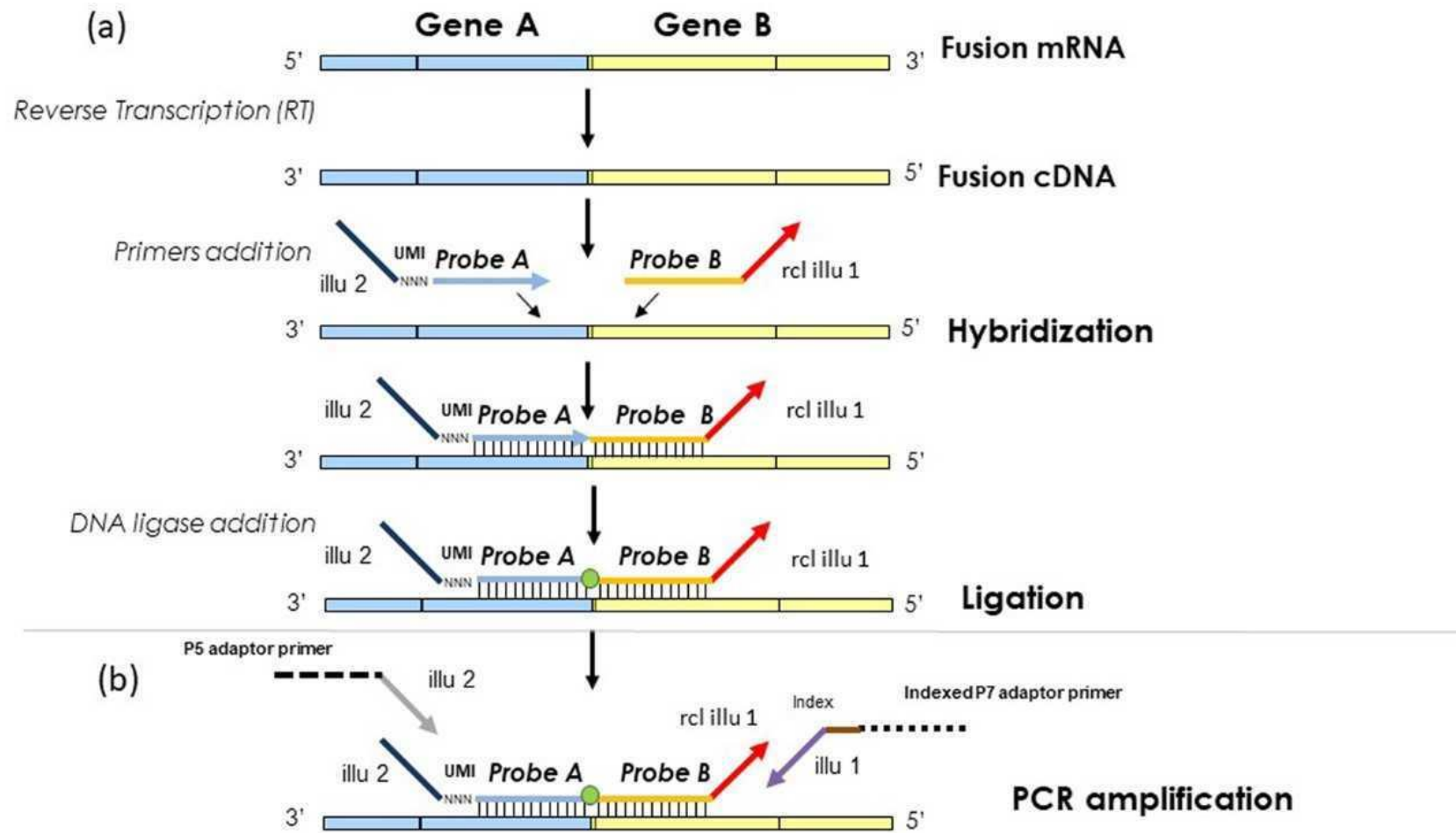
- Principe :

- 2 sondes de 2 couleurs différentes :
 - L'une sur le centromère
 - L'autre sur le gène d'intérêt
- Intérêt : détection une amplification ou une délétion
- Interprétation longue pour les amplifications car il faut compter les signaux de chaque couleur pour faire un ratio

NGS pour la détection des anomalies moléculaires



NGS pour la recherche de transcrits de fusion

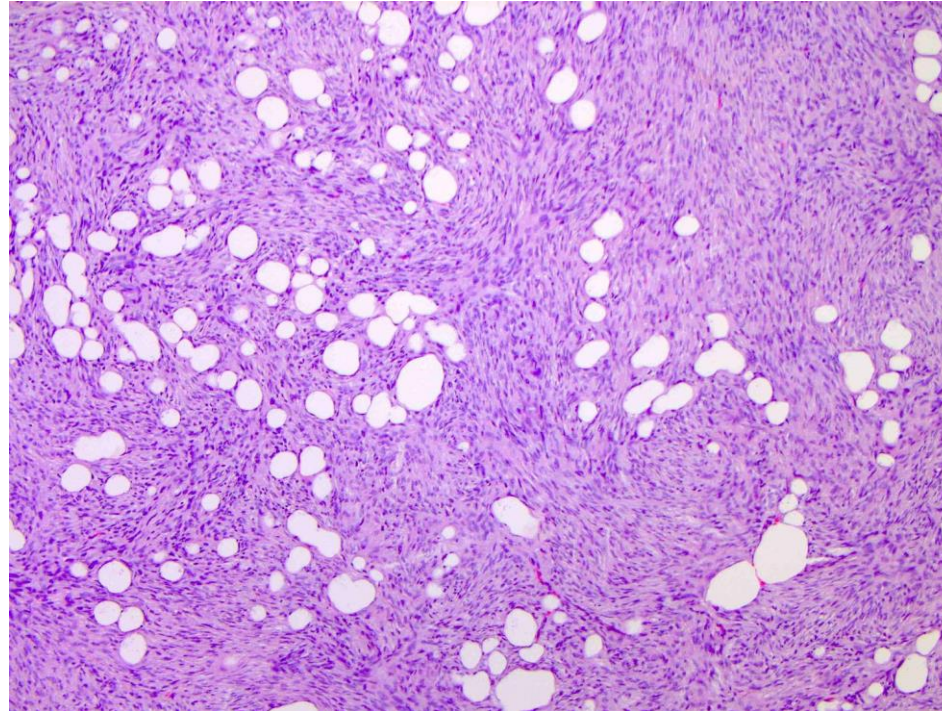




Exemples pratiques de diagnostic de tumeurs des tissus conjonctifs

Cas clinique 1 : Dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand

- Tumeur conjonctive cutanée à malignité intermédiaire (risque important de récurrence locale mais métastases rares)

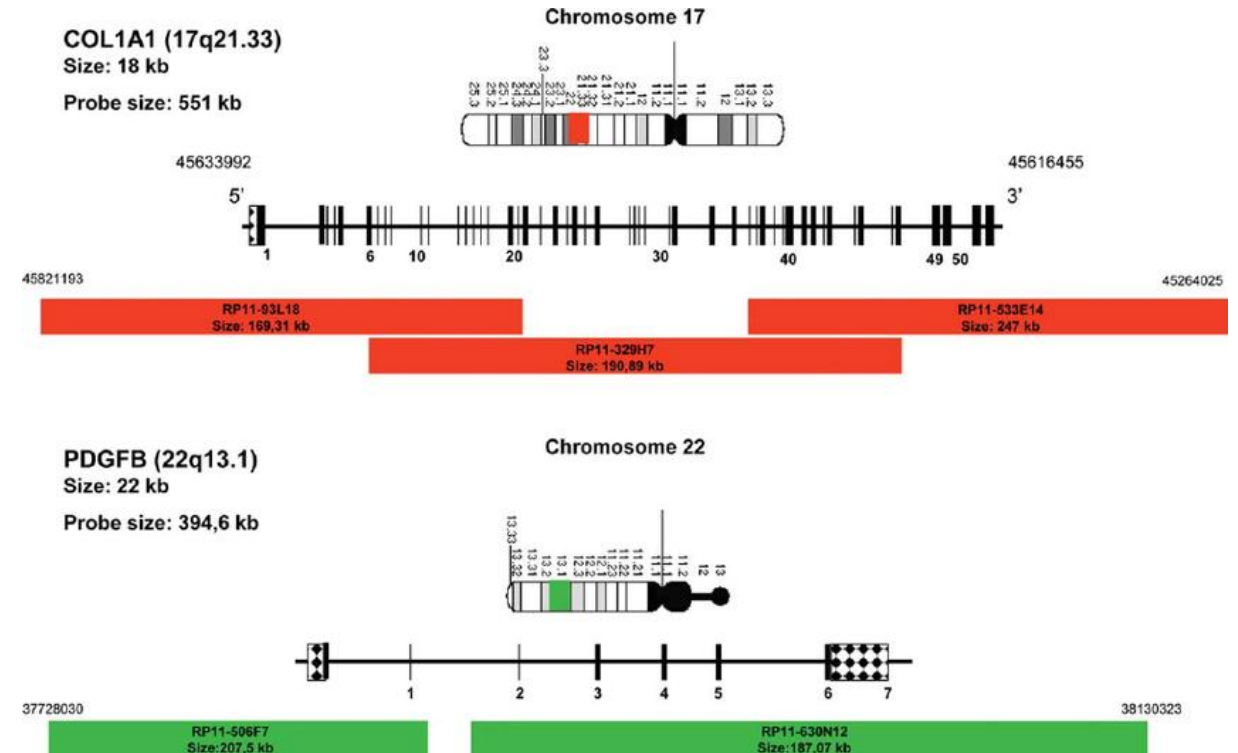


Caractérisée par une
translocation
PDGFR :: COLA1A

**Quelle technologie
allez-vous utiliser?**

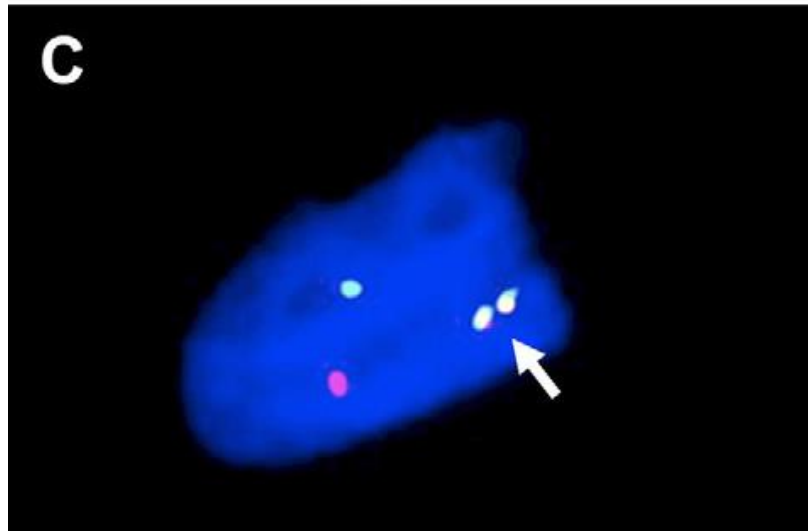
FISH Dual-Fusion

- Etudie la fusion des 2 gènes partenaires
- On connaît le partenaire et les points de cassure

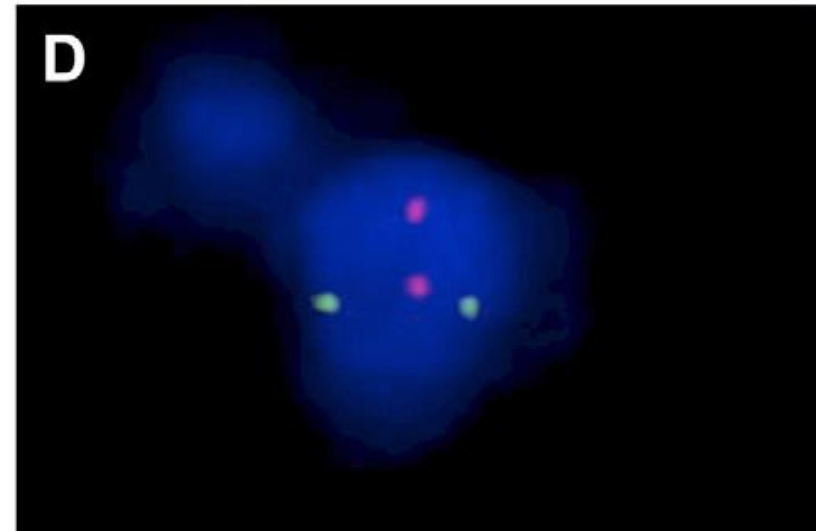


FISH Dual-Fusion : DFSP

- Translocation PDGFR-COLA1A
- Formation de chromosomes en anneau



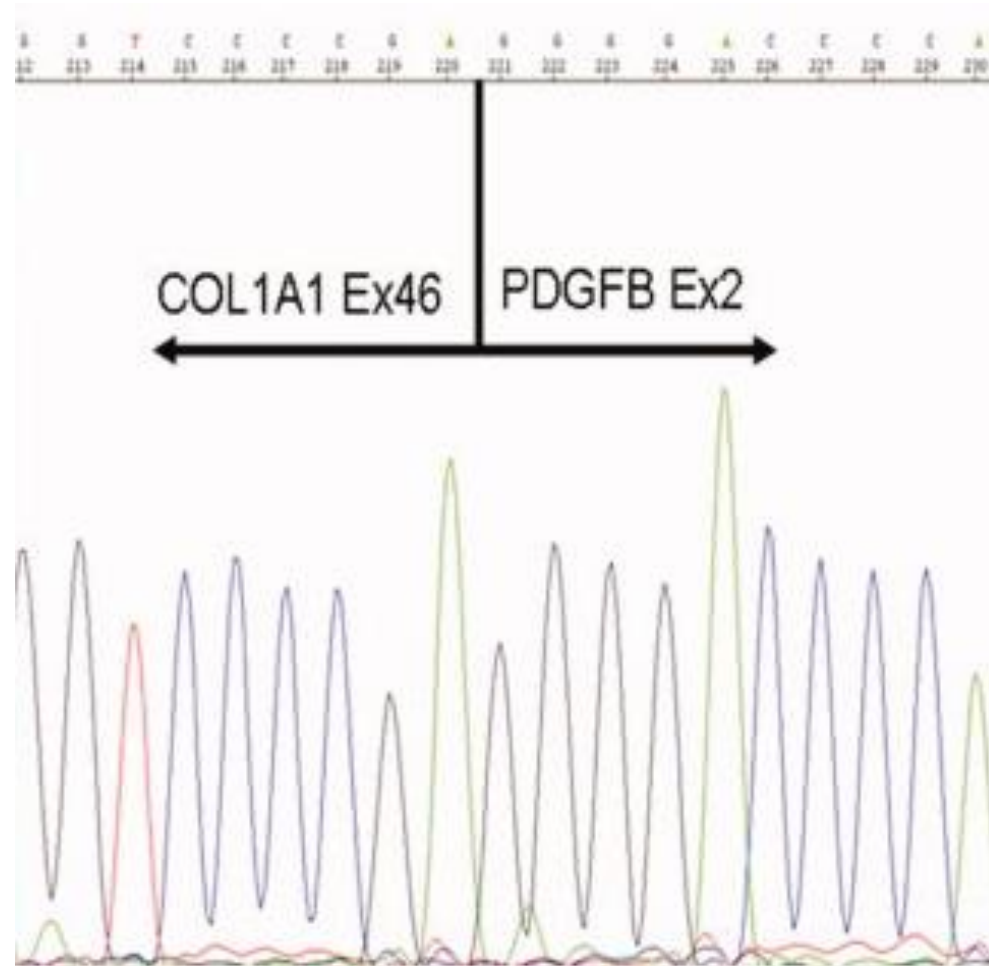
Translocation présente



Pas de réarrangement

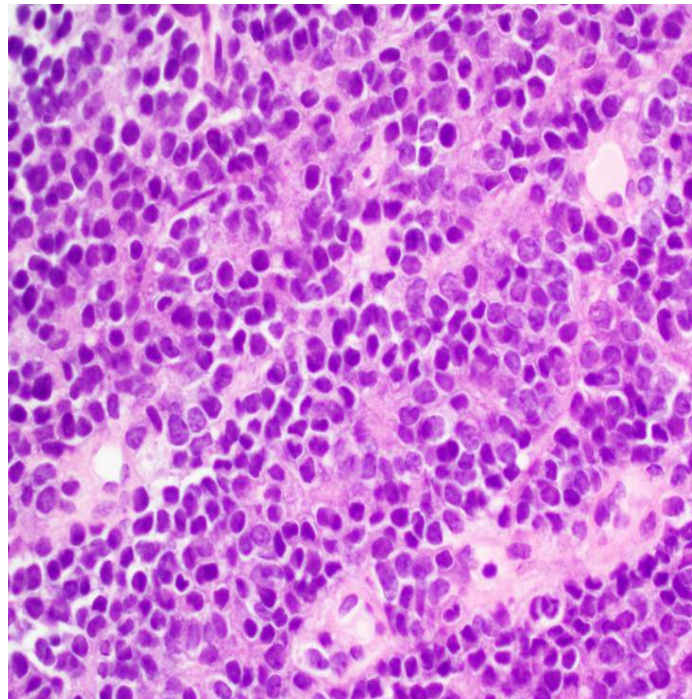
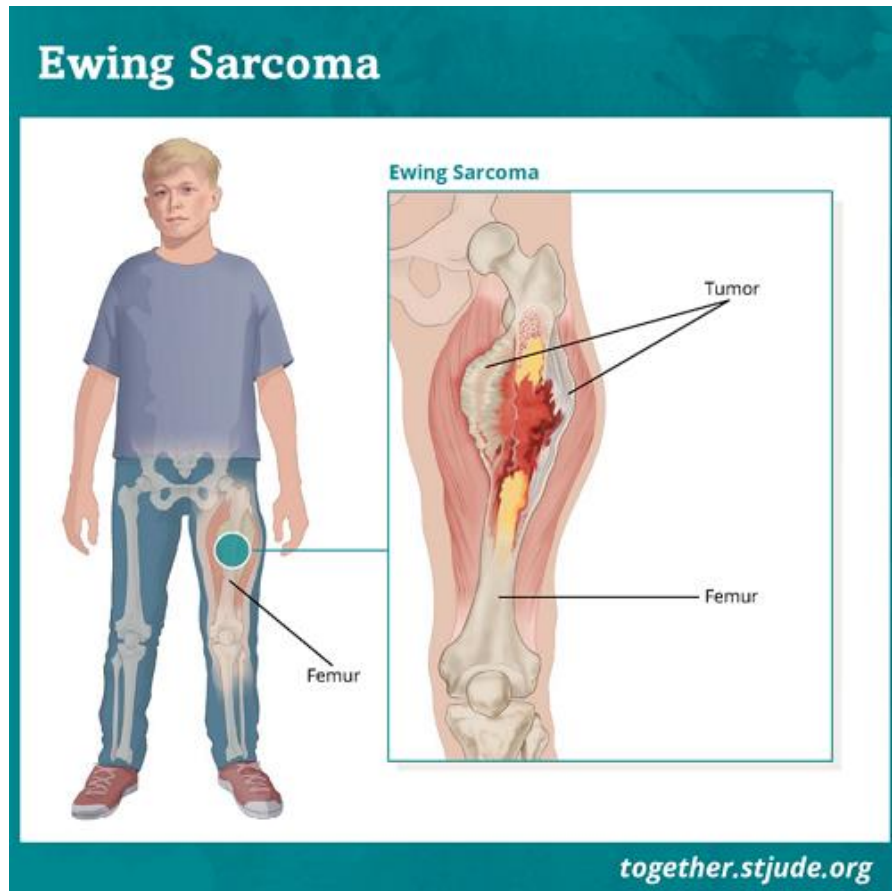
FISH Dual-Fusion : DFSP

- Confirmation par rtPCR de la translocation



Cas clinique 2 : Sarcome d'Ewing

- Tumeur conjonctive maligne des os de l'enfant



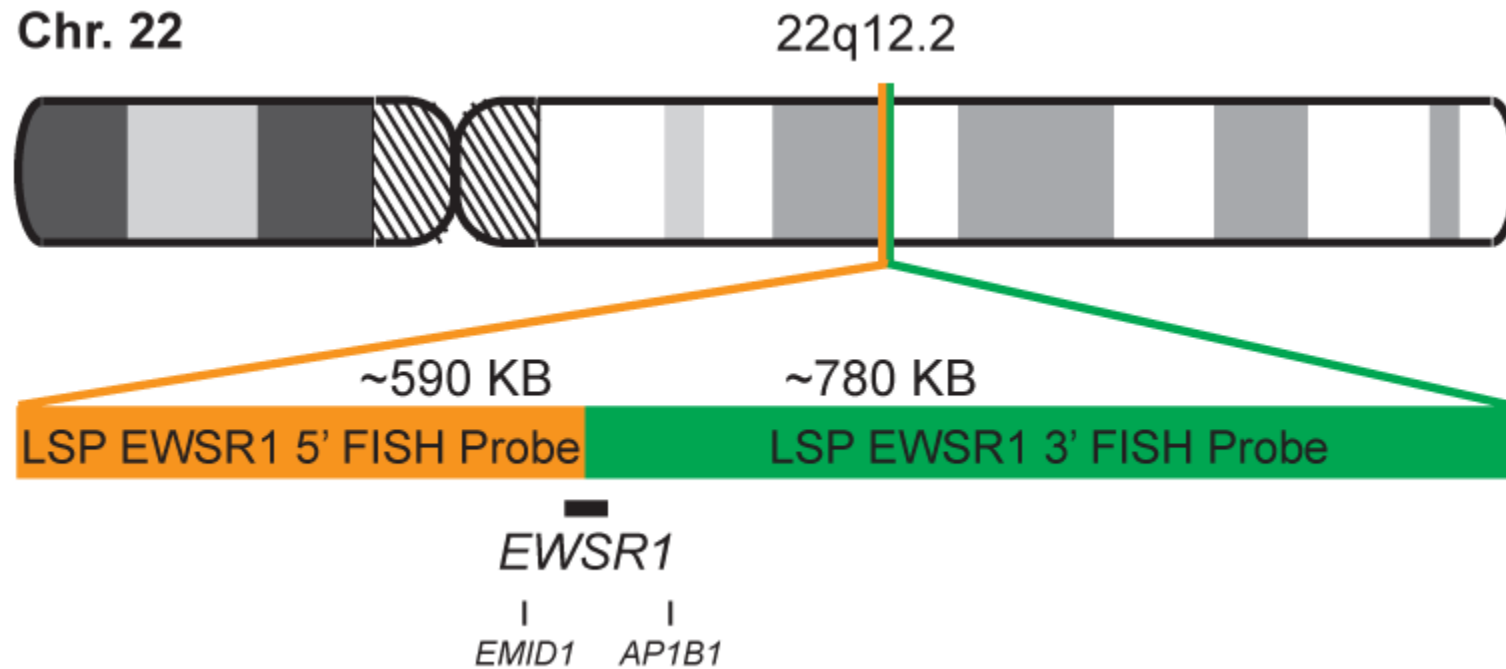
Caractérisée par une translocation impliquant le gène EWSR1

Quelle technologie allez-vous utiliser?

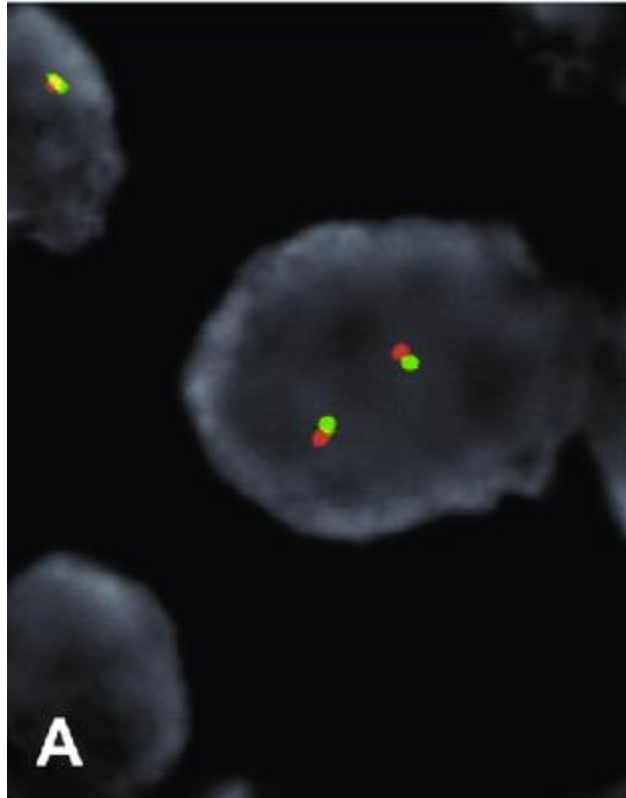
Translocation : Break-Apart

- La plus fréquemment utilisée, la plus facile à lire
- Etudie un seul des 2 gènes partenaires, le plus souvent impliqué dans la translocation
- On ne connaît pas le partenaire
- Utile pour les partenaires multiples ou points de cassure non constants.
- Moins de risque de faux positif

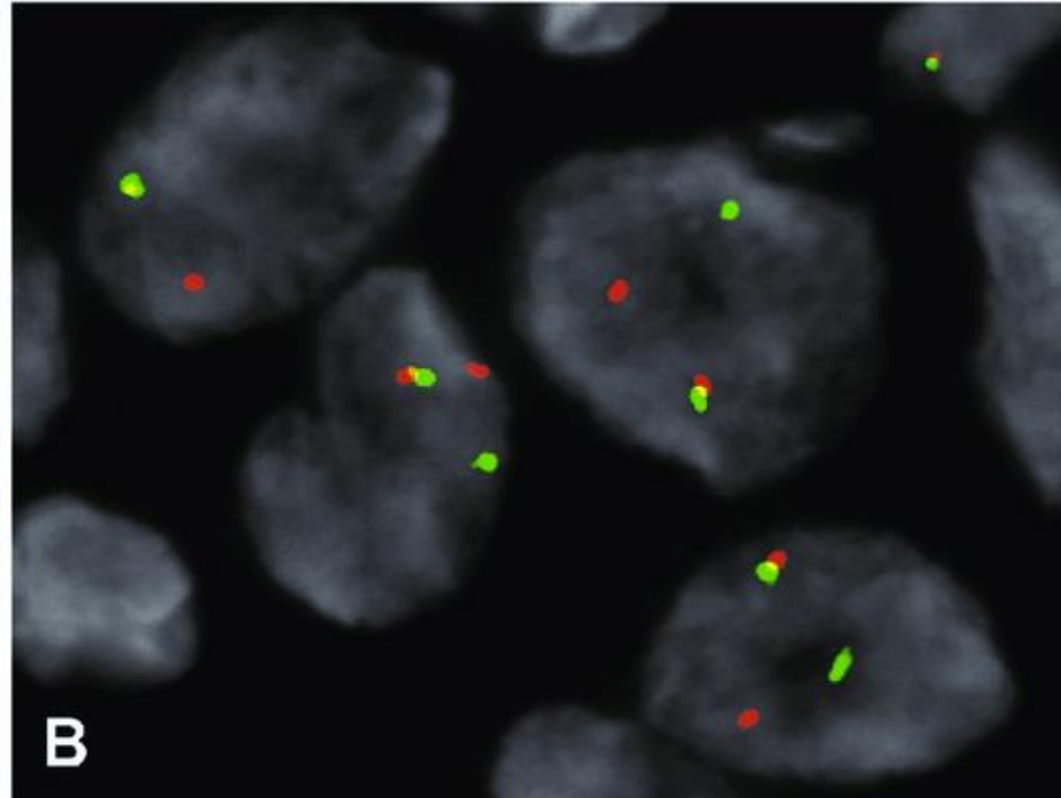
FISH EWSR1-BA



FISH EWSR1-BA



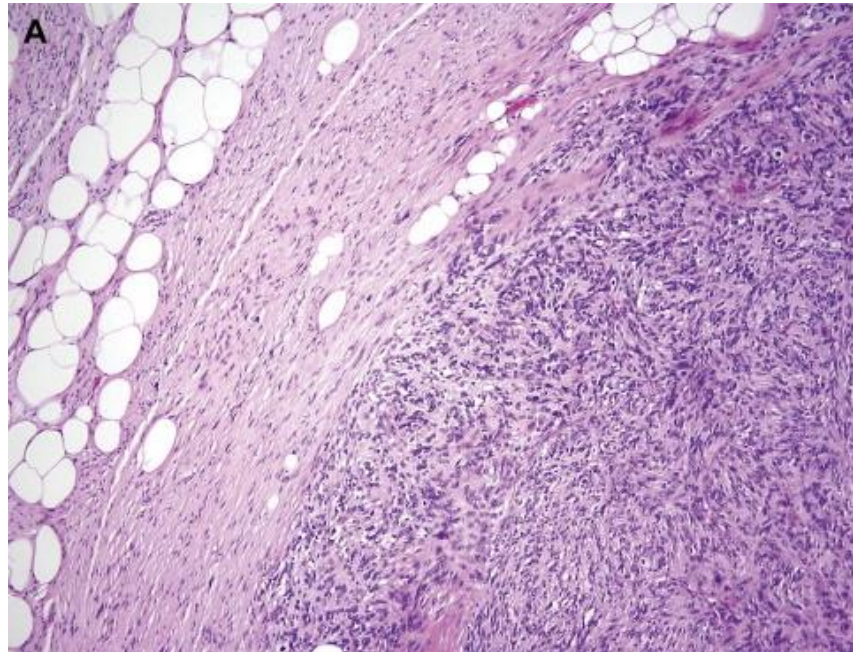
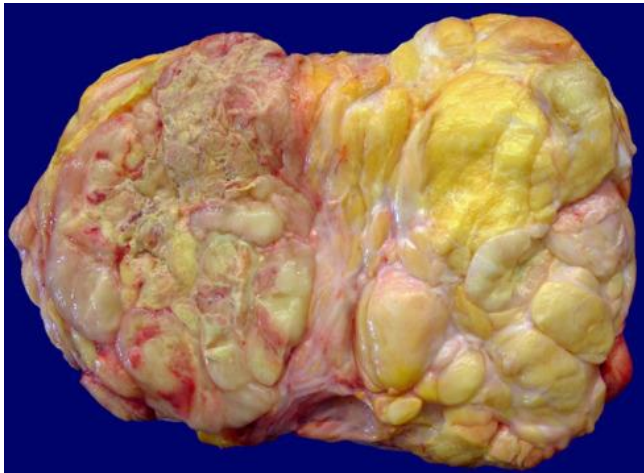
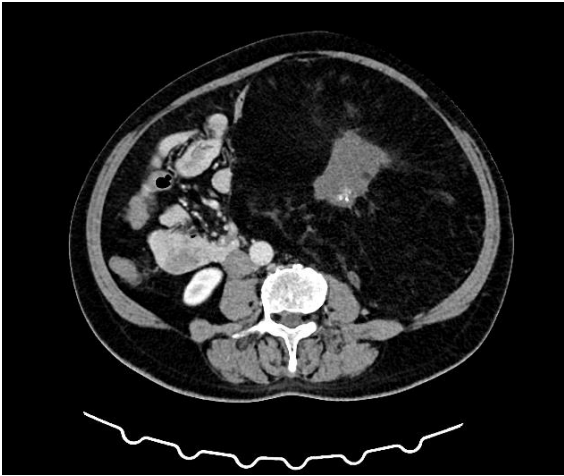
Pas de réarrangement



Réarrangement de EWSR1

Cas clinique 3 : Liposarcome peu différencié

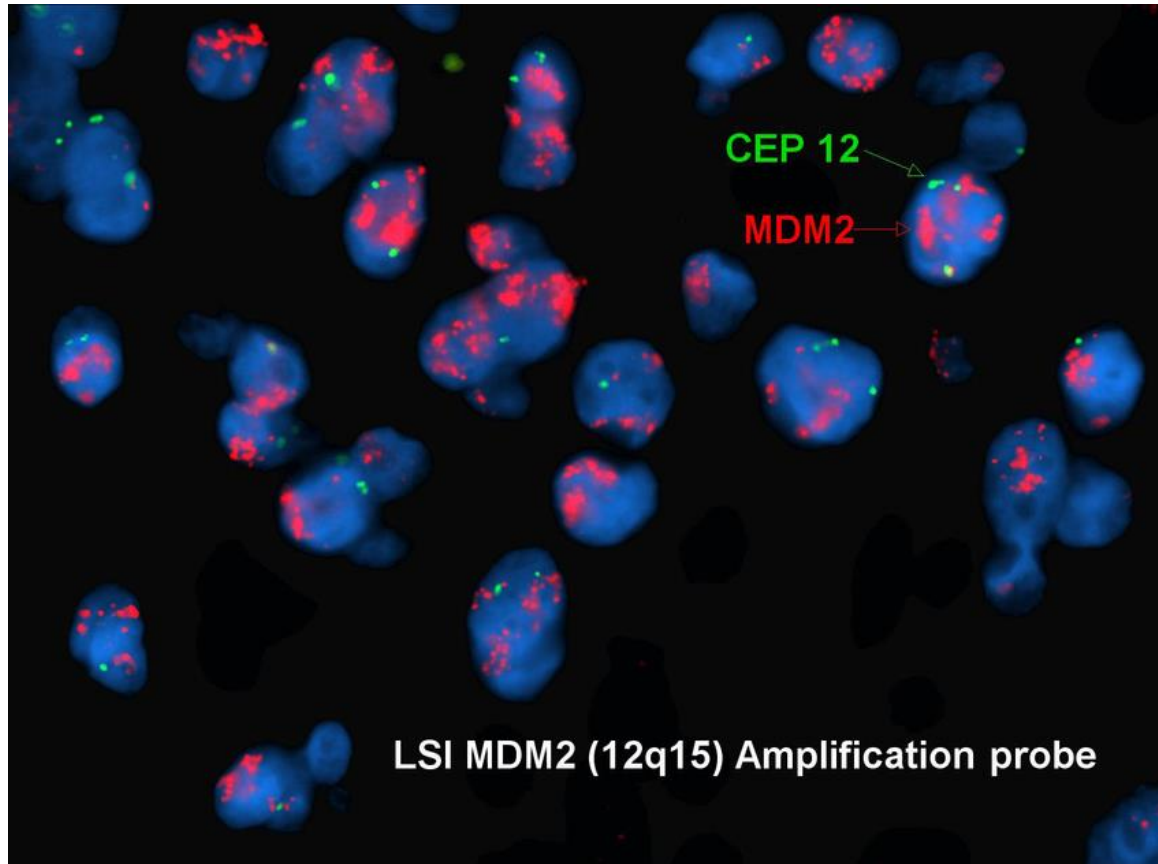
- Tumeur conjonctive maligne du rétropéritoine



Caractérisée par une
amplification du gène
MDM2

**Quelle technologie
allez-vous utiliser?**

Amplification : FISH centromérique, CGH, etc.



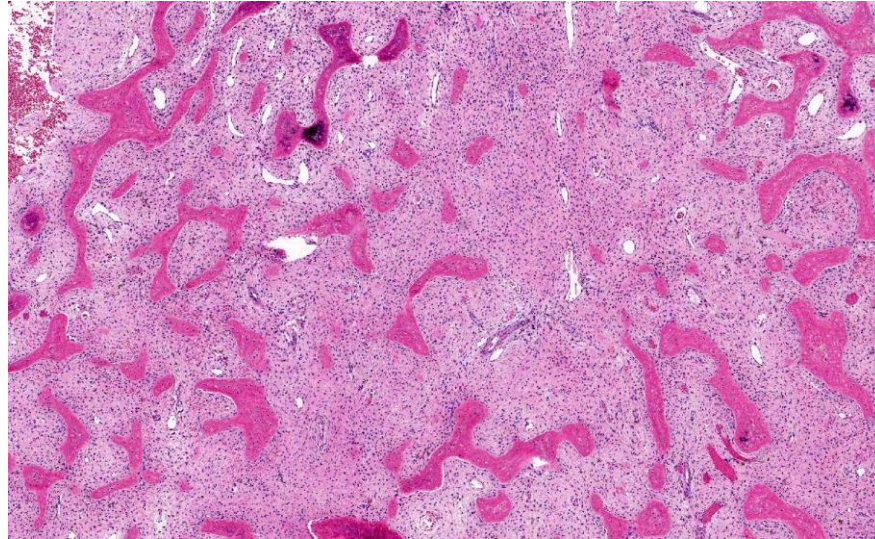
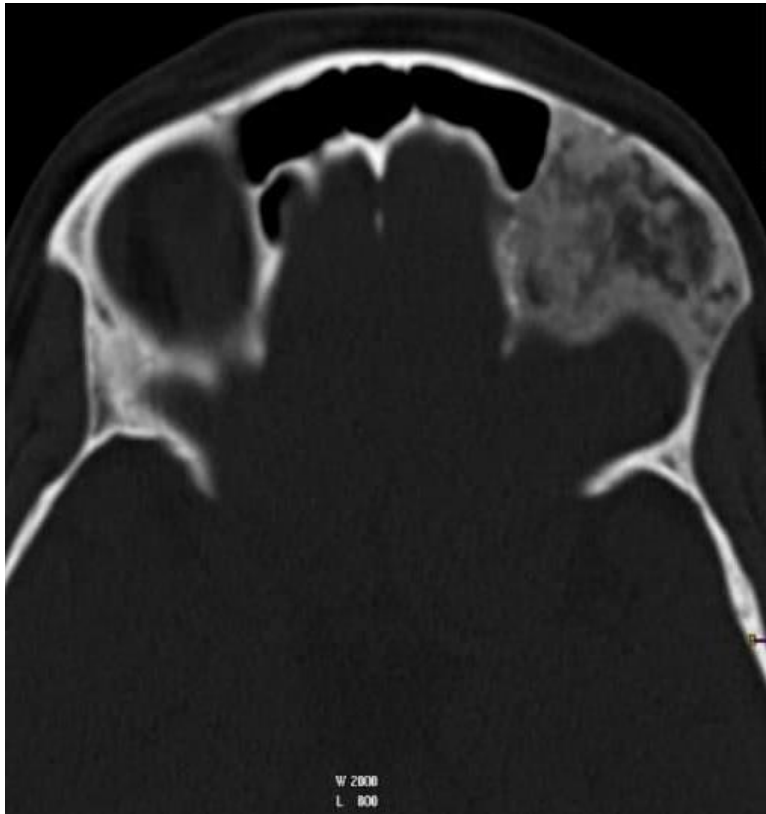
Amplification de MDM2



Pas d'amplification

Cas clinique 4 : Dysplasie fibreuse

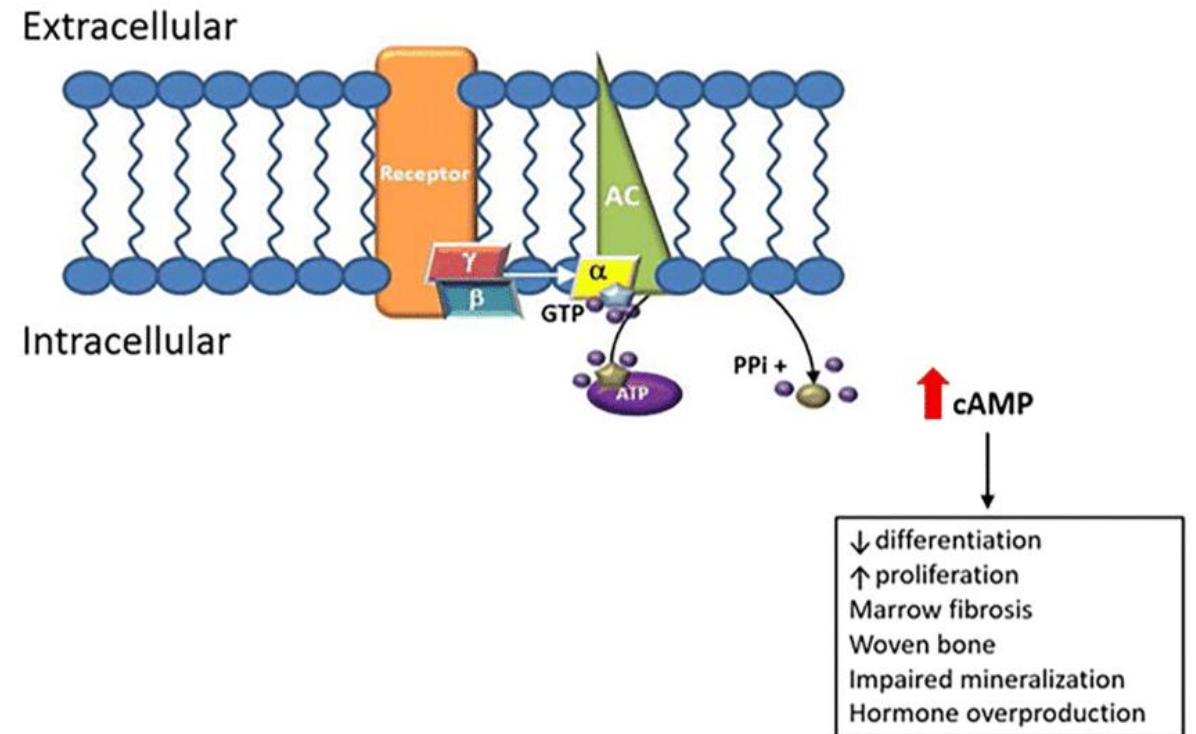
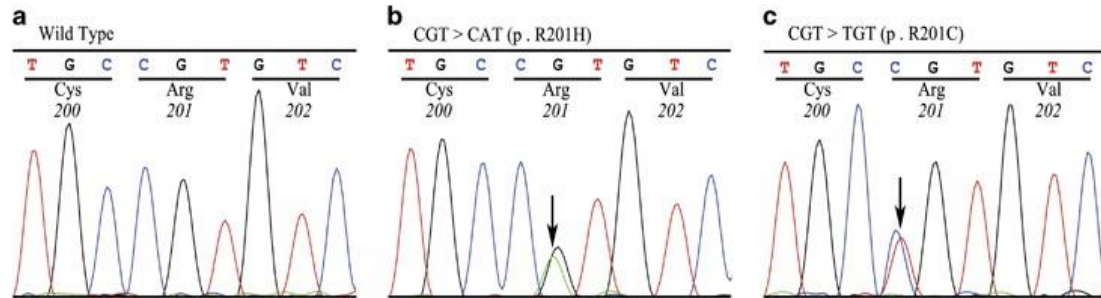
- Tumeur osseuse bénigne peut toucher tous les os



Caractérisée par une mutation du gène GNAS

Quelle technologie allez-vous utiliser?

Mutation : séquençage par PCR/NGS





En synthèse

Tumeurs des tissus conjonctifs

- Grande famille de tumeurs : bénignes, à malignité intermédiaire, malignes
- Concept de malignité locale
- Concept de maladie avec de nombreuses tumeurs : suffixe « matose »
- Souvent associées à la survenue d'une anomalie moléculaire spécifique utile pour le diagnostic et +/- pour le traitement



Je vous remercie

