



Une étude des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse et le traitement des fibromatoses agressives

Armelle Dufresne

► To cite this version:

Armelle Dufresne. Une étude des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse et le traitement des fibromatoses agressives. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10082 . tel-01058194

HAL Id: tel-01058194

<https://theses.hal.science/tel-01058194>

Submitted on 26 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

THESE

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 Août 2006)

présentée et soutenue publiquement

par

M^{elle} Armelle Dufresne

Le 6 Juin 2014

Une étude des voies de signalisation impliquées dans la
carcinogénèse et le traitement des fibromatoses agressives

Directeur de thèse : Pr Jean-Yves Blay

JURY

Mr Jean-Michel COINDRE, Président
Mr Jean-Yves BLAY
Mr Charles DUMONTET
Mr Jean-Emmanuel KURTZ
Mme Florence PEDEUTOUR, Rapporteur
Mr Eric RAYMOND, Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Yves BLAY, qui, par son intelligence, la confiance sans faille avec laquelle il nous confie des projets et la richesse des portes qu'il nous ouvre nous mène bien plus loin que ce que l'on aurait jamais pu imaginer, qu'il trouve ici l'expression de ma sincère amitié et de ma profonde gratitude,

A Madame le Professeur Florence PEDEUTOUR et Monsieur le Professeur Eric RAYMOND, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de prendre de leur précieux temps pour juger mon travail et l'enrichir de leurs remarques et conseils en tant que rapporteurs, qu'ils soient assurés de mon entière reconnaissance,

A Messieurs les Professeurs Jean-Michel COINDRE, Charles DUMONTET et Jean-Emmanuel KURTZ, qui ont accepté d'examiner et d'évaluer cette thèse, et à l'expertise desquels soumettre mon travail est certainement un peu stressant mais sera forcément très enrichissant, qu'ils en soient profondément remerciés.

Ce travail a été possible car soutenu financièrement par l'Institut National du Cancer que je tiens à remercier vivement.

A tous les membres de l'équipe 11 du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon pour leur accueil et leur soutien non seulement scientifique mais surtout amical, pour la finesse constante des blagues fusant dans l'*open space*, pour avoir remis à jour mes compétences musicales en pièce de culture, pour ne s'être jamais moqué des décès cellulaires massifs constatés dans mes boîtes de culture....

A ma famille, à mes amis, à toi, et à mes 3 petits, qui n'ont pas souvent vu leur maman à la sortie de l'école ces derniers temps mais qui, j'espère, comprendrons un jour que l'aboutissement de ce travail représente surtout un choix délibéré de vie, d'orientation de carrière, qui, loin d'être le plus simple mais soutenu par les bonnes personnes, est arrivé à terme, porteur d'épanouissement et de confiance personnels.

Liste des abréviations et anglicismes

ABL	Abelson
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide Ribonucléique
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
β-TrCP	Beta-Transducin repeat Containing Protein
CAST	Competitive Allele Specific Taqman
CCND1	Cyclin D1
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CK1 α	Casein Kinase 1 α
CSMD1	CUB and Sushi Multiple Domains 1
COX 2	Cyclo-oxygenase 2
CSF R	Colony Stimulating Factor Receptor
E2	Estrogènes
ESMO	European Society of Medical Oncology
FA	Fibromatose Agressive
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor
FZD	Frizzled
GIST	Gastro-Intestinal Stromal Tumor
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
IHC	Immuno-histo-chimie
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LHRH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LKB1	Liver Kinase B1
MCR	Minor Cluster Region
miRNA	Micro ARN
NF2	Neurofibrome 2
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NRCAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
PAF	Polypose Adénomateuse Familiale
PBMC	Peripheral Blood Monocyte Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet-derived Growth Factor Receptor
Pet scan	Tomography par Emission de Positrons
PGE2	Prostaglandine
PI3K	Phospho-inositol 3 Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Rb	Rétinoblastome
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RE	Récepteur aux Estrogènes
RMS	Rhabdomyosarcome
RPg	Récepteur à la Progestérone
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
KO	Knock Out
SUV	Standardized Uptake Value
TCF	T-cell Factor
TGF	Transforming Growth Factor
TMA	Tissue Micro Array
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Table des matières

Liste des figures et tableaux.....	7
Préambule.....	8
I. INTRODUCTION.....	10
A. Présentation.....	10
B. Prise en charge.....	13
1. Stratégie.....	13
2. Radiothérapie.....	15
3. Traitement médical.....	16
C. Facteurs pronostiques et prédictifs.....	20
D. Biologie des FA.....	23
1. Nature néoplasique des FA.....	23
2. Carcinogénèse : implication de la voie Wnt.....	27
3. APC.....	29
4. Beta-caténine.....	33
5. Cytogénétique.....	35
6. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques.....	35
II. TRAVAUX DE RECHERCHE.....	37
A. FACTEURS PRONOSTIQUES.....	37
1. Facteurs pronostiques cliniques.....	37
2. Facteurs pronostiques biologiques.....	43
B. FACTEURS PREDICTIFS.....	49
Identification de facteurs biologiques prédictifs de la réponse à l'imatinib mésylate dans les fibromatoses agressives.....	49
III. DISCUSSION.....	58
A. Evolution des concepts de prise en charge.....	58
B. Contribution de nos travaux à l'évolution de ces concepts.....	59
1. Facteurs pronostiques cliniques.....	60
2. Facteurs pronostiques biologiques.....	60
3. Facteurs prédictifs.....	60
C. Les limites de notre travail.....	61
D. Propositions stratégiques.....	62
1. Stratégie clinique.....	62
2. Stratégie de recherche biologique.....	63
IV. CONCLUSION.....	65
Bibliographie.....	69
ANNEXES.....	81
Annexe 1 Liste des 138 "drivers genes" répertoriés par Vogelstein.....	81
Annexe 2 Publications présentées dans ces travaux.....	86
Résumé.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Répartition par sexe et tranche d'âge des diagnostics de FA en France actualisé au mois d'Août 2013 (données RRePS)	11
Figure 2 Images de scanner de FA, de la mandibule à gauche et abdominal à droite	12
Figure 3 Représentation schématique des modes évolutifs de FA (d'après Gronchi <i>et al.</i> 2013).....	12
Figure 4 Illustration photographique pré (à gauche) et post opératoire (à droite) d'une FA de la paroi abdominale	13
Figure 5 Schématisation de stratégie de prise en charge des patients atteints de FA proposée par Gronchi <i>et al.</i>	19
Figure 6 Schématisation de la voie Wnt/ β caténine en conditions physiologique (à gauche) et pathologique (à droite) (d'après T. Reya & H. Clevers, Nature 2005)	27
Figure 7 Représentation schématique de la protéine APC et des sites de mutations génétiques correspondant. APC comporte 2843 codons. La MCR se situe entre les codons 1286 et 1513 et regroupe la majorité des sites de mutation somatique	30
Figure 8 Taux de survie sans progression en fonction du sous-type de mutation CTNNB1 dans 3 études.....	45
Figure 9 Survie sans récurrence de 167 patients atteints de FA en fonction du statut du variant M541L de l'exon 10 de <i>KIT</i>	56
 Tableau 1 Etudes et séries rapportant les taux d'efficacité des chimiothérapies dans les FA	18
Tableau 2 Principaux résultats des études rétrospectives identifiant les facteurs prédictifs de récurrence après exérèse chirurgicale des FA (analyse multivariée).....	21
Tableau 3 Taux de survie sans récurrence en fonction du statut primitif ou récidivant de FA ...	22
Tableau 4 Expression des « marqueurs de malignité » en IHC	24
Tableau 5 Correspondance entre les sites de mutations germinale et somatique sur le gène APC.....	31
Tableau 6 Principales caractéristiques des modèles murins étudiant le rôle d'APC dans l'étiologie des FA. Adapté à partir de Fodde 2001 Nat Rev et Lips 2009	32
Tableau 7 Etude du caractère mutuellement exclusif des mutations de CTNNB1 et APC dans les FA sporadiques.....	34
Tableau 8 Fréquence et corrélation clinique des sous types de mutation de CTNNB1	44
Tableau 9 Etude IHC des cibles connues de l'imatinib des patients inclus dans les essais de phase II évaluant l'imatinib dans les FA (nombre cas positifs/nombre de cas étudiés)	53
Tableau 10 Répartition de la présence du variant M541L de l'exon 10 de <i>KIT</i> en fonction du caractère hormonodépendant des FA	55

Préambule

La fibromatose agressive était une maladie mal connue, tant sur le plan moléculaire que thérapeutique lorsque j'ai initié ce travail. Quand ces travaux ont débuté, l'essai clinique de phase II, Desminib, évaluant la toxicité et l'efficacité de l'imatinib dans les FA non accessibles à un traitement local, venait de s'achever et les résultats cliniques étaient disponibles. Nous avons entrepris un programme de recherche de transfert dédié à cet essai clinique, visant à identifier des marqueurs biologiques prédictifs de réponse à l'imatinib dans cette population. Nous avons dans un premier temps rapatrié les blocs de tumeur inclus en paraffine (« Formalin Fixed Paraffin Embedded ») des patients ayant participé à l'essai et avons pu en récupérer 34 (sur 40 patients inclus dans l'étude). Ces blocs FFPE ont servi aux différentes expériences menées ensuite.

Dans un premier temps, nous avons étudié en immunohistochimie sur *tissue micro-array* l'expression de récepteurs de l'imatinib et d'éléments de voies de signalisation potentiellement impliqués dans la réponse au traitement. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de ces protéines et les réponses objectives enregistrées dans l'essai. Nous avons parallèlement étudié, par séquençage, la présence du variant M541L de l'exon 10 de *KIT* sur l'ADN tumoral issu de ces mêmes blocs en paraffine. Différents « case reports » publiés à ce moment-là évoquaient l'impact positif de la présence de ce variant sur la réponse à l'imatinib. La qualité médiocre du matériel ne nous a permis de conclure que sur 10 patients : le variant était présent dans 3 échantillons, dont un patient en réponse partielle et le seul patient en réponse complète de l'étude. Ce résultat n'était pas statistiquement significatif mais il nous a semblé judicieux d'élargir la cohorte analysable en utilisant une technique de PCR quantitative (CAST PCR) pour améliorer le rendement de nos résultats. L'analyse statistique n'a pu conclure que la présence du variant M541L puisse être prédictive d'une meilleure réponse à l'imatinib. Au même moment, nous avons eu des échanges avec l'équipe du Pr Kurtz de Strasbourg qui avait identifié un nouveau variant de l'exon 10 de *KIT* (V530I), associé à une réponse d'excellente qualité d'une FA à l'imatinib.

Parallèlement, dans le cadre du programme européen « PERSEUS 1 » initié sous l'impulsion de l'association de patients « SOS Desmoïdes », un vaste recueil de données multicentrique a été réalisé en 2008, auquel j'ai activement participé. Quatre cent vingt six patients atteints de FA diagnostiquées entre 1965 et 2008 ont été recensés dans la « Conticabase ». Après confirmation du diagnostic par relecture des lames histologiques par le Groupe Sarcome Français (GSF), les données cliniques décrivant les antécédents du patient, les caractéristiques de la tumeur, toutes les étapes de son évolution et les traitements administrés étaient collectées de manière rétrospective. L'analyse de ces données a identifié l'âge du patient, la taille et la localisation tumorales comme étant des facteurs pronostiques de récurrence. Cette base de données a également été utilisée par une équipe du MSKCC comme cohorte de validation pour établir un nomogramme pronostique de récurrence des FA à partir de ces mêmes facteurs.

L'échec de l'identification de facteurs pronostiques et prédictifs aux étapes précédentes a conduit à explorer une nouvelle approche via l'analyse du profil d'expression des miRNAs des tumeurs, développé au sein du laboratoire d'accueil depuis le programme européen Conticanet. Il a été décidé d'analyser ce profil à partir de l'ARN des FA des patients inclus dans l'essai Desminib avec un double objectif : identifier des voies biologiques permettant de rechercher des facteurs prédictifs de réponse à l'imatinib et également des facteurs

pronostiques. Une signature pronostique a été identifiée et confirmée sur une cohorte de validation indépendante de FA inclus dans la base de données nationale, pour lesquelles on disposait des blocs inclus en paraffine.

Dans ce manuscrit, je présenterai tout d'abord en introduction, les caractéristiques spécifiques des FA et les particularités de leur prise en charge et de leur traitement. J'exposerai ainsi à la fois l'importance et le manque de marqueurs cliniques et/ou biologiques, pronostiques et prédictifs. Je rapporterai ensuite les principales données sur les connaissances actuelles de la biologie de ces tumeurs pour appréhender les avancées possibles dans cette thématique.

Dans une seconde partie, j'exposerai les principaux résultats de mes travaux, menés dans le but de progresser dans l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques et prédictifs.

I. INTRODUCTION

A. Présentation

Les fibromatoses agressives (FA) sont également appelées « tumeurs desmoïdes ». Ce sont des tumeurs localement agressives du tissu conjonctif, caractérisées par une prolifération de fibroblastes et une production abondante de collagène hyalinisé analogue au tendon (« desmos » = tendon). Ces tumeurs sont rares puisqu'elles représentent 0.03% de toutes les tumeurs et 3% des tumeurs des tissus mous. Leur incidence annuelle est de 2-4 nouveaux cas/1 000 000 habitants (Reitamo *et al.* 1982). Compte-tenu de cette rareté, leur prise en charge doit se faire préférentiellement en centre spécialisé ("Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." 2012).

Depuis 1997, il a été établi que ces FA doivent être considérées comme un processus néoplasique (et non un processus uniquement réactionnel) puisqu'elles sont composées d'une prolifération cellulaire issue d'un clone unique (Alman *et al.* 1997), des progéniteurs des cellules mésenchymateuses en l'occurrence (Wu *et al.* 2010). Elles sont classées par la « WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone » de 2013 comme étant de malignité intermédiaire. En effet, et comme quelques rares autres tumeurs, elles présentent cette particularité très intrigante de ne jamais donner de métastases à distance alors qu'elles sont responsables d'une agressivité loco-régionale parfois très marquée et de récives fréquentes après exérèse.

Les FA se développent dans différents contextes, soit dans le cadre d'un syndrome de Gardner quand elles sont associées à une polypose adénomateuse familiale et liées à la mutation du gène APC ($\approx$ 2% des cas), soit, le plus souvent, de manière sporadique. Des cas de développement sur des zones cicatricielles (post-traumatiques ou post-chirurgicales) sont fréquemment décrits. Le lien biologique entre cicatrice et FA a été établi par Carothers *et al.* (Carothers *et al.* 2012) démontrant que les FA sont composées de cellules dérivées des cellules souches mésenchymateuses ayant acquis des caractéristiques de cicatrisation, d'angiogénèse et de fibrose (cf § D 1.).

Les séries rétrospectives de patients atteints de FA retiennent classiquement un sex ratio en faveur des femmes, de l'ordre de 2 :1. Quand ce sex ratio est étudié plus précisément au cours de la vie, il évolue en fait avec le nombre des années (Reitamo *et al.* 1982) (Skene *et al.* 1998): si il y a nettement plus de femmes que d'hommes atteints pendant la période d'activité génitale ($\approx$ 20-40 ans), la fréquence entre les 2 sexes est équivalente pendant l'enfance et après la ménopause. Ces différences sont considérées comme sous-tendues par l'influence des stéroïdes sexuels sur ces tumeurs.

Les dernières données issues du « Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères » recensaient 735 cas de FA au mois d'Août 2013 et illustrent bien cette répartition spécifique par sexe en fonction de l'âge :

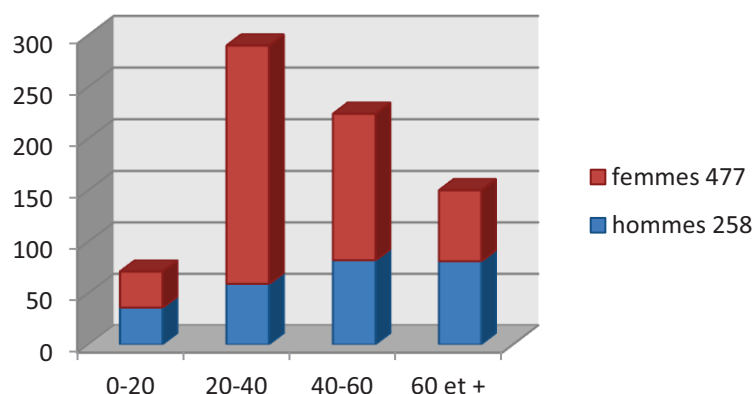


Figure 1 Répartition par sexe et tranche d'âge des diagnostics de FA en France actualisé au mois d'Août 2013 (données RRePS)

Si le pic d'incidence se situe chez l'adulte, entre 20 et 50 ans, les FA peuvent être diagnostiquées à tout âge : on retrouve, dans la littérature, un cas rapporté chez un bébé de 2 mois. Les formes pédiatriques ne sont pas rares et font l'objet de séries rétrospectives et de traitements spécifiques (Skapek *et al.* 2013). Les séries publiées décrivent également fréquemment des cas de patients âgés de plus de 80 ans.

Les FA sont des tumeurs du tissu conjonctif qui peuvent survenir partout dans l'organisme, au niveau de tous les tissus de soutien. Leur localisation est habituellement organisée en 3 catégories : extra-abdominale, intra-abdominale et au niveau de la paroi abdominale.

A partir de ces 3 caractéristiques d'âge, de sexe du patient et de localisation de la tumeur, a été déterminée une classification clinique en 4 groupes (Reitamo *et al.* 1986):

- les FA juvéniles : tumeur extra-abdominale chez la petite fille
- les FA de la période d'activité génitale : tumeur de la paroi abdominale chez la femme
- les FA d'âge moyen : tumeur plutôt abdominale chez les hommes autant que chez les femmes
- les FA des personnes âgées : tumeur abdominale ou extra-abdominale, chez les hommes autant que chez les femmes

La taille des tumeurs au moment du diagnostic est très variable, liée à la localisation et au caractère infiltrant de la tumeur et donc à ses conséquences fonctionnelles (i. e. symptomatologie). Une tumeur de 2 cm érodant la mandibule sera beaucoup plus rapidement symptomatique qu'une lésion de 20 cm intra-abdominale (cf images). Ce caractère infiltrant des tumeurs est représenté par leurs limites : si certaines tumeurs semblent radiologiquement et macroscopiquement encapsulées refoulant les organes de voisinage, d'autres ont des limites radiologiques imprécises à leur périphérie et envahissent les structures adjacentes.

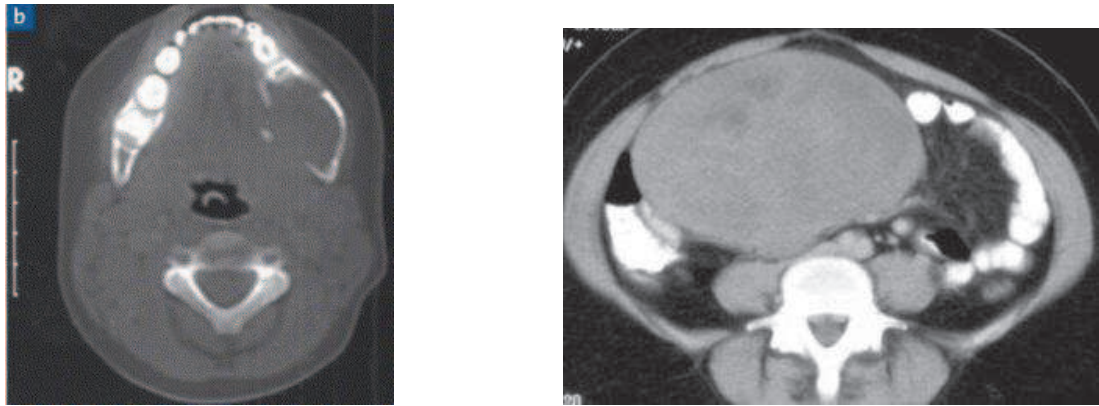


Figure 2 Images de scanner de FA, de la mandibule à gauche et abdominal à droite

Enfin, le caractère sûrement le plus représentatif de la variabilité des tumeurs est l'évolutivité des FA observée en clinique. Il est impressionnant de constater que certaines FA puissent avoir une évolutivité indolente au point de demeurer stable en taille voire même de régresser spontanément alors que d'autres évoluent rapidement et récidivent de manière répétée après les traitements. Entre ces deux modalités évolutives, tous les modes d'évolution sont rencontrés et ont été schématisés par Gronchi *et al.* (Gronchi *et al.* 2014).

Different patterns of tumor growth according to the time point of first observation in the clinic.

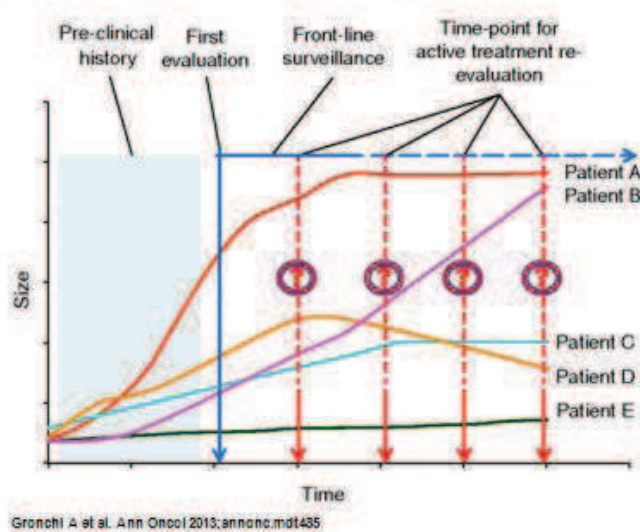


Figure 3 Représentation schématique des modes évolutifs de FA (d'après Gronchi *et al.* 2013)

Cette grande variabilité observée au niveau de la présentation clinique, du contexte de survenue et de l'évolutivité des tumeurs sous-tend sûrement différentes caractéristiques moléculaires, non encore identifiées à ce jour.

B. Prise en charge

1. Stratégie

La prise en charge des FA est actuellement débattue et les anciens standards de prise en charge largement remis en question depuis 5 ans. Auparavant, ces tumeurs étaient gérées au diagnostic comme des tumeurs malignes : l'exérèse chirurgicale en était systématique dans la mesure où les séquelles prévisibles étaient acceptables ; sinon une radiothérapie seule était proposée. La radiothérapie adjuvante était recommandée en cas de marges chirurgicales positives, mais, en l'absence d'essais randomisés, ne constituait pas un standard (Ballo *et al.* 1999).

Il était délicat de proposer des règles univoques de prise en charge chirurgicale des FA dans la mesure où elles peuvent survenir dans des sites anatomiques très divers de l'organisme, être de toutes tailles et avoir des limites variables avec les organes adjacents (infiltration ou non). Les seules recommandations qui peuvent éventuellement guider le geste portent sur la qualité de l'exérèse, i.e. R0, R1 ou 2. Après relecture et analyse de toute la littérature portant sur ce sujet, il apparaît que le caractère macroscopiquement complet de l'exérèse est important mais que le risque de récurrence n'est pas différent entre une exérèse R0 ou R1 (données détaillées dans § I C).

Compte-tenu de plusieurs facteurs cliniques spécifiques des FA :

- absence de métastases secondaires,
- fréquence relativement importante des récurrences locales après résection chirurgicale (taux de récurrence locale : 15 à 50% à 5 ans dans les 9 études rétrospectives),
- absence d'impact de la chirurgie sur le risque de reprogression après rechute,
- séquelles chirurgicales fonctionnelles et/ou esthétiques non négligeables,



Figure 4 Illustration photographique pré (à gauche) et post opératoire (à droite) d'une FA de la paroi abdominale

- régressions spontanées non exceptionnelles,
- non évolutivité d'un certain nombre de tumeurs observée en clinique,

plusieurs ont proposé la possibilité de simplement surveiller les patients atteints de FA à la prise en charge.

En 2007, Gouin *et al.* publient le premier article remettant en question la stratégie agressive de traitement des FA (Gouin *et al.* 2007). Ces travaux ont le grand intérêt de porter sur une

cohorte prospective de 17 patients atteints de fibromatoses agressive extra-abdominale et simplement surveillés : après 42 mois de suivi médian, 3 tumeurs avaient régressé et 12 étaient restées stables. Il est particulièrement intéressant de noter qu'aucune évolution n'avait été observée après 36 mois. Par la suite, plusieurs études rétrospectives défendant une attitude d'observation sans traitement ont été publiées: en 2008, le Dr Bonvalot rapporte les résultats d'une étude rétrospective portant sur 112 patients, montrant que la survie sans événement à 3 ans était identique entre les patients opérés avec marges saines et les patients non opérés. Les 2/3 des patients simplement surveillés étaient non évolutifs à 3 ans (Bonvalot *et al.* 2008). En augmentant la cohorte à 142 patients, la moitié des patients surveillés n'évoluaient pas à 5 ans (Fiore *et al.* 2009). D'autres publications concluent dans le même sens : Honeyman *et al.* (Honeyman *et al.* 2013) ont étudié une population de 93 cas pédiatriques de FA primitives et récidivantes et retrouve des taux de survie sans événements à 5 ans de 21% sans traitement et 34% avec traitement ($p = 0.09$). Barbier *et al.* (Barbier *et al.* 2010) rapportent 26 cas de FA primitives et récidivantes simplement surveillés, dont 24 restent stables après un suivi médian de 14 mois et 1 régresse spontanément. Stoeckle *et al.* (Stoeckle *et al.* 2009) retrouvent des temps médians de stabilité de 48 à 137 mois selon que la tumeur soit primitive ou récidivante.

Ces observations ont amené les principales instances européenne (ESMO) et nord-américaines (NCCN) à conseiller la simple surveillance des FA asymptomatiques et non évolutives dans leurs recommandations (von Mehren *et al.* 2012) ("Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up." 2012).

Cette stratégie de surveillance a rapidement été intégrée aux pratiques quotidiennes de prise en charge des patients. Toutefois, elle ne repose pour l'instant que sur des données rétrospectives, par définition biaisées, et qui peuvent être critiquables dans la mesure où le choix de traitement des patients a forcément été influencé par la présentation des tumeurs. On ne retrouve jamais, à la lecture de ces articles, de description des patients surveillés. De plus, plusieurs limites apparaissent dans ces études :

- la taille globale des cohortes et surtout le nombre de patients uniquement surveillés est souvent faible (15 patients surveillés sur 93 au total dans l'étude de Honeyman),
- le suivi médian des patients est parfois très court (14 mois pour l'étude de Barbier),
- les critères établissant les groupes comparés sont très variables (patients opérés versus patients surveillés ou bénéficiant de traitements médicaux dans l'étude de Bonvalot, patients surveillés versus patients bénéficiant de traitements médicaux dans l'étude de Fiore),
- le choix de l'objectif peut être discutable (pas d'influence de la chirurgie sur la survie globale dans l'étude de Stoeckle).

Seul un essai prospectif pourra répondre clairement à cette question de stratégie de traitement ; cet essai est en cours, mené par le Dr Bonvalot. Il s'agit d'un essai de phase II, non randomisé, multicentrique, qui prévoit d'inclure 100 patients atteints de fibromatoses périphériques (membres ou paroi abdominale ou thoracique) primitives non opérées ou en exérèse R2. L'objectif principal est d'évaluer la survie sans progression locale à 3 ans et l'un des objectifs secondaires est de tenter d'identifier des facteurs biologiques, de l'hôte et/ou de la tumeur, prédictifs de l'évolution. Cet essai est très innovant conceptuellement, proposant la simple surveillance d'une tumeur (plutôt que la chirurgie), d'autant plus qu'il est soutenu par un chirurgien.

En attendant les résultats de cette étude, les décisions prises actuellement en réunions de concertation pluridisciplinaires ne retiennent la résection chirurgicale qu'en cas de tumeur symptomatique, évolutive ou mettant en jeu le pronostic vital du patient. Tous les autres cas sont dans un premier temps surveillés et une thérapeutique spécifique n'est proposée qu'en cas de lésion évolutive. En tout état de cause, ces décisions sont probabilistes en l'absence de facteurs pronostiques fiables permettant de sélectionner efficacement les patients qui bénéficient réellement d'une telle stratégie attentiste.

Aucune étude n'a recherché les facteurs prédisant l'évolution naturelle de la maladie, en dehors tout traitement. Or ceci est maintenant essentiel si on veut sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une simple surveillance.

Quels que soient les résultats finaux de cet essai, on sait dès à présent que certains de ces patients vont évoluer et donc devoir être traités : les repérer précocement serait un objectif important, et cette question a été une des objectifs de notre travail.

2. Radiothérapie

La place de la radiothérapie dans la thérapeutique des FA peut se discuter à 2 étapes de la prise en charge : en tant que traitement complémentaire d'une chirurgie (à marges saines ou non) et en tant que traitement isolé d'une tumeur en place. Dans la 1^{ère} situation, des éléments de réponse peuvent être apportés par les résultats de la méta-analyse portant sur 22 études et publiée en 2000 (Nuyttens *et al.* 2000). Ces résultats rapportent des taux de contrôle local par une chirurgie seule de 72% en cas de marges saines et de 41% en cas de marges positives. Ces résultats sont statistiquement inférieurs à ceux obtenus par une radiothérapie complétant la résection chirurgicale qui permet d'obtenir un contrôle local de 94% en cas de marges saines (R0) et à 75% en cas de marges positives (R1 ou R2). Le taux de récurrence de 75% obtenu par chirurgie à marges positives et radiothérapie est comparable à celui de 72% obtenu par chirurgie seule à marges saines. On peut considérer que la radiothérapie « rattrape » une chirurgie à marges envahies. Toutefois, les conclusions des études de stratégie thérapeutique portant sur des études rétrospectives sont en général biaisées. En l'absence d'études randomisées, la radiothérapie complémentaire d'une chirurgie incomplète n'est actuellement pas un standard, ni pour l'ESMO ni pour le NCCN. De plus, les séquelles de la radiothérapie et le risque de seconde tumeur sont à prendre en compte. Dans la méta-analyse, 9 articles rapportaient des complications à type de fibrose, parfois invalidante, paresthésies, cellulite, fracture pathologique. Plus graves, un ostéosarcome et un sarcome utérin sont survenus après irradiation, respectivement d'une tumeur mandibulaire et d'une FA abdominale.

Dans la 2^{ème} situation, un essai de phase II récemment publié rapporte un taux de contrôle local de 81,5% à 3 ans avec une radiothérapie de 56 Gray pour des tumeurs primitives ou récidivantes en place, ou résidus macroscopiques inopérables et évolutifs (Keus *et al.* 2013). La meilleure réponse était parfois observée au-delà de 3 ans. Le suivi médian de la cohorte était de 4.8 ans et la survie sans récurrence à 10 ans de 70%. La radiothérapie peut ainsi légitimement être proposée pour contrôler des tumeurs non opérables.

3. Traitement médical

Lorsque les FA sont évolutives et/ou symptomatiques et non accessibles à un traitement local par chirurgie ou radiothérapie, différents traitements systémiques peuvent être proposés, d'efficacité très variable. Aucune étude randomisée n'a jamais été menée pour déterminer précisément le taux d'efficacité de ces thérapies. L'ESMO et le NCCN retiennent, comme possibilité de traitement médical des FA, des hormonothérapies (tamoxifène, torémifène, analogues de LHRH), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (sulindac, celecoxib), des chimiothérapies (schémas à base d'anthracyclines, méthotrexate et vinblastine ou vinorelbine, interféron à faible dose) et plus récemment, des thérapies ciblées (imatinib, sorafenib). L'efficacité de ces traitements est globalement modeste et surtout excessivement variable d'un patient à l'autre sans qu'aucun facteur prédictif formel pouvant guider le choix du traitement n'ait à ce jour été identifié.

L'influence des hormones sur les FA justifiant l'utilisation des anti-oestrogènes, analogues de la LH-RH ou inhibiteurs de l'aromatase, repose sur plusieurs constatations cliniques :

- incidence de cette pathologie plus élevée chez les femmes que chez les hommes, particulièrement en période d'activité génitale (20-40 ans),
- survenue de FA de la paroi abdominale en cours de grossesse ou en post-partum,
- régression spontanée de FA à distance de l'accouchement ou en période de ménopause.

Une analyse rétrospective des données de la littérature parue en 2011 recensait, entre 1983 et 2009, 41 articles portant sur l'utilisation d'hormonothérapie dans 168 cas FA (30 « case report » et 11 séries) (Bocale *et al.* 2011). Bien évidemment, seuls les cas répondeurs sont généralement publiés dans la littérature et ces données ne peuvent refléter l'efficacité réelle de ce traitement. Les taux de réponse objective étaient comparés entre différents groupes de patients reconstitués à partir de ces observations rétrospectives. Si une telle méthodologie est discutable, elle peut fournir des pistes de réflexion à partir de ses conclusions. Les auteurs retenaient que les taux de réponse des FA à l'hormonothérapie étaient:

- identiques entre les FA associées à un syndrome de Gardner versus les sporadiques
- supérieurs chez les patients traités par hormonothérapie seule versus en association avec d'autres traitements, notamment les AINS (cette constatation peut être liée à un biais de méthodologie rétrospective où les tumeurs les plus agressives sont traitées par des associations de traitements)
- identiques entre les traitements par tamoxifène versus torémifène
- identique en fonction de l'expression des récepteurs aux estrogènes (RE)

Plusieurs précisions peuvent être apportées à ces conclusions. Deux études cliniques rapportent les résultats d'association de tamoxifène haute dose et sulindac, respectivement chez des adultes (Hansmann *et al.* 2004) et une population pédiatrique (Skapek *et al.* 2013). Parmi les 21 adultes traités par l'association, on retrouve 5 réponses objectives, 2 maladies progressives et 11 stabilisations. Parmi les enfants, l'association permet d'obtenir 5 réponses objectives sur 59 cas.

Concernant l'analyse des taux d'expression des RE, le nombre de cas étudiés est très faible (9). De plus, il n'est pas précisé, dans les publications concernées, si les RE dosés sont de

type α ou β . Or, si le RE α est le plus communément mesuré, notamment dans les tumeurs classiquement hormonodépendantes comme le cancer du sein, il semble que ce soit le sous type β qui soit plus important dans les FA. Plusieurs publications rapportent une expression quasi constante de ce récepteur dans les FA (Deyrup *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010; Santos *et al.* 2010; Mignemi *et al.* 2012; Colombo *et al.* 2012). Toutefois, aucune n'a corrélé sa présence à l'efficacité clinique de l'hormonothérapie. Actuellement, le dosage des RE β ne peut être considéré comme facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie. Biologiquement, les effets génomiques et non génomiques des 2 sous-types du récepteur aux estrogènes ne sont pas clairement établis. Les 2 sous-types peuvent coexister dans les tissus, avoir une activité transcriptionnelle variable et opposée : si RE α semble plutôt avoir un effet prolifératif, RE β aurait plutôt un effet anti-prolifératif.

Depuis la publication de cette revue, il faut signaler la publication d'un « case report » rapportant une réponse complète de FA sous exemestane (Debled *et al.* 2012). La seule série disponible sur l'efficacité de l'hormonothérapie dans les FA est parue en 2010. Cette série rétrospective a recensé 26 lignes d'hormonothérapie administrées permettant d'obtenir 6 réponses partielles, 17 stabilisations et 3 maladies progressives pour un temps à progression de 12 mois (de Camargo *et al.* 2010).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont été développés dans cette indication sur des bases pré cliniques associant des études *in vitro* et *in vivo* démontrant le rôle de la COX2 et de son inhibition dans ces tumeurs. La COX2 est une enzyme induite par différents stimuli cellulaires, dont les facteurs de croissance et les cytokines. Les taux de ses métabolites (prostaglandine E2) ont été retrouvés élevés dans différents processus néoplasiques, notamment dans les polypes intestinaux développés dans des modèles de souris avec mutation de APC (souris KO APC ^{$\Delta 716$}) où l'expression de COX2 est augmentée (Oshima *et al.* 1996). L'administration d'anti COX2 chez ces souris réduit significativement le nombre de polypes. COX2 est également surexprimée dans des prélèvements tumoraux de FA (Poon *et al.* 2001; Signoroni *et al.* 2007; Mignemi *et al.* 2012) comparativement au tissu normal des mêmes patients. Des expériences sur des cultures cellulaires primaires de FA ont montré une diminution des taux de PGE2 et de la prolifération cellulaire en présence d'AINS. Les taux de COX2 n'ont jamais été corrélés à l'efficacité des AINS. De plus, la découverte d'une cible commune entre cette classe de médicaments et la voie de signalisation Wnt-APC- β caténine a permis d'établir un lien entre l'effet anti-tumoral des AINS et les altérations génétiques de la voie Wnt-APC- β caténine (He *et al.* 1999). Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyde de type δ (PPAR δ) fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires. Les membres de cette famille activent la transcription de séquences spécifiques après fixation de leur ligand. APC réprime l'expression de PPAR δ qui, à contrario, est élevée dans les cancers colo-rectaux. Cette régulation se fait par la voie β caténine/Tcf. Dans des cultures cellulaires de carcinomes colo-rectaux, l'activité de PPAR δ est fortement diminuée par le sulindac. Cliniquement, les cas de 22 patients atteints de FA extra-abdominale et traités par meloxicam ont été examinés rétrospectivement : 95% d'entre eux présentaient au moins une stabilisation de la maladie (Nishida *et al.* 2010). Toutefois, les auteurs eux-mêmes concluent que « ce résultat ne puisse être totalement attribuable à l'efficacité de l'AINS et que seul un essai randomisé contre placebo pourrait prouver l'effet inhibiteur du meloxicam ».

Beaucoup plus toxique, l'utilisation de la chimiothérapie cytotoxique anti-cancéreuse dans les FA ne repose pas sur beaucoup plus de données. Seule une étude prospective, de phase II, est disponible (Skapek *et al.* 2007). Sur 28 enfants traités par une association de

méthotrexate et vinblastine, 8 ont présenté une réponse objective et 10, une stabilisation de la maladie. Dix-huit patients ont évolué avec une médiane de 9,1 mois. Toutes les autres études sont rétrospectives, présentées dans le tableau ci-dessous.

Auteur, année	N	Protocole	Taux de réponse	PFS
Weiss <i>et al.</i> , 1989	8	MTX-VBL	75%	NA
Patel <i>et al.</i> , 1993	12	Doxorubicine-dacarbazine	67%	
Skapek <i>et al.</i> , 1998	10	MTX-VBL	50%	NA
Weiss <i>et al.</i> , 1999	13	MTX-NVB	60%	NA
Reich <i>et al.</i> , 1999	5	MTX-VBL	60%	NA
Azzarelli <i>et al.</i> , 2001	30	MTX-VBL	40%	Non atteinte avec 10 ans suivi
Gega <i>et al.</i> , 2006	7	Doxorubicine-dacarbazine	100%	74
De Camargo <i>et al.</i> , 2010	10	MTX-VBL	20%	NA
	35	Anthracycline	37%	NA
Garbay <i>et al.</i> , 2011	27	MTX-VBL	15%	40.8
	13	Anthracycline	54%	
Constantinidou <i>et al.</i> , 2011	18	MTX-VBL	11%	9
	14	Doxo Peg.	33%	NA

Abréviations : N taille de la cohorte ; MTX méthotrexate ; VLB vinblastine ; Doxo Peg doxorubicine pégylée

Tableau 1 Etudes et séries rapportant les taux d'efficacité des chimiothérapies dans les FA (Weiss & Lackman 1989; Patel *et al.* 1993; Skapek *et al.* 1998; Weiss *et al.* 1999; Reich *et al.* 1999; Azzarelli *et al.* 2001; Gega *et al.* 2006; Garbay *et al.* 2012; Constantinidou *et al.* 2011; de Camargo *et al.* 2010)

Si les schémas à base d'anthracyclines semblent les plus efficaces (Garbay *et al.* 2012), ceci doit être mis en balance avec les toxicités à court, moyen et long terme qu'ils induisent.

Le développement des inhibiteurs de tyrosine-kinase dans les FA a démarré avec plus d'études prospectives : l'imatinib a été évalué dans 3 essais de phase II incluant respectivement 19, 40 et 51 patients (Heinrich *et al.* 2006; Chugh *et al.* 2010; Penel *et al.* 2011). Les taux de réponse objective sont de 15.7%, 12% et 6% et les taux de survie sans récurrence à 1 an à 36.8%, 67% et 66%. Kasper *et al.* ont tenté de rechercher une corrélation entre les modifications de SUV d'un pet-scan et la réponse objective sous imatinib évaluée par IRM selon les critères RECIST (Kasper *et al.* 2013). Une valeur initiale de SUV élevée serait corrélée à une réponse partielle ou stabilisation (une valeur initiale de SUV plus basse semble prévoir une maladie progressive). Ce résultat est en attente d'études confirmatives.

Le sorafenib induit 25% de réponse partielle dans une étude rétrospective portant sur 26 patients (Gounder *et al.* 2011). Le sunitinib a été évalué dans un essai de phase II incluant 19 patients (Jo *et al.* 2014). Un quart des patients ont présenté une réponse partielle et la

moitié, une stabilisation de la maladie. La survie sans progression à 2 ans était de 75%. Deux cas ont rapporté une efficacité intéressante du pazopanib, avec des réponses objectives de qualité et durant plus d'un an (Martin-Liberal *et al.* 2013). Ces observations ont motivé la mise en route d'un essai de phase III (le premier !) multicentrique français randomisant des patients atteints de FA évolutive entre une chimiothérapie par méthotrexate-vinblastine et un traitement par pazopanib.

Il est assez surprenant de constater, lorsque l'on tente de faire la synthèse de l'efficacité des traitements médicaux dans les FA, que l'on retrouve, grossièrement, et quel que soit le traitement étudié, environ la moitié des patients présentant une stabilisation de la maladie, un quart répondeurs et un quart progressifs. On peut être tenté de se poser la question de savoir dans quelle mesure ces taux sont le reflet d'une activité de la thérapeutique ou simplement liés à l'évolution naturelle de la maladie.

Actuellement, aucun facteur prédictif clinique ou biologique n'a été identifié, permettant de sélectionner les patients bénéficiant au mieux d'un type de traitement pour leur proposer une séquence thérapeutique qui leur soit adaptée et donc, plus utile. En l'absence de recommandations, et compte-tenu de l'absence de potentiel métastatique des FA et de la très faible mortalité dont elles sont responsables, le prescripteur tend naturellement à proposer en premier lieu les traitements ayant le moins d'effets secondaires (AINS et hormonothérapie avant chimiothérapie et traitements ciblés). En 2014, Gronchi *et al.* proposent l'algorithme suivant pour la prise en charge des FA (Gronchi *et al.* 2014):

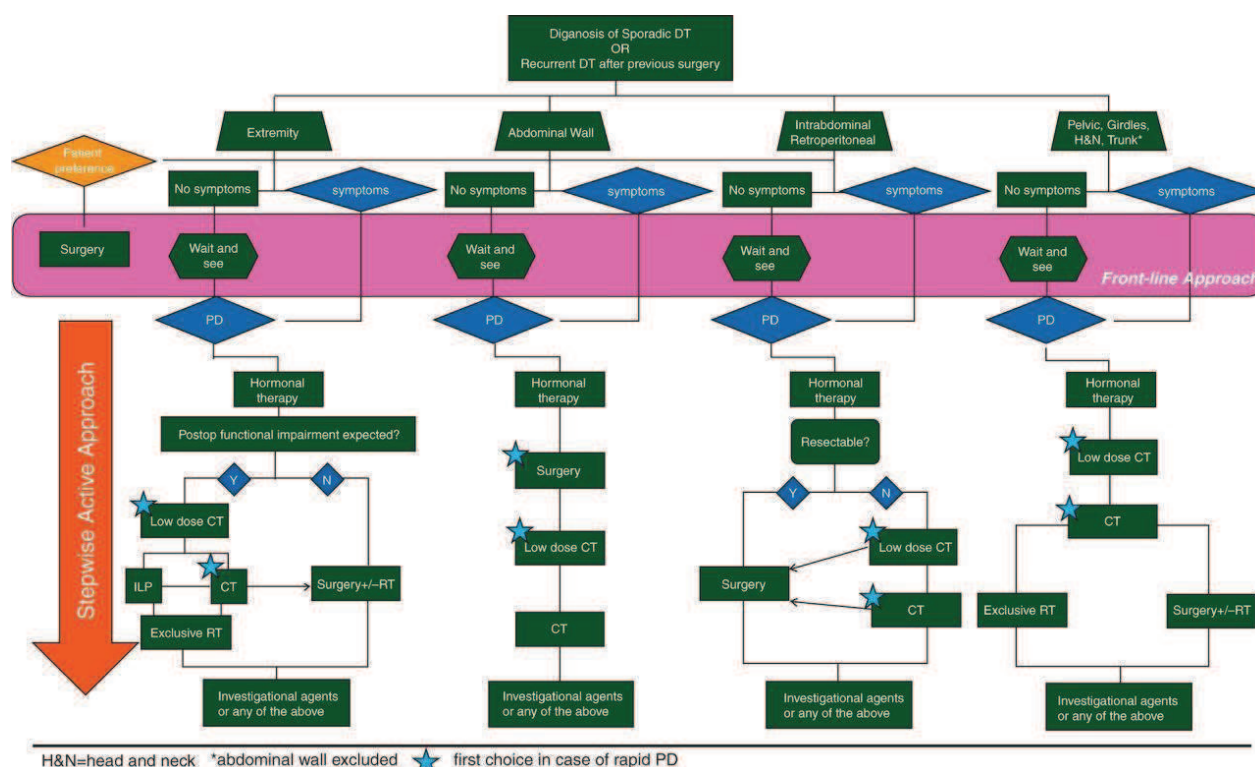


Figure 5 Schématisation de stratégie de prise en charge des patients atteints de FA proposée par Gronchi *et al.*

Bien évidemment, à chacune de ces étapes doit se poser la question de la possibilité d'inclusion dans un essai clinique, que ce soit un essai de stratégie ou de thérapeutique.

C. Facteurs pronostiques et prédictifs

L'expérience clinique et bibliographique montre à quel point le pronostic des FA est variable d'un patient à l'autre, et le panel des traitements actifs ne permet pas de proposer une approche rationnelle en l'absence de biomarqueurs ou d'arguments moléculaires pour guider le choix du traitement. Dans la prise en charge de ces tumeurs, le praticien manque ainsi de biomarqueurs cliniques et/ou biologiques clairement identifiés comme influençant le pronostic. Dans le cas des FA, 2 situations principales requièrent la détermination de leur pronostic :

- l'évolution d'une tumeur en place, diagnostiquée, non opérée. La recherche du pronostic à ce stade semble particulièrement pertinente dans la mesure où si certaines FA augmentent naturellement de volume avec des conséquences fonctionnelles qui peuvent être lourdes (envahissement nerveux ou vasculaires, par exemple, avec les douleurs et risques neurologiques ou hémorragiques qui en découlent), d'autres n'évoluent pas dans le temps, même en l'absence de traitement, voire régressent spontanément.
- le risque de récurrence loco-régionale après exérèse chirurgicale.

Toutes les études publiées recherchant à identifier des facteurs pronostiques de l'évolution des FA sont des études rétrospectives pour lesquelles, l'immense majorité des patients était opéré. On ne dispose pas de description de l'évolution naturelle de la maladie, en dehors de tout traitement. Une telle description sera apportée par les résultats de l'étude de phase II du Dr Bonvalot actuellement en cours et mentionnée ci-dessus (ayant fait l'objet du PHRC10_02-10 et intitulée « Fibromatoses primitives périphériques: Etude de phase 2 évaluant une surveillance simple initiale avec recherche des facteurs prédictifs d'évolutivité et enregistrement des traitements en cas de progression »). On ne peut donc actuellement se baser sur aucun facteur pour déterminer le pronostic évolutif d'une tumeur en place. En pratique, il est recommandé dans un premier temps, de simplement surveiller l'évolution d'une tumeur nouvellement diagnostiquée par des examens cliniques et radiologiques répétés pour se faire une idée de son évolutivité.

Les facteurs pronostiquant la rechute après exérèse chirurgicale ont été largement étudiés et les résultats ne sont pas forcément concordants. Toutes ces études pronostiques portent sur des cohortes rétrospectives de patients opérés, d'environ 100 à 200 patients, et analysent, en multivarié, l'influence éventuelle de facteurs cliniques sur la survie sans récurrence. Les résultats sont très difficilement interprétables car souvent contradictoires.

Auteur, année	n	Age	Sexe	Taille	Site tumoral	Qualité marges	Radiothérapie
Huang, 2013	214	non	non	oui	non	non	-
Van Broekhoven, 2013	132	non	non	non	oui	non	Non
Shin, 2013	119	non	non	non	non	oui	non (sf délai)
Mullen, 2012	177	non	non	non	non	oui	Non
Peng, 2012	211	oui	-	non	oui	non	Non
Bertani, 2012	62	non	non	non	oui	non	-
Lev, 2007	189	non			non	non	
Gronchi, 2003	203	-	-	oui	oui	non	-
Merchant, 1999	105	non	non	non	non	non	-
Spear, 1998	107	oui	non	-	non	oui	Oui

n : taille de la cohorte

Tableau 2 Principaux résultats des études rétrospectives identifiant les facteurs prédictifs de récurrence après exérèse chirurgicale des FA (analyse multivariée).

(Huang *et al.* 2013; van Broekhoven *et al.* 2013; Shin *et al.* 2013; Mullen *et al.* 2012; Peng *et al.* 2012; Bertani *et al.* 2012; Lev *et al.* 2007; (Gronchi *et al.* 2003)Merchant *et al.* 1999)(Spear *et al.* 1998)

De toutes ces données, on peut tenter d'extraire l'analyse suivante :

- le sexe ne semble pas avoir d'impact pronostique sur la récurrence
- l'âge n'est retrouvé que très rarement comme facteur pronostique (les plus jeunes ayant tendance à avoir les pathologies les plus récidivantes) mais les analyses étaient très hétérogènes : Lev l'étudie comme variable continue alors que les autres auteurs ont plutôt tendance à faire des groupes par tranches d'âge (2 groupes à 4 groupes).
- lorsque la localisation tumorale influence le pronostic, ce sont toujours les tumeurs extra abdominales, principalement des membres et des ceintures qui sont les plus graves.
- la qualité des marges chirurgicales est matière à controverse, a été analysée dans de multiples études rétrospectives et même des méta-analyses. Pourtant, en les analysant, les résultats semblent bien tous concordants. Toutes les études retrouvant un impact statistiquement significatif de la qualité des marges sur la récurrence, ont comparé des marges positives à des marges négatives, c'est à dire R0 vs R1 et R2 (études rétrospectives de Shin 2013, Mullen 2012, Spear 1998 et méta-analyses de Nuyttens et Leithner) (Nuyttens *et al.* 2000)(Leithner *et al.* 2004). Dans les études de Huang, Van Broekhoven, Peng et Bertani, qui ne retrouvent pas d'influence de la qualité des marges chirurgicales, la résection complète R0 était comparée à l'envahissement microscopique des marges R1. Il ne semble donc pas y avoir de différence sur le risque de récurrence entre les résections R0 et R1.
- l'administration de radiothérapie améliore rarement le pronostic mais on n'a très peu de renseignements sur les conditions et les modalités de son administration.

L'analyse rétrospective de ces données est largement critiquable. Dans des tumeurs de présentation aussi hétérogène, la discussion de l'acte chirurgical prend en compte de

multiples facteurs comme l'âge du patient, mais aussi le risque de séquelles prévisibles beaucoup plus que la taille ou la localisation tumorale. Les rapports de la tumeur avec les organes adjacents (surtout s'il s'agit de nerfs ou de vaisseaux) sont essentiels dans la qualité de la résection. De même, en l'absence de recommandations claires, on n'a aucune notion dans ces études, des traitements adjuvants qui ont éventuellement pu être proposés aux patients après des exérèses incomplètes ou marginales. L'entraînement du chirurgien, les habitudes des centres sont autant de biais qui ont forcément influencé ces résultats.

De plus, dans l'interprétation de ces résultats, il faut garder à l'esprit l'hypothèse que l'acte chirurgical lui-même puisse être un propre facteur favorisant la récurrence. Ce concept repose sur le fait qu'on retrouve fréquemment dans la littérature et en clinique des cas de FA qui se développent sur des cicatrices ou des sites opératoires d'une part, et des cas de FA multirécidivants après des chirurgies itératives d'autre part (parfois plus d'une dizaine d'opérations sur une même FA). Cette notion est également (faiblement) soutenue par le fait que, dans ces mêmes études rétrospectives, les taux de récurrence sont presque toujours supérieurs pour les patients présentant une tumeur récidivante comparés à ceux présentant une tumeur primitive.

Auteur, n cohorte	Taux de survie sans récurrence	
	Tumeur primitive	Tumeur récidivante
Huang, 214	84.9% à 5 ans	63% à 5 ans
Van Broekhoven, 132	que des tumeurs primitives. Taux de récurrence locale à 5 ans : 17.6% (très bas)	
Shin, 119	85% à 5 ans	47% à 5 ans
	85% à 10 ans	31% à 10 ans
Mullen, 177	32% taux récurrence	20% taux récurrence
Bertani, 62	20% taux récurrence	10% taux récurrence
Gronchi, 203	76% à 10 ans	59% à 10 ans
Merchant, 105	que des tumeurs primitives. Taux de récurrence locale à 5 ans : 25%	
Spear, 107	79%	67%

Tableau 3 Taux de survie sans récurrence en fonction du statut primitif ou récidivant de FA

(Huang *et al.* 2013; van Broekhoven *et al.* 2013; Shin *et al.* 2013; Mullen *et al.* 2012; Bertani *et al.* 2012; Gronchi *et al.* 2003; Merchant *et al.* 1999; Spear *et al.* 1998)

Il commence à apparaître dans la littérature des articles rapportant la recherche de facteurs biologiques comme facteurs pronostiques (Romero *et al.* 2012; Colombo *et al.* 2013). La mutation 45F de CTNNB1 ou la présence de macrophages associés à la tumeur ont été identifiés comme facteurs pronostiques mais là encore, prédisant la rechute après exérèse.

D. Biologie des FA

Les mécanismes biologiques impliqués dans la transformation des cellules de FA ont été étudiés ces dernières années et de grands progrès ont été réalisés dans leur compréhension. D'une manière générale, la voie Wnt est altérée, par des mutations activatrices ou inhibitrices de deux gènes principaux, APC et β -caténine.

1. Nature néoplasique des FA

Dans les années 90, suite à l'individualisation des FA comme entité ayant des caractéristiques morphologiques et une histoire naturelle bien définies, la pathogénie de ces tumeurs demeurait inconnue. La nature infiltrative des tumeurs et leur évolution parfois agressive les rapprochaient de processus néoplasiques mais les cas de régression spontanée faisaient plutôt penser qu'elles appartenaient au groupe des processus réactionnels (comme les cicatrices chéloïdes).

La nature néoplasique d'une prolifération tumorale est définie par sa clonalité. Deux publications ont démontré cette clonalité dans les années 1996-1997 en utilisant la même méthode, celle de l'inactivation du chromosome X. Cette méthode a été clairement établie comme capable de démontrer l'origine clonale des tumeurs humaines (Vogelstein *et al.* 1985) (Allen *et al.* 1992). Elle se base sur le fait qu'un seul chromosome X est actif chez la femme. Le second est inactivé précocement au cours de l'embryogenèse. Cette inactivation survient au hasard. Elle reste stable durant toute la vie de la cellule et est transmise aux cellules filles après division cellulaire. Elle est également stable après culture *in vitro* ou lorsque la cellule devient néoplasique. L'inactivation de nombreux gènes sur le chromosome X s'accompagne de variations dans la méthylation des régions CpG en 5' des gènes. Cette méthylation permet de reconnaître le chromosome X actif du chromosome X inactif en étudiant l'action différentielle d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation. Quand le site est méthylé, l'enzyme ne coupe pas l'ADN. Par PCR, on étudie ainsi les sites de méthylation du gène humain du récepteur aux androgènes (HUMARA). Dans un processus polyclonal, on retrouvera une inactivation du chromosome X aléatoire dans les cellules (d'origine paternelle et maternelle) alors que dans un processus monoclonal, on retrouvera l'inactivation du même chromosome X dans toutes les cellules.

A partir, respectivement, de 4 cas et 20 cas de FA chez des femmes, Li et Alman ont démontré ainsi la clonalité de ces tumeurs (Li *et al.* 1996)(Alman *et al.* 1997). Non seulement, les caractéristiques d'inactivation sont identiques dans les cellules de FA mais elles sont aussi similaires entre la tumeur primitive et sa récurrence, confirmant que la tumeur récidivante provient du même clone que la tumeur primitive. Cette clonalité a également été démontrée par des analyses cytogénétiques montrant que les trisomies 8 et 20 sont des anomalies stables dans les FA primitives et leurs récurrences et non pas des anomalies aléatoires (Fletcher *et al.* 1995).

Toutefois, la clonalité démontrée par les 2 techniques pré-citées peut également se rencontrer dans des tumeurs bénignes et ne signe pas la malignité d'une tumeur (Bridge *et al.* 1999) (Kopp *et al.* 1997). Bridge *et al.* ont retrouvé des trisomies 8 dans des dysplasies ostéofibreuses et Kopp *et al.* des inactivations non aléatoires du chromosome X dans des leucocytes sains. La question de la malignité ou de la bénignité des FA n'est pas résolue. Cliniquement, l'absence de métastases oriente vers un caractère bénin mais l'agressivité

loco-régionale plutôt vers un caractère malin. Il n'existe aucun critère biologique ou histologique signant de manière formelle la malignité d'une tumeur.

L'article référence de Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011) retient 6 caractéristiques biologiques fondamentales du cancer, dont certaines ont été explorés dans les FA :

- Le maintien de signaux de prolifération regroupe plusieurs mécanismes : activation des voies de signalisation (e.g. mutations activatrices de *BRAF* ou *PI3K*), inhibition de rétrocontrôle négatif (e.g. mutation *RAS* ou *PTEN*), activation d'oncogènes (e.g. *RAS MYC RAF*).

La présence de ces mutations n'a pas été recherchée dans les FA. *PTEN* est exprimé en IHC dans 4/7 FA (Chugh *et al.* 2010), *KRAS* n'est pas muté dans 8 FA (Miyaki *et al.* 1993).

- L'échappement aux inhibiteurs de croissance regroupe les mécanismes de perte d'inhibition de contact (e.g. NF2 ou LKB1), d'échappement aux effets anti-prolifératifs de TGFβ et d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (e.g. Rb ou p53).

L'expression de Rb et p53 a été recherchée dans les FA et comparée à celle d'autres tumeurs d'origine fibroblastiques, certaines bénignes (Muller *et al.* 1996) et d'autres malignes (Hoos *et al.* 2001). Muller *et al.* concluent que la perte d'expression de Rb puisse avoir un rôle dans la prolifération des FA. Hoos *et al.* retrouvent que l'expression de ces 2 gènes suppresseurs de tumeur est corrélée à l'agressivité biologique des tumeurs.

Auteur, année	Tumeurs	pRb	Ki67	p53	Bcl 2
Muller <i>et al.</i> 1996	FA	0/13	-	0/13	-
	Fibromatose plantaire	6/6	-	0/6	-
Hoos <i>et al.</i> 2001	FA	24/24	24/24	23/24	0/24
	FS-BG	11/25	17/25	20/25	12/25
	FS-HG	1/14	2/14	10/14	8/14
Gebert <i>et al.</i> 2007	FA	-	36/37	12/37	-
Stalinska <i>et al.</i> 2009	FA	35/50	13/50	-	-

FS-BG/HG : Fibrosarcome de bas grade/haut grade

Tableau 4 Expression des « marqueurs de malignité » en IHC
(C. Gebert *et al.* 2007) (Stalinska *et al.* 2009)

L'expression du récepteur de TGFβ et de SMAD 2/3 (reflétant l'activité de la voie de TGFβ) a été comparée en IHC entre 27 échantillons de FA, 14 de cicatrices et 6 de tissus fibreux normal. Elle est élevée dans les FA et les cicatrices et absente dans les tissus normaux. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Bacac (Bacac *et al.* 2006) étudiant l'expression génique de TGFβ.

- La résistance à la mort cellulaire regroupe les phénomènes d'augmentation de signaux de survie (e.g. IGF) et l'augmentation de signaux anti-apoptotiques (e.g. Bcl2).

L'étude de Hoos précitée confirme la surexpression de Bcl2 dans les cancers contrairement aux FA.

- L'induction d'une angiogénèse est médiée positivement par le VEGFA et négativement par TSP-1.

Plusieurs publications rapportent une augmentation des phénomènes d'angiogénèse dans les FA. Le taux de VEGF est plus élevé dans les prélèvements de FA que dans les prélèvements de cicatrice ou de peau (Mills *et al.* 2000) et la densité de microvaisseaux est un facteur de récurrence (Romero *et al.* 2012) et (Matono *et al.* 2011).

- L'activation des phénomènes d'invasion et de métastases : c'est un élément clé de la description clinique des FA et une question majeure. Dans l'article de Hanahan comme dans les autres articles portant sur ce sujet, les phases d'invasion et de métastases sont traitées comme une seule entité sous tendue par les mêmes facteurs biologiques (perte de E cadhérine, transition épithélio-mésenchymateuse), l'invasion étant le premier stade avant les métastases (Talmadge and Fidler 2010). Or, dans le cas des FA, les tumeurs peuvent avoir des phénomènes d'invasion locale très importants sans jamais donner de métastases. Les mécanismes biologiques précis discriminants ces 2 phases sont inconnus. Les FA pourraient représenter un excellent modèle à étudier pour répondre à cette question.
- La possibilité d'une immortalité répliquative par échappement aux mécanismes qui contrôlent la réplication infinie. Le rôle des télomères n'a jamais été exploré dans les FA.

Dans la même idée de typer la nature cancéreuse ou non des FA, une publication a rapporté des travaux portant sur la comparaison de profils d'expression génique de FA avec ceux de tumeurs bénignes : les fasciites nodulaires (Bacac *et al.* 2006). Les gènes surexprimés chez les FA comparativement aux fasciites nodulaires peuvent se regrouper en 3 grands groupes :

- les gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt : les protéines de cette voie (*AXIN2*, *SFRP*), les régulateurs de cette voie (*MITF*, *PTPRF*) et les gènes cibles de cette voie (*EPHB3*, *PITX2*, *WISP-1*).
- les gènes impliqués dans la voie TGF- β (surexpression de *TGF- β 2* et sous-expression des inhibiteurs de TGF : *BAMBI* et *SMAD7*).
- les gènes impliqués dans la différenciation : *MDK*, *NRG1*, *NPTX2* et *NEFH*.

Une autre publication qui avait également rapporté les profils d'expression génique de FA (en les comparant à différents prélèvements de tissu sain cette fois), retrouvait des similitudes dans la surexpression de gènes dans les FA : *EPHB3*, *NRG1*, *NPTX2*, *TGF- β 3*, *WISP-1* (Skubitz and Skubitz 2004).

Il n'est pas possible de rattacher de manière formelle l'expression de ces protéines ou de ces gènes à un caractère bénin ou malin des FA.

En 2010, l'équipe d'Alman a approfondi les travaux pour caractériser le clone cellulaire formant les FA (Wu *et al.* 2010). Ils ont mené des expériences *in vitro* et *in vivo* leur permettant d'aboutir à un faisceau d'arguments montrant que ce clone était issu de cellules souches mésenchymateuses :

- les cellules de FA expriment des gènes et des marqueurs de surface caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses,
- dans les modèles murins porteurs de mutation *APC* (*Apc^{wt/1638N}*) et donc prédisposés au développement de FA, le nombre de tumeurs développées est proportionnel au nombre de cellules souches mésenchymateuses,

- ces mêmes souris *Apc*^{wt/1638N} croisées avec des souris déficientes en progéniteurs mésenchymateux développent moins de FA comparées à celles ayant des taux standards de progéniteurs (et alors que le nombre de polypes intestinaux développés restait identique)
- l'injection de cellules souches mésenchymateuses porteuses d'une mutation oncogénique dans des souris immunodéficientes induit des proliférations cellulaires aberrantes.

Carothers (Carothers *et al.* 2012) est allé plus loin en montrant que les FA sont composées non seulement de cellules souches mésenchymateuses mais aussi de fibrocytes CD34⁺ qui stimulent l'angiogénèse pendant les phases de cicatrisation ou de progression tumorale. Il a également montré que les cellules souches mésenchymateuses des FA sont des cellules pluripotentes ayant la capacité de se différencier en chondrocytes, adipocytes et ostéocytes.

Les FA sont donc des tumeurs monoclonales issues de cellules souches mésenchymateuses, présentant certaines mais pas toutes les caractéristiques biologiques de cellules cancéreuses.

2. Carcinogénèse : implication de la voie Wnt

En 1982, Harold Varmus découvre que l'activation d'un gène, nommé initialement *Int1* (integration 1), induit la formation de tumeur dans la glande mammaire de souris (Nusse and Varmus 1982). Il est l'homologue, chez le mammifère, du gène dont la mutation induit la formation de drosophiles sans ailes : *Wingless* (gènes *Int* et *Wing* : gène *Wnt*). Cette découverte représente l'identification du premier élément de la voie Wnt. Dans les années 80 puis 90, les différents éléments de cette voie sont identifiés et leur rôle se précise. Il est intéressant de noter que souvent, ces différents éléments sont découverts parallèlement, par différentes équipes, et que leur connexion avec la voie Wnt se fait dans un second temps. Telle qu'elle est connue aujourd'hui, cette voie peut se schématiser ainsi (Klaus and Birchmeier 2008; Reya and Clevers 2005) :

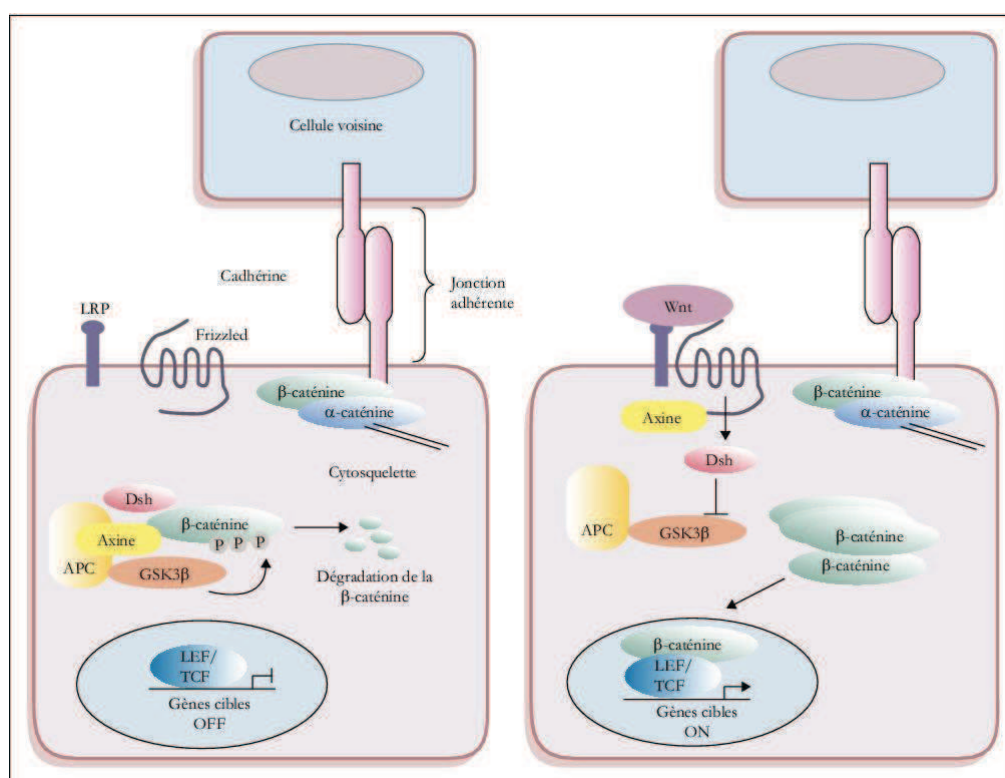


Figure 6 Schématisation de la voie Wnt/β caténine en conditions physiologique (à gauche) et pathologique (à droite) (d'après T. Reya & H. Clevers, Nature 2005)

La β-caténine est une protéine intra cellulaire, intégrée dans un complexe contenant également la E-cadhérine et l'α-caténine, impliqué dans les jonctions avec les cellules voisines et le cytosquelette. APC est une protéine cytoplasmique, régulant la signalisation intracellulaire, de la membrane cellulaire au noyau. En condition physiologique, la β-caténine nouvellement synthétisée se lie à APC et Axine dans un complexe de destruction. CK1α et GSK-3β, inclus dans le même complexe, entraînent la phosphorylation des résidus Sérine et Thréonine de la partie N-terminale de la β-caténine. La β-caténine est alors dégradée par le protéasome via une interaction avec la β-TrCP, un composant du complexe E3 ubiquitine ligase. Au niveau nucléaire, les protéines de la famille Groucho/TLE se lient aux facteurs de transcription de la famille TCF-LEF et agissent comme co-répresseurs de la transcription.

Quand le ligand Wnt se fixe sur son récepteur Frizzled, ou en cas de mutation des gènes qui contrôlent cette stabilité de la β-caténine (APC, axine ou la β-caténine elle-même), ce

système est déficient ; stabilisée, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée vers le noyau. Là, elle entre en compétition directe avec les protéines de la famille Groucho/TLE et les déplace. Elle se lie aux facteurs de transcription TCF et LEF et induit ainsi la transcription de gènes cibles responsables de la carcinogénèse.

Ces gènes cibles de la voie Wnt sont des gènes impliqués dans :

- la différenciation cellulaire,
- la signalisation: *VEGF*, *FGF4*, *FGF18*,
- la prolifération: *MYC*, *cycline D1*,
- l'adhésion : *E-cadhérine*, *NRCAM*,
- la voie Wnt elle-même : *Fzd*, *Axine 2*, β -*TrCP*, *TCF-LEF*, démontrant la capacité d'auto-régulation (positive et négative) de la voie.

Au total, plus d'une cinquantaine de gènes sont actuellement recensés comme cibles de la voie Wnt chez l'homme. Roel Nusse, qui a mené les travaux aboutissant à la découverte du gène *Wnt* avec H. Varmus précité, a construit un site internet entièrement dédié à la voie Wnt dans lequel cette liste de gènes cibles est régulièrement mise à jour (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

La voie Wnt fait partie des grandes voies de signalisation dont la fonction est essentielle lors du développement embryonnaire, impliquée dans les processus de prolifération cellulaire, survie et différenciation. Pendant le développement, son activité est régulée précisément et plus tard, l'échappement à ce contrôle peut induire des cancers et d'autres maladies. Des mutations activatrices d'oncogènes et des mutations inhibitrices de gènes suppresseurs de tumeurs d'éléments de la voie Wnt ont été identifiés comme responsables de la carcinogénèse de nombreux cancers.

Ce n'est pas tant par l'action de son ligand Wnt, du récepteur Frizzled lui-même ou des interactions avec les cellules voisines que s'explique le mécanisme par lequel cette voie de signalisation est impliquée dans la carcinogénèse mais plutôt par des modifications de ses deux composants protéiques intracellulaires principaux : APC et β caténine, induisant la transcription de gènes cibles. *APC* agit comme un gène suppresseur de tumeur alors que *CTNNB1* agit comme un oncogène.

Les FA peuvent se développer dans 3 types de contexte clinique :

- de manière sporadique : la FA survient de manière spontanée, sans être associée à d'autres pathologies particulières
- dans le cadre d'un syndrome de Gardner (MIM 175100) : la FA survient dans un contexte familial de polypose colique, le sujet et sa famille présentent des centaines de polypes intestinaux, des cancers coliques et des tumeurs bénignes comme des fibromes, des ostéomes du crâne ou des maxillaires, des lipomes sous-cutanés, des myomes ; des tumeurs thyroïdiennes ou surrénaliennes ; des hypertrophies congénitales de l'épithélium pigmentaire rétinien
- dans le cadre de « fibromatose infiltrative familiale » également appelée « maladie de desmoïde héréditaire » (MIM135290) : la FA se développe dans un contexte familial de FA, le plus souvent intra-abdominal et sans polypose colique associée

Le syndrome de Gardner et la fibromatose infiltrative familiale sont des maladies génétiques liées à des mutations du gène *APC*.

3. APC

En comparant les taux d'incidence de carcinomes coliques se développant ou non sur des polypes en fonction de l'âge, Ashley évoque en 1969 et pour la première fois, que le gène de la polypose puisse diminuer le nombre d'évènements nécessaires à la muqueuse intestinale pour qu'elle devienne néoplasique (Ashley 1969), faisant écho à la théorie de Knudson, établie sur le rétinoblastome (Knudson 1971). Il suggère également que le développement d'un carcinome lieberkühnien sur un polype adénomateux dépende des mêmes facteurs externes que pour les cancers non précédés de polypose. La théorie de Knudson est aujourd'hui totalement validée par les découvertes qui ont été faites sur les mécanismes de carcinogénèse dans un contexte de polypose : pour survenir, un cancer nécessite 2 évènements mutationnels. Dans les cancers héréditaires, une mutation germinale est transmise et une seconde mutation, de type somatique, survient et enclenche le processus de carcinogénèse. Dans les cancers non héréditaires, 2 mutations somatiques sont nécessaires.

De plus, et contrairement à ce qu'avait initialement décrit Knudson qui pensait que ces 2 mutations étaient indépendantes l'une de l'autre, il a été démontré dans les PAF que la nature et la localisation de la mutation germinale détermine la nature et la localisation de la mutation somatique et qu'à elles 2, elles influencent le phénotype de la maladie.

Vers 1990, plusieurs publications majeures (Leppert *et al.* 1987; Ashton-Rickardt *et al.* 1989; Kinzler *et al.* 1991; Groden *et al.* 1991) (Cottrell *et al.* 1992) établissent des mutations (de type délétion) du gène APC en 5q21-22 comme étant caractéristiques de la polypose adénomateuse familiale. Ces anomalies sont également décrites dans les FA développées dans le cadre d'un syndrome de Gardner (Okamoto *et al.* 1990; Miyaki *et al.* 1993). Ces mutations représentent la mutation germinale, premier évènement conduisant vers la carcinogénèse. Elles entraînent la formation d'un codon STOP qui aboutit à l'expression d'une protéine APC tronquée. Elles se situent principalement dans la moitié 5' du gène ; elles sont donc situées en amont des sites régulateurs de la β caténine qui sont de 2 sortes :

- 7 sites de répétition de 20 acides aminés qui correspondent aux sites de fixation et de « down regulation » de β caténine

- 3 sites de répétition d'environ 20 acides aminés contenant un motif Ser-Ala-Met-Pro, qui assurent la fixation avec l'Axine. Ces 3 « SAMP repeats » sont distribués au milieu des sites de « down regulation » de la β caténine. Ces sites de fixation à l'axine sont essentiels dans la régulation des taux intra cellulaires de β caténine. Un modèle murin de protéine APC tronquée mais conservant un seul « SAMP repeat » donne des souris viables et ne développant pas de tumeurs (Smits *et al.* 1999). Dans la même idée, un autre modèle murin se basant sur la transfection uniquement de la partie centrale d'APC, contenant tous les sites de fixation à la β caténine et à l'axine, montre que ces sites sont suffisants pour éviter le développement de tumeur (Shih *et al.* 2000).

Il y a 2 sites de mutation germinale prédominants : au niveau des codons 1061 (a) et 1309 (b). Lorsque la mutation germinale survient sur le codon 1601, ou en amont de la MCR (Mutation Cluster Region), la seconde mutation, somatique, survient préférentiellement au sein de la MCR (hot-spots 1 à 5). La protéine tronquée conserve alors 1 voire 2 sites de « down regulation » de la β caténine (Δ APC 1). Lorsque la mutation germinale survient au sein de la MCR (b ou c), il y a, le plus souvent, une perte de l'allèle sauvage (Δ APC 2). (Lamlum *et al.* 1999)

Les mutations d'APC aboutissent ainsi à une protéine tronquée qui conserve 1 à 2 sites de « down regulation » de la β caténine. En effet, les cellules tumorales doivent conserver une « down regulation » basale de la β caténine car l'accumulation excessive de β caténine dans le noyau induit la mort cellulaire (Kim *et al.* 2000).

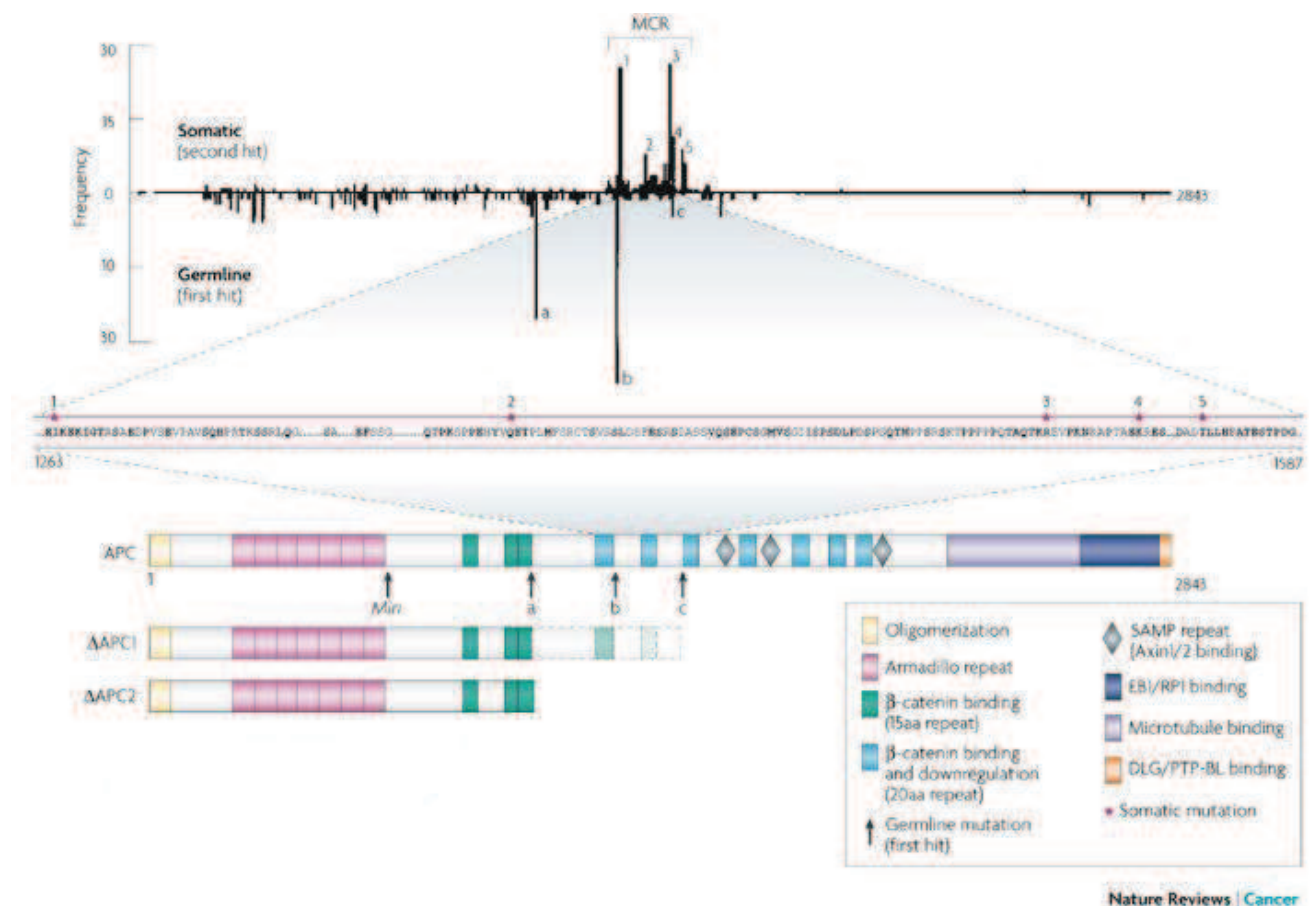


Figure 7 Représentation schématique de la protéine APC et des sites de mutations génétiques correspondant. APC comporte 2843 codons. La MCR se situe entre les codons 1286 et 1513 et regroupe la majorité des sites de mutation somatique (d'après Klaus Nature Review 2008)

Les FA qui se développent dans le contexte d'un syndrome de Gardner sont génétiquement comparables aux carcinomes colo-rectaux auxquelles elles sont associées. Plusieurs études ont bien établi cette concordance entre mutations germinale, somatique, et le phénotype des FA. Lamlum *et al.* (Lamlum *et al.* 1999) ont recensé, dans les FA survenant dans un contexte de PAF, les concordances entre mutations germinale et somatiques. Ils en concluent que la région de la mutation germinale d'APC associée à la perte d'allèle dans les FA est plus distale que la région correspondante dans les adénomes. Ceci explique la différence observée dans la sélection de la mutation d'APC entre les 2 types de tumeurs.

Table 2 Germline and somatic mutations in FAP-associated desmoid tumors

Tumor	Germline	Somatic
PLK126*	L848X	1458FS(del10bp)
PLK59*	1061FS(del4bp)	1581FS(del8bp)
P5	1061FS(del5bp)	1472FS(del14bp)
GD-13 #61b**	Y1075X	1461FS(del4bp)
P2	D1084X	1542FS(del1bp)
PLK56*	1105FS(del1bp)	1461FS(del2bp)
PLK111*	S1110X	1426FS(ins82bp)
P12	Q1228X	1859FS(del31bp)
PLK124*	1309FS(del5bp)	1452FS(del1bp)
GD-11 #63**	1309FS(del5bp)	1551FS(del4bp)
P10	E1397X	1543FS(del175)
P9.1	R1450X	LOH
P9.2	R1450X	LOH
P7	1461FS(del2bp)	1483FS(del6ins2bp)
P8.1	1462FS (del2bp)	LOH
P8.2	1462FS (del 2bp)	LOH
PLK42*	1462FS(del4bp)	LOH

Tumors are shown in germline mutation order. Asterisks indicate tumors that have been reported: *, ref. 23; **, ref. 24. Desmoids P8.1 and P8.2 are independent tumors from the same individual, as are P9.1 and P9.2. LOH, allelic loss. All tumors with LOH had lost the 'wild-type' allele (except for those from P9, in which the origin of the lost allele could not be determined). Here, 11 of 11 desmoids from patients with germline APC mutations proximal to codon 1,400 have truncating somatic mutations (all frameshifts) distal to codon 1,425. In contrast, 5 of 6 desmoids from four patients with germline mutations distal to codon 1,449 show allelic loss. Although the sample set comprises only 17 tumors, this difference is significant ($P < 0.001$, Fisher's Exact test). There is also an apparent 'desmoid somatic mutation cluster region' distal to codon 1,425; there is also a reported association between germline APC mutations beyond codon 1,444 and desmoid disease.

Tableau 5 Correspondance entre les sites de mutations germinale et somatique sur le gène APC

De nombreuses publications ont étudié cette corrélation entre la localisation de la mutation germinale d'APC et le risque de survenue de FA dans un contexte de syndrome de Gardner. Globalement, il semble que les FA se développent principalement lorsque cette mutation est située au-delà du codon 1444, et associé à une perte de l'allèle sauvage.

Bertario (Bertario *et al.* 2001) établit une corrélation statistique entre le site de la mutation germinale d'APC et le risque de développer une FA : pour une mutation d'APC située au-delà du codon 1444, le risque de développer une FA est augmentée de 12 fois, comparé aux patients pour lesquels la mutation est située en amont. Les mutations situées au-delà du codon 1309 sont associées à un risque 17 fois plus élevé de développer une FA que les mutations situées en amont du codon 452. Davies, Gebert et Caspari retrouvent eux aussi une incidence particulièrement élevée de FA chez les patients dont la mutation germinale se situe au niveau du codon 1444 (Davies *et al.* 1995; Gebert *et al.* 1999; Caspari *et al.* 1995). Wallis établit 3 groupes de patients en fonction de la localisation de la mutation APC : groupe 1 - codons 177 à 452 ; groupe 2 – codons 457 à 1309 ; groupe 3 – codons 1395 à 1493 (Wallis *et al.* 1999). C'est dans le groupe 3 que se développent le plus de FA. Dobbie retient lui le codon 1403 comme étant associé avec le plus de manifestations extra-coliques de PAF, dont les FA (Dobbie *et al.* 1996).

Plusieurs modèles murins ont été développés pour explorer ce mécanisme. Les mutations situées sur les codons 716 ou 850, du côté 5' du gène APC, aboutissent à l'expression d'une protéine tronquée, stable qui n'entraîne pas le développement de FA. Lorsque la mutation Apc1638N est présente, la protéine est indétectable et la pénétrance de FA est de 100%. Son équivalent Apc1638T aboutit lui à une protéine tronquée mais stable et active ; aucune FA ne se développe.



Protéine APC

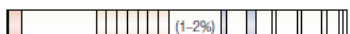
Modèle	Mutation génétique	Produit du gène	Phénotype	Référence
APC ^{1638N/+}	Mutation déphasante sur codon 1638	 (1-2%) Protéine tronquée indétectable	Pénétrance 100% FA multifocales	Smits <i>et al.</i> 1998
APC ^{1638T/1638T}	Mutation déphasante sur codon 1638	 Protéine tronquée stable	Pas de FA	Smits <i>et al.</i> 1999
APC ^{Min/+}	Mutation non-sens sur codon 850	 Protéine tronquée stable	Pas de FA Tumeurs intest.	Su <i>et al.</i> 1992
APC ^{Δ716/+}	Mutation tronquante sur codon 716	 Protéine tronquée stable	Pas de FA Tumeurs intest.	Oshima <i>et al.</i> 1995

Tableau 6 Principales caractéristiques des modèles murins étudiant le rôle d'APC dans l'étiologie des FA. Adapté à partir de Fodde 2001 Nat Rev et Lips 2009

(Smits *et al.* 1999; Su *et al.* 1992; Oshima *et al.* 1995; Smits *et al.* 1998)

Une méta-analyse publiée en 2011 et étudiant 4625 patients avec PAF, identifie 3 facteurs comme étant statistiquement associés au risque de survenue de FA : la mutation d'APC au-delà du codon 1399 (OR 4.37), une chirurgie abdominale (OR 3.35) mais surtout, avec un OR à 7.02, des antécédents familiaux de FA (Sinha *et al.* 2011). Les auteurs concluent qu'au-delà de cette corrélation génotype/phénotype lié à la mutation d'APC, d'autres gènes modifiés sous-tendent sûrement le développement de FA.

A côté des FA qui se développent dans un contexte de syndrome de Gardner, il existe un autre groupe de FA d'origine génétique : celles qui se développent dans le contexte d'une « fibromatose infiltrative familiale », également appelée « maladie des desmoïdes héréditaires ». Elles sont liées à des mutations germinales d'APC situées en 3' (codons 1924, 1962, 1987, 2643) associées à une perte de l'allèle sauvage (Eccles *et al.* 1996; Benoit *et al.* 2007; Couture *et al.* 2000). Le phénotype de ces maladies associe une pénétrance de 100% de FA multifocales et une polypose colique quasi inexistante.

4. Beta-caténine

L'accumulation intra cellulaire de β -caténine est l'évènement-clé de la carcinogénèse médiée par un dysfonctionnement de la voie Wnt. Les articles rapportant les résultats d'analyses immunohistochimiques de FA sporadiques montrent que l'expression de β -caténine est plus élevée dans les cellules tumorales que dans les cellules avoisinantes et que la β -caténine est alors localisée au niveau nucléaire plutôt que cytoplasmique (Alman *et al.* 1997; Tejpar *et al.* 1999; Saito *et al.* 2002; Gebert *et al.* 2007; Huss *et al.* 2013). Cette surexpression protéique a été caractérisée de plusieurs manières :

- elle a été identifiée comme facteur pronostique péjoratif de récurrence locale des tumeurs (Gebert *et al.* 2007).

- son mécanisme est lié à une diminution de la dégradation protéique (i. e. stabilisation) pour les uns, puisque les taux d'ARNm relatifs à cette surexpression restent stables (Alman *et al.* 1997). D'autres retrouvent au contraire des taux d'ARNm supérieurs suggérant également une hyper expression par augmentation de la transcription du gène (Saito *et al.* 2002).

- dans les FA sporadiques, elle serait la conséquence de mutations du gène de la β -caténine (*CTNNB1*) ou d'*APC*. *CTNNB1* est situé sur le chromosome 3p22, une région qui est fréquemment le siège de mutations dans les pathologies tumorales (Trent 1995). Trois mutations (T41A, S45F et S45P) et 1 délétion situées sur l'exon 3 de *CTNNB1* sont retrouvées dans environ 80% des FA sporadiques (Miyoshi *et al.* 1998) (Tejpar *et al.* 1999; Tsuyoshi Saito *et al.* 2002; Lazar *et al.* 2008; Le Guellec *et al.* 2012; Huss *et al.* 2013). Ces codons 41 et 45 sont situés au niveau des sites de phosphorylation de la protéine par le GSK-3 β .

Ces mutations sont spécifiques puisque lorsqu'elles ont été recherchées parallèlement sur 260 FA et 191 autres tumeurs à cellules fusiformes (comprenant des sarcomes, des processus réactionnels et des tumeurs bénignes), aucune mutation n'a été détectée dans le groupe des tumeurs autres que les FA (Le Guellec *et al.* 2012). Leur intérêt diagnostique est donc maintenant bien établi.

L'impact pronostique de ces mutations sur les FA sporadiques a été étudié : la survie sans récurrence est plus longue chez les patients présentant une tumeur *CTNNB1* sauvage que chez ceux présentant une tumeur *CTNNB1* mutée, d'autant plus lorsqu'il s'agit de la mutation S45F (Lazar *et al.* 2008; Colombo *et al.* 2013; Mullen *et al.* 2013).

Un seul modèle murin a été développé sur le sujet : la stabilisation de la β -caténine dans un modèle de souris transgénique aboutit à la formation de FA chez 18 souris sur 24 (75%) au bout de 3 mois (Cheon *et al.* 2002).

Le caractère mutuellement exclusif des mutations *APC* et *CTNNB1* n'est pas clairement établi. Chez les patients présentant des FA sporadiques, plusieurs études publiées ont recherché la présence de mutations d'*APC* parmi les tumeurs qui ne présentaient pas de mutation de *CTNNB1*.

Auteur	Mutation CTNNB1	Mutation APC
Alman, 1997		3/6
Miyoshi, 1998	7/13	0/13
Giarola, 1998		0/16 mut. germinale 2/16 mut. somatique
Tejpar, 1999	22/42	9/42
Brueckl, 2005		0/8

Tableau 7 Etude du caractère mutuellement exclusif des mutations de CTNNB1 et APC dans les FA sporadiques
(Alman *et al.* 1997; Giarola *et al.* 1998; Tejpar *et al.* 1999; Brueckl *et al.* 2005)(Miyoshi *et al.* 1998)

La présence de mutations somatiques d'APC est possible dans les FA sporadiques dont le gène *CTNNB1* est sauvage. Toutefois, aucune de ces études ne rapporte de résultats sur la recherche simultanée des 2 types de mutations sur une même tumeur.

La responsabilité des mutations d'APC et *CTNNB1* en tant qu'altérations oncogéniques responsables de la transformation de cellules normales en cellules tumorales de FA reste inconnue.

5. Cytogénétique

Plusieurs publications rapportent les résultats d'étude des anomalies chromosomiques des FA. Leur interprétation doit tenir compte du fait que certaines ont été réalisées sur des prélèvements de tumeurs incluses en paraffine et d'autres sur des prélèvements congelés et qu'il a été démontré que cela puisse induire des biais. Globalement, les anomalies chromosomiques clonales sont présentes dans 27 à 46% des cas de FA. La première conclusion de ces études est de confirmer la nature clonale de la prolifération de FA. La seconde est d'identifier un certain nombre d'anomalies récurrentes :

- perte du chromosome 5 (Bridge *et al.* 1999; Larramendy *et al.* 1998; De Wever *et al.* 2000; Salas *et al.* 2010; Erben *et al.* 2012): la région perdue du chromosome 5 contient le locus du gène *APC*. Elle est identifiée à la fois dans les FA survenant dans un contexte de syndrome de Gardner mais aussi dans des FA sporadiques. Cette donnée confirme l'importance des anomalies du gène *APC* dans la carcinogénèse des FA.
- gain des chromosomes 8 et 20 (Fletcher *et al.* 1995; Mertens *et al.* 1995; Qi *et al.* 1996; Larramendy *et al.* 1998; De Wever *et al.* 2000; Brandal *et al.* 2003; Mayer *et al.* 2007; Salas *et al.* 2010; Erben *et al.* 2012): les trisomies 8 et 20 sont des anomalies fréquemment retrouvées dans les FA. Il a même été évoqué que la présence d'une trisomie 8 soit un facteur de mauvais pronostic (Fletcher *et al.* 1995). Toutefois, ces anomalies sont rares dans les 2 études les plus récentes menées par CGH (Salas *et al.* 2010; Brandal *et al.* 2003) et plus fréquentes dans les anciennes études qui utilisaient des caryotypes, et pour lesquelles la mise en culture cellulaire préalable au caryotype a pu sélectionner et surestimer la présence des clones porteurs de trisomies.
- perte du chromosome 6 (Salas *et al.* 2010; Brandal *et al.* 2003; Larramendy *et al.* 1998): les régions délétées ne sont pas les mêmes dans les différentes études et leur interprétation est difficile.

L'interprétation et la signification de ces anomalies cytogénétiques dans la carcinogénèse des FA restent compliquées.

6. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans les FA, 2 approches semblent intéressantes : l'exploration du micro environnement et la recherche par les nouvelles méthodes à haut débit (protéomique, génomique....).

Mignemi *et al.* (Mignemi *et al.* 2012) ont étudié, par immunohistochimie, l'expression de TGF β qui est toujours présente dans les FA (par rapport au tissu fibreux représentant un témoin négatif). L'expression parallèle de la forme phosphorylée de SMAD 2/3 confirme l'activation de la voie du TGF β . Le TGF β est une cytokine sécrétée par de nombreuses cellules, dont les macrophages, sous l'influence de stimuli inflammatoires. Il a une action anti-proliférative et contrôle la différenciation cellulaire. Il a déjà été démontré qu'il pouvait activer la voie Wnt/ β caténine dans des fibroblastes tumoraux et réactionnels (Sato 2006; Cheon *et al.* 2006). Romero *et al.* (Romero *et al.* 2012) se sont intéressés aux macrophages associés à la tumeur dans les FA. Leur nombre est directement corrélé à la densité de microvaisseaux de l'angiogénèse et tous les 2 sont des marqueurs de mauvais pronostic. Enfin, le niveau d'expression de la protéine COX-2 dans les mastocytes est corrélé à la

douleur liée aux FA, correspondant très probablement à l'importance des phénomènes inflammatoires (Emori *et al.* 2014).

Une approche radicalement différente et qui s'est énormément développée ces dernières années, consiste à rechercher des pistes d'exploration de la maladie par des techniques à haut débit.

L'expression de protéines détectée par spectométrie de masse et analysée de manière différentielle entre des prélèvements d'ostéosarcomes et de FA a identifié principalement le collagène II et la périostine comme étant spécifiques des FA (Rao *et al.* 2013). Une signature d'expression génique a été établie à partir de l'ARN de 12 FA et 6 fasciites nodulaires analysés grâce à 10 000 spots d'ADNc (Bacac *et al.* 2006). Plusieurs grands groupes de transcrits ont été retenus surexprimés dans les FA : des protéines à activité tyrosine-kinase (récepteurs ou non), des facteurs de transcription, des membres des voies de signalisation Wnt, TGF- β , IFN, TNF. L'expression de 33 000 gènes a également été explorée dans les FA et comparée à celle de tissus sains (Skubitz and Skubitz 2004). Les auteurs ont retenu principalement l'expression des gènes ADAM12, WISP-1, SOX11 et FAP- α comme étant spécifiques des FA. La même équipe a confirmé plus tard que l'expression de ces gènes correspondait à une expression des protéines en IHC (Misemer *et al.* 2014). Le niveau d'expression (sauf celui de SOX11) semblait également corrélé avec le niveau d'activité tumorale représenté par le ratio de densité de la chromatine nucléaire. ADAM12 est impliqué dans les interactions cellules/cellules et cellules/matrice et son rôle a été démontré dans différents types de cancers. FAP a une activité gélatinase et collagénase mais son rôle précis dans les cancers n'est pas connu. WISP est une protéine sécrétée dans la matrice extra cellulaire qui agit comme facteur de croissance et dont la présence a été identifiée comme spécifique des FA dans une autre étude d'expression génique présentée ci dessus (Bacac *et al.* 2006). SOX 11 est un facteur de transcription nucléaire dont l'expression est dérégulée dans de nombreux cancers. Une autre approche, originale, a consisté à tester l'effet de 2 000 molécules sur la viabilité de cellules de FA en culture (Raymond Poon *et al.* 2012). Les auteurs n'ont étudié que les molécules qui inhibaient la viabilité cellulaire des cultures primaires de FA sans effet sur les fibroblastes sains également en culture. Ils ont retenu le Nefopam, capable de diminuer la prolifération cellulaire et les taux de β caténine *in vitro*, et d'induire une diminution du nombre et du volume tumoral dans les modèles *in vivo*. Enfin, une analyse des SNP de 9 FA a mis en évidence une nouvelle délétion en 8p23 dans 4 cas, correspondant au gène *CSMD1*, un gène suppresseur de tumeur (Erben *et al.* 2012).

Au total, les FA sont des tumeurs clonales issues de cellules souches mésenchymateuses dans lesquelles une dérégulation de la voie Wnt aboutit à la transcription de gènes cibles. Les mutations pilotes identifiées sont des mutations du gène *APC* quand les FA se développent dans un contexte de syndrome de Gardner et des mutations du gène *CTNNB1* quand les FA se développent de manière sporadique. Ces mutations sont devenues des outils diagnostiques puissants, fiables et intégrés dans les pratiques quotidiennes.

II. TRAVAUX DE RECHERCHE

A. FACTEURS PRONOSTIQUES

1. *Facteurs pronostiques cliniques*

A partir de: "Prognostic factors influencing progression-free survival determined from a series of sporadic desmoid tumors: a wait-and-see policy according to tumor presentation. Salas S, Dufresne A, Bui B, Blay JY, Terrier P, Ranchere-Vince D, Bonvalot S, Stoeckle E, Guillou L, Le Cesne A, Oberlin O, Brouste V, Coindre JM. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 10;29(26):3553-8 »

Et « A prognostic nomogram for prediction of recurrence in desmoid fibromatosis. Crago AM, Denton B, Salas S, Dufresne A, Mezhir JJ, Hameed M, Gonen M, Singer S, Brennan MF. *Ann Surg*. 2013 Aug;258(2):347-53 »

Contexte et objectifs:

Dans le cadre du programme européen « PERSEUS 1 » initié sous l'impulsion de l'association de patients « SOS Desmoïdes », un vaste recueil de données national multicentrique a été réalisé en 2008. Quatre-cent-vingt-six patients atteints de FA (dont 25 dans le cadre d'un syndrome de Gardner, non étudiés) diagnostiquées entre 1965 et 2008 ont été récéncés dans la « Conticabase ». Après confirmation du diagnostic par relecture des lames histologiques par le Groupe Sarcome Français (GSF), les données cliniques décrivant les antécédents du patient, les caractéristiques de la tumeur, toutes les étapes de son évolution et les traitements administrés étaient collectées de manière rétrospective.

L'article 1 présente la description de toutes ces données et la recherche de facteurs pronostiques de récurrence après exérèse chirurgicale qui lui a été associée. Lors de sa publication, il représentait la plus vaste série de FA jamais publiée.

Dans l'article 2, une cohorte de 495 patients du MSKCC atteints de FA et opérés était étudiée pour déterminer les facteurs pronostiques influençant la survie sans récurrence. La cohorte française multicentrique présentée ci-dessus a été utilisée comme cohorte de validation indépendante dans cette étude. Tous les patients de cette étude ont bénéficié d'une chirurgie d'exérèse et là encore, l'analyse a porté sur les facteurs prédisant la récurrence.

Facteurs pronostiques influençant la survie sans progression déterminés à partir d'une cohorte de tumeurs desmoïdes sporadiques : une stratégie de surveillance selon la présentation de la tumeur.

Rationnel Les tumeurs desmoïdes sont des proliférations mésenchymateuses fibroblastiques/myofibroblastiques avec une agressivité loco-régionale et une forte capacité à récidiver après le traitement initial. Nous présentons les résultats de la plus grande cohorte de tumeurs desmoïdes sporadiques jamais publiées pour déterminer les facteurs pronostiques de ces tumeurs rares.

Méthodes Quatre-cent-vingt-six patients avec un diagnostic de tumeur desmoïde étaient inclus, et les paramètres suivants ont été étudiés : âge, sexe, délai entre les premiers symptômes et le diagnostic, taille tumorale, localisation tumorale, chirurgie ou traumatisme préalable dans le site où se développe la tumeur, qualité des marges chirurgicales et contexte de desmoïde de la paroi abdominale chez une femme pendant ou dans les suites d'une grossesse.

Résultats En analyse univariée, l'âge, la taille tumorale, le site tumoral et la qualité des marges chirurgicales (R2 vs R0/R1) ont un impact significatif sur la survie sans progression. Les courbes de survie sans progression ne sont pas significativement différentes pour l'évaluation microscopique de la qualité de la résection chirurgicale (R0 vs R1). En analyse multivariée, l'âge, la taille tumorale, et la localisation tumorale ont des valeurs indépendantes. Trois groupes pronostiques pour la survie sans progression ont été définis sur la base du nombre de facteurs pronostiques défavorables indépendants (0 ou 1, 2 et 3).

Conclusion Cette étude démontre clairement qu'il y a différents sous-groupes pronostiques de tumeurs desmoïdes qui peuvent bénéficier de stratégies thérapeutiques différentes, dont une stratégie de surveillance.

Un nomogramme pronostique pour prédire la récurrence des fibromatoses desmoïdes

Objectif Construire un nomogramme post-opératoire pour estimer le risque de récurrence locale pour les patients atteints de tumeur desmoïde.

Rationnel La prise en charge standard des tumeurs desmoïdes est la résection chirurgicale mais les récurrences locales sont fréquentes. Les autres options sont l'observation ou les nouveaux traitements, mais peu de recommandations existent pour guider le choix des traitements.

Méthodes Les patients bénéficiant d'une résection chirurgicale entre 1982 et 2011 pour une desmoïde primitive ou localement récurrente étaient identifiés à partir d'une base de données prospective d'une seule institution. Des analyses par régression de Cox ont été utilisées pour évaluer les facteurs de risque et élaborer un nomogramme de récurrence, qui a été validé en utilisant une cohorte internationale et multicentrique de patients.

Résultats Les desmoïdes étaient opérées chez 495 patients (suivi médian de 60 mois). Parmi les 439 patients bénéficiant d'une résection complète, 100 (23%) ont récidivé. La survie sans récurrence locale à 5 ans était de 69%. Huit patients sont décédés de leur maladie, tous après une résection R2. La radiothérapie adjuvante n'était pas associée à une amélioration de la survie sans récurrence locale. En analyse multivariée, les facteurs associés à la récurrence étaient la localisation au niveau des extrémités, le jeune âge et la grande taille tumorale mais pas la qualité des marges. Les tumeurs de la paroi abdominale ont le meilleur pronostic (taux de survie sans récurrence locale à 5 ans de 91%). L'âge, la localisation et la taille étaient utilisés pour construire un nomogramme avec un indice de concordance de 0.703 en validation interne et 0.659 en validation externe. L'intégration de variables supplémentaires (marges R1, sexe, profondeur et présentation d'une tumeur primitive vs récurrente) n'améliorait pas de manière significative la concordance (indice de concordance interne de 0.707).

Conclusions Un nomogramme post-opératoire incluant seulement la taille, la localisation et l'âge prédit la récurrence locale et peut aider à conseiller les patients. Les thérapies systémiques peuvent être appropriées chez les patients jeunes présentant de grandes desmoïdes des extrémités mais la chirurgie seule est curative pour la plupart des lésions de la paroi abdominale.

Résultats, discussion et perspectives :

Les 2 points communs essentiels de ces 2 études sont :

- le nombre de cas inclus exceptionnellement élevé (des cohortes de respectivement 426 et 495 patients, validés par une cohorte de 274 patients) pour cette tumeur mésoenchymateuse rare, leur conférant une puissance d'analyse particulière,
- l'analyse multivariée identifiant les mêmes facteurs pronostiques: le jeune âge du patient, la localisation de la tumeur au niveau des extrémités et une grande taille tumorale sont des facteurs de récurrence après exérèse chirurgicale.

Au-delà des résultats discordants rapportés jusqu'ici par les différentes études portant sur ce sujet et présentés dans le § IC, la puissance et la concordance des résultats de ces 2 études peut nous permettre d'établir de manière formelle ces 3 facteurs cliniques (âge, localisation et taille) comme prédictifs de la récurrence après exérèse d'une FA.

Ces 2 études apportent ensuite chacune des réponses à des questions plus spécifiques.

L'étude de l'article 1 présente des résultats d'une puissance particulière de par les conditions d'inclusions et d'analyse des cas étudiés:

- la multiplicité des centres ayant participé (24) permet une vision globale de l'hétérogénéité des pratiques de prise en charge de ces tumeurs,
- la relecture collégiale des lames histologiques par un groupe expert assure un diagnostic de certitude des cas inclus, alors que les diagnostics anatomopathologiques erronés se rencontrent régulièrement pour cette tumeur difficile à analyser,
- l'exclusion des cas de FA survenant dans le cadre d'un syndrome de Gardner permet d'établir une cohorte homogène,
- la saisie des données collectées au dossier source de chaque patient et par peu d'intervenants améliore la qualité des informations recueillies.

Quelques notions, qui sont fréquemment évoquées dans la littérature mais très rarement analysées, ont été étudiées ici : le temps médian entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic de la maladie est relativement court puisqu'il est inférieur à 5 mois. Il ne semble pas influencer le pronostic des patients, ce qui n'est pas étonnant pour une tumeur qui ne métastase pas. De nombreux cas rapportés dans la littérature décrivent des FA se développant sur des sites chirurgicaux, cicatrices ou traumatismes. Dans cette étude, on retrouve effectivement que 8.4% des patients inclus avaient bénéficié, avant le diagnostic de FA, d'un acte chirurgical et 3.9% avaient subi un traumatisme sur le site où s'est ensuite développée la tumeur. Ces pourcentages suggèrent un possible lien de causalité. Biologiquement, plusieurs publications établissent un parallèle entre les phénomènes de cicatrisation et les FA : en augmentant le taux et l'activité de la β -caténine dans les fibroblastes, tumoraux ou non, le TGF β est impliqué dans la formation des cicatrices hypertrophiques et chéloïdes et des FA (amini 2007, sato 2006).

Enfin, on recense dans cette étude 33 cas de femmes développant une FA en cours de grossesse ou dans les mois qui suivent un accouchement. Les liens entre les hormones et les FA sont très probablement en jeu ici.

La description et l'analyse des cas nous permettent de confirmer certaines données de la littérature :

- parmi 27 patients surveillés, seuls 6 progressent (avec un long temps médian à progression de 19.7 mois) quand la grande majorité d'entre eux présente une maladie stable voire régressant spontanément (16 cas de stabilisation et 5 cas de rémission).
- le taux de récurrence, même après exérèse complète de la tumeur, est très élevé : 44%. Ceci se retrouve dans les bas taux de survie sans récurrence : 35% à 5 ans et 22.8% à 10 ans.
- dans cette large cohorte, aucun patient n'est décédé de cette tumeur.

Ces tumeurs ne sont quasiment jamais mortelles. Elles ne peuvent être graves que par les symptômes dont elles sont responsables au niveau loco-régional. Elles récidivent fréquemment après une exérèse chirurgicale, même d'excellente qualité. Toutes ces notions doivent absolument être intégrées dans les discussions de prise en charge des patients atteints de ces tumeurs. Ces notions sont exceptionnelles par rapport aux tumeurs cancéreuses dont s'occupent habituellement les oncologues, radiothérapeutes et chirurgiens cancérologiques.

Les facteurs pronostiques ont été établis sur l'analyse de la survie sans progression. Dans la mesure où près de 87% des patients de la cohorte ont initialement été opérés, cette analyse correspond essentiellement à des facteurs influençant la récurrence après exérèse chirurgicale. En analyse univariée, l'âge du patient inférieur à 37 ans, la taille tumorale supérieure à 7 cm, la localisation de la tumeur au niveau d'un membre ou de la fesse, et les marges chirurgicales macroscopiquement envahies sont des facteurs péjoratifs de la survie sans récurrence. Seuls les résidus macroscopiques sont de mauvais pronostic mais il n'y a pas de différence en taux de récurrence entre une exérèse de qualité R0 ou R1 (ces données sont concordantes avec l'analyse des données de la littérature détaillée dans le § IC). Ceci doit guider le geste chirurgical, s'il est décidé, pour limiter les séquelles fonctionnelles et/ou esthétiques de ces tumeurs qui ne métastasent pas. En analyse multivariée, seuls l'âge du patient, la taille et le site tumoral restent significatifs. Ceci confirme que la qualité des marges chirurgicales est forcément dépendante de la taille et de la localisation tumorale.

Un des caractères originaux de ce travail est lié au fait que les auteurs ont présenté la PFS en fonction de la présence d'un ou plusieurs facteurs pronostiques ce qui a permis d'établir la courbe suivante :

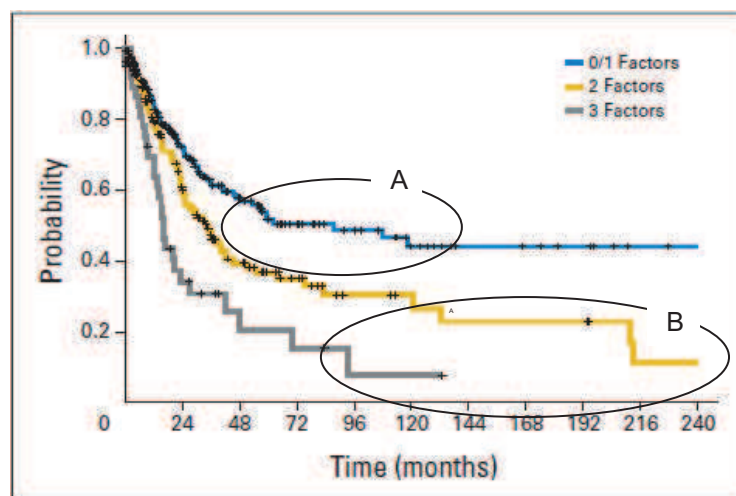


Fig 2. Probability of survival of patients with zero, one, two, or three factors.

Remarque A : La médiane de survie sans récurrence est de 41 mois. Ensuite, lorsqu'il y a 0 ou 1 facteur de mauvais pronostic, la courbe décroît très doucement, correspondant à un nombre très faible de récurrence. Il n'y a plus aucune récurrence après 120 mois. Ceci concorde avec les publications qui rapportent que presque toutes les récurrences surviennent dans les 3 ans après la chirurgie.

Remarque B : Les patients qui présentent 2 ou 3 facteurs de mauvais pronostic récidivent quasiment tous, plus ou moins tôt en fonction du nombre de facteurs.

Quand il n'y pas ou peu de facteurs de mauvais pronostic, 50% des patients sont définitivement guéris par la chirurgie. Quand il y a 2 ou 3 facteurs de mauvais pronostics, la récurrence est quasi systématique et donc, la chirurgie seule ne semble pas adaptée. Ces patients devraient être soit simplement surveillés, soit opérés et bénéficier d'un traitement complémentaire.

Pour établir la meilleure stratégie pour ces patients, les données scientifiques manquent. Il nous faut maintenant connaître les facteurs d'évolutivité d'une tumeur en place, non réséquée et surveillée. Il n'est pas certain que ces facteurs soient les mêmes que les facteurs de récurrence après chirurgie. Cette stratégie de surveillance est trop récente pour nous permettre d'établir une cohorte rétrospective analysant ces facteurs d'évolutivité. Actuellement, se discute la mise en place d'un observatoire des nouveaux cas de FA, ce qui nous permettrait d'analyser ces facteurs. L'essai clinique de phase II du Dr Bonvalot pourra également permettre de répondre à cette question.

En pratique, si les facteurs d'évolutivité sont identiques aux facteurs de récurrence, il faudra développer des stratégies de traitements adjuvants : mieux définir la place de la radiothérapie à ce niveau et discuter des traitements médicaux. Si ces facteurs sont différents, on établira la stratégie de prise en charge du patient en fonction de caractéristiques tumorales.

Dans l'étude de l'article 2, la totalité des patients ont été opérés de leur FA ; l'évolution spontanée des tumeurs ou les traitements médicaux n'ont pas été étudiés.

Un des intérêts spécifiques de cette étude est d'avoir analysé précisément le rôle de la radiothérapie complémentaire à la chirurgie. La radiothérapie ne diminue pas le risque de rechute, ni globalement, ni dans l'analyse en sous-groupes (selon l'âge du patient, la taille et le site tumoral). Seuls les patients atteints de FA située au niveau des extrémités semblent pouvoir bénéficier de la radiothérapie (bénéfice absolu de baisse du taux de récurrence locale de 15%). L'administration de la radiothérapie a également été analysée au cours du temps : il est intéressant de constater que :

- Entre les périodes avant et après 1997, le nombre de patients recevant une radiothérapie adjuvante s'est effondré, passant de 30% à 7%
- cette baisse d'utilisation ne s'est pas associée à une augmentation du taux de récurrence locale (71% vs 70%).

L'autre grand intérêt de cette étude est d'avoir établi un nomogramme permettant d'estimer de manière chiffrée ce risque de récurrence que l'on sait globalement élevé. On peut ainsi orienter la discussion de la stratégie thérapeutique pour un patient en fonction du risque de récurrence, calculé sur ses caractéristiques tumorales.

2. Facteurs pronostiques biologiques

A partir de "High frequency of b-catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management. J. Domont, S Salas, L Lacroix, V Brouste, P Saulnier, P Terrier, D Ranchere, A Neuville, A Leroux, L Guillou, R Sciot, F Collin, A Dufresne, J-Y Blay, A Le Cesne, J-M Coindre, S Bonvalot, and J Benard. *British Journal of Cancer* 2010; 102: 1032 - 1036"

Contexte et objectifs:

Lorsque cette étude a été initiée, en 2008, 3 publications portant sur 12 à 42 patients rapportaient des mutations du gène *CTNNB1* dans les FA sporadiques. Tejpar retrouvait 22 mutations sur les codons 45 ou 41 parmi 42 cas (Tejpar *et al.* 1999), Miyoshi en retrouvait 7 sur 13 cas étudiés (Miyoshi *et al.* 1998) et Saito en retrouvait 3 sur 12 (Tsuyoshi Saito *et al.* 2002). Ces travaux portaient sur de petites cohortes et l'impact des différents sous-types de mutations n'était pas analysé. Seul Lazar (Lazar *et al.* 2008) avait analysé une plus large cohorte de 138 FA sporadiques pour déterminer plus précisément la fréquence des mutations de *CTNNB1* dans ces pathologies. Il retrouvait 85% de mutations et un pronostic plus grave pour le sous-type S45F.

Le but des travaux présentés ici était double : établir la fréquence de ces mutations (fréquence globale et des sous-types) sur une plus large cohorte et rechercher une éventuelle corrélation avec des caractéristiques cliniques et/ou pronostiques. Les cas étudiés provenaient de la base de données « Conticanet » ce qui a permis d'effectuer ces analyses sur des prélèvements de tumeur congelés et pour lesquels on disposait des données cliniques correspondantes.

Article 3

Fréquence des mutations hétérozygotes de la β -caténine dans les fibromatoses extra-abdominales : un outil moléculaire potentiel dans la prise en charge de la maladie

Rationnel Les fibromatoses comprennent des entités cliniques distinctes, dont les fibromatoses sporadiques extra abdominales qui ont un fort potentiel de récurrence, même après une exérèse de qualité. Il n'existe pas de biomarqueurs moléculaires de la récurrence locale. Nous avons étudié les mutations de la β -caténine dans une cohorte multicentrique européenne de tumeurs fibromateuses pour relier le statut mutationnel de la β -caténine à l'évolution de la maladie.

Méthodes Le séquençage direct de l'exon 3 de la β -caténine a été réalisé sur 155 cas de fibromatoses congelées de différentes localisations. La corrélation du devenir avec le taux et le type de mutation était recherchée dans le groupe de fibromatoses extra abdominales (101 patients).

Résultats Des mutations de β -caténine ont été retrouvées dans 83% des cas totaux. Parmi les 101 cas de fibromatoses extra abdominales, des taux identiques de mutations étaient observés (87%), dont la T41A (39.5%), S45P (9%), S45F (36.5%) et des délétions (2%). Aucun des paramètres clinico-pathologiques n'a été retrouvé significativement associé au

statut mutationnel de la β -caténine. Avec un suivi médian de 62 mois, 51 patients ont récidivé. La survie sans récurrence à 5 ans était significativement pire pour les tumeurs β -caténine-mutée indépendamment d'un génotype spécifique, comparée aux tumeurs β -caténine-sauvage (respectivement 49 vs 75%, $p = 0.02$).

Conclusion Une fréquence élevée (87%) de mutations de la β -caténine caractérise les fibromatoses extra abdominales dans une grande étude multicentrique rétrospective. De plus, la β -caténine sauvage semble être un marqueur pronostique intéressant pouvant être utile dans la prise en charge thérapeutique des fibromatoses extra abdominales.

Résultats, discussion et perspectives :

La fréquence de mutations de *CTNNB1* dans les FA extra-abdominales de 83%, rapportée dans ces travaux à partir de 155 cas, a été ensuite confirmée par toutes les études qui ont suivies (environ $\frac{3}{4}$ des cas étudiés sont mutés dans 4 études (Le Guellec *et al.* 2012; Huss *et al.* 2013; Mullen *et al.* 2013; Colombo *et al.* 2013). La fréquence de chaque sous-type de mutation de *CTNNB1* et surtout leur corrélation avec les caractéristiques cliniques ont également été largement analysées ensuite.

	S45F	S45P	T41A	Autres	WT
Lazar, 2008 n = 138	28% ↘ RFS	7%	50%	-	15%
Dômont, 2010 n = 155	34% ↘ RFS	6%	41%	2%	17% ↗ RFS
Colombo, 2013 n = 179	22% Loc. extra-abdo ↘ RFS	21%	45%		12% ↗ RFS
Huss, 2013 n = 84	6%	6%	69% Loc. mésentérique	3.5%	15.5%
Mullen, 2013 n = 145	25%	1.7%	46%	1.3%	26% Loc. tronc

Tableau 8 Fréquence et corrélation clinique des sous types de mutation de *CTNNB1* (Lazar *et al.* 2008; Colombo *et al.* 2013; Huss *et al.* 2013; Mullen *et al.* 2013)

Parmi toutes les caractéristiques analysées dans ces études, la localisation tumorale pourrait être corrélée au sous-type de mutation (localisation plus souvent intra abdominale en cas de mutation T41A et extra abdominale en cas de mutation S45F) sans qu'une règle générale puisse être établie.

Par contre, le pronostic semble moins bon dans les FA sporadiques *CTNNB1* mutées que dans les formes sauvages, à fortiori dans les *CTNNB1* mutées en S45F. Il existe toutefois quelques nuances dans cet impact pronostique.

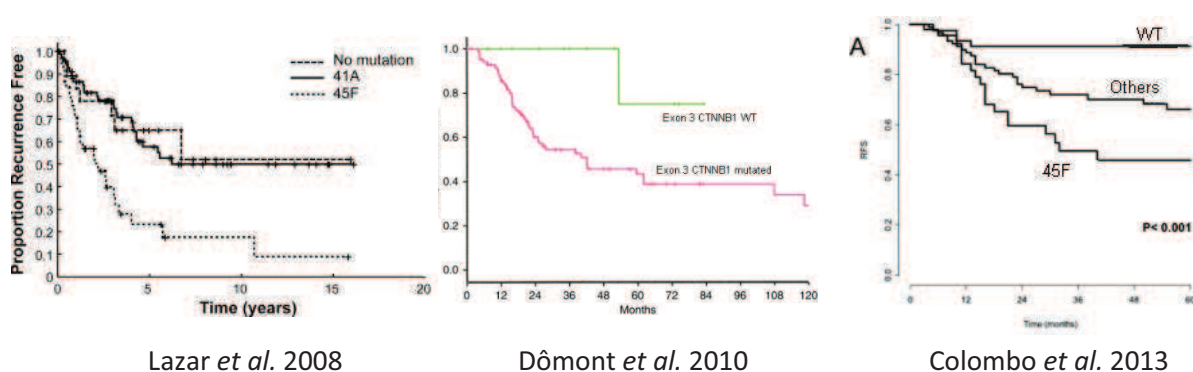


Figure 8 Taux de survie sans progression en fonction du sous-type de mutation *CTNNB1* dans 3 études

Les formes *CTNNB1* sauvages sont de meilleur pronostic que les *CTNNB1* mutées pour Dômont et Colombo et les *CTNNB1* S45F sont de moins bon pronostic que les autres mutations (différence statistiquement significative pour Colombo et tendance pour Dômont). Pour Lazar, les *CTNNB1* S45F sont de moins bon pronostic mais les *CTNNB1* sauvages et les autres mutations ont un pronostic équivalent.

L'identification de marqueurs biologiques pronostiques de FA est essentielle pour améliorer la prise en charge des patients. Les différences d'évolutivité observées en clinique sont sûrement sous-tendues par des différences biologiques. Le rôle majeur de *CTNNB1* dans la pathogénie de ces tumeurs et la fréquence élevée de ses mutations en font une cible très intéressante dans la recherche de biomarqueur.

Pour consolider le rationnel de l'hypothèse qui soutiendrait le rôle du sous-type S45F des mutations de *CTNNB1* comme augmentant le risque de récurrence des FA après exérèse chirurgicale, les conséquences fonctionnelles de la présence de la mutation sur des modèles *in vitro* et *in vivo* pourraient être menées.

A partir de « miRNA expression profile of desmoid tumors predicts their aggressiveness. A. Dufresne, M. Paturel, L. Alberti, H. Philippon, AV Decouvelaere, P. Cassier, JY Blay ». Soumis à « International Journal of Cancer »

Contexte et objectifs

Cette étude des profils miRNAs a débuté dans le cadre de l'analyse de la cohorte de l'essai clinique de phase II Desminib à la recherche de facteurs biologiques prédictifs de réponse à l'imatinib. Les analyses supervisées menées dans un premier temps visaient donc à identifier des biomarqueurs prédictifs. Parallèlement, comme pour les autres études de données à large échelle, des analyses non supervisées ont été menées, nous orientant plus vers un poids pronostique que prédictif de ces profils miRs.

Article 4

Prédiction de la progression des tumeurs desmoïdes par l'utilisation des profils d'expression des microRNAs

Rationnel La tumeur desmoïde (TD) est une tumeur rare du tissu conjonctif avec une agressivité loco-régionale mais une évolution imprévisible. Les microRNAs sont des petits ARN non codants qui contrôlent l'expression des gènes et dont l'expression est dérégulée dans de nombreux cancers. Cette étude a été menée pour définir la valeur prédictive et/ou pronostique des profils d'expression miRNA dans les TD.

Méthodes L'ARN a été extrait de prélèvements de tissus inclus en paraffine de 41 patients inclus dans 2 cohortes distinctes : une cohorte de 26 patients inclus dans l'essai de phase II « Desminib » et une cohorte indépendante de validation de 15 patients atteints de TD diagnostiquée au Centre Léon Bérard. Le profil miRNA était établi par « Taqman Low Density Array » à partir de 500 ng d'ARN total. Des analyses supervisées et non supervisées ont été réalisées sur les 2 cohortes.

Résultats Les analyses supervisées prédictives et pronostiques menées sur la cohorte Desminib n'ont pas pu identifier de miRNAs exprimés différemment respectivement entre les patients progressifs et non progressifs sous imatinib et les patients progressifs et non progressifs après arrêt de l'imatinib. Un clustering hiérarchique non supervisé de la cohorte Desminib a identifié 2 groupes (A et B) de 13 patients chacun. Seul le nombre de lignes thérapeutiques avant l'inclusion dans l'essai a été retrouvé significativement différent entre les 2 groupes ($p = 0.0387$). Le délai à progression après arrêt de l'imatinib est plus long dans le groupe B que dans le groupe A ($p = 0.05$). Quinze miRs étaient exprimés différemment statistiquement entre les groupes A et B, ciblant plus de 3000 gènes (dont *AGO1*, *BCL2*, *CDK6*, *SMAD4*, *PTEN*, *CCND1*, *VEGFA*, *RB1* ciblés par au moins 3 miRs). Ces résultats ont été confirmés sur une cohorte de validation indépendante : le clustering hiérarchique de ces 15 miRs a identifié 2 groupes, dont le temps à récurrence est statistiquement différent (28.8 versus 68.8 mois ; $p = 0.0213$).

Conclusion Ces résultats nous apportent la première démonstration d'une valeur pronostique des profils d'expression de miRNAs avec un possible impact direct sur la prise en charge des patients. L'objectif suivant sera de valider une signature miRNA précise dans une cohorte prospective pour sélectionner les patients qui ne bénéficient pas du tout de la résection chirurgicale de leur tumeur et devraient être simplement surveillés.

Résultats, discussion et perspectives :

Par l'expérience globale issue de notre laboratoire et le travail mené sur la cohorte « Desminib », l'analyse des profils d'expression des miRNAs se révèle très longue et difficile. Le recueil des données, l'analyse statistique et l'interprétation des résultats sont complexes et il est frappant de constater, dans la littérature, le peu d'informations disponibles dans les parties « Matériels et Méthodes » des très nombreuses publications portant sur les miRs. Il n'existe aucune standardisation des méthodes; pourtant, à de nombreuses étapes, il nous a fallu faire des choix pour avancer dans l'analyse des données et les résultats étaient modifiés par :

- la qualité du matériel tumoral disponible : nous avons extrait l'ARN total des tumeurs depuis les blocs inclus en paraffine. Les prélèvements fixés en Bouin ne sont clairement pas analysables en parallèle avec des tumeurs fixées en formol,
- la méthode d'extraction de l'ARN, sur colonne ou par Trizol[®]/phenol-chloroforme influence également les résultats,
- la méthode de détection des miRs : elle peut être qualitative ou semi-quantitative (la technique TLDA que nous avons choisi donne un résultat semi-quantitatif),
- en plus de l'analyse des courbes d'amplification par le logiciel de TLDA, nous vérifions « à la main » et éliminons de manière complètement subjective les courbes d'amplification d'aspect non satisfaisant,
- l'interprétation des « données manquantes » a été très débattue : un miR non détecté est-il fortement sous-exprimé ou absent à l'état de base ? Ceci est un constat d'ignorance : on ne sait pas quelle est l'expression physiologique d'un miR et si, en condition pathologique, les miRs évoluent de manière qualitative (ré-expression de miRs et disparition d'autres) ou quantitative (sur et sous-expression de miRs),
- la méthode de normalisation : 4 grandes méthodes de normalisation ont été testées en parallèle sur notre cohorte par nos biostatisticiens. La méthode de la médiane a été retenue car elle semblait la plus pertinente et la plus fiable pour notre cohorte,
- le choix des groupes de patients des analyses supervisés : ou comment déterminer la qualité de réponse d'une FA à un traitement : les patients stables et répondeurs sont-ils à considérer comme sensibles au traitement ou leur évolution reflète-t-elle uniquement l'évolution naturelle de leur maladie ? De même sur le choix des groupes pronostiques, tous les patients inclus dans l'essai « Desminib » étaient censés avoir une maladie récidivante et progressive à l'inclusion dans l'essai, donc tous avoir une maladie de mauvais pronostic,
- le déséquilibre en taille des groupes comparés : lorsque le test Anova était réalisé sur des groupes de taille trop différente, le biostatisticien réalisait des simulations (1000 à 10 000) de test Anova entre le groupe le plus petit et un groupe de taille équivalente pris au hasard au sein du plus grand groupe,
- le choix des bases de données : nous avons d'emblée éliminé les bases dites « prédites » dans lesquelles l'influence d'un miR sur un transcrit est supposée à partir d'une homologie de séquence. Nous n'avons travaillé que sur les 2 bases dites « validées » pour lesquelles l'influence du miR sur le transcrit a été confirmée par différentes méthodes (western blot, northern blot, qRT-PCR, microarray, NGS...).

Même avec les bases validées, il faut être conscient qu'elles se modifient en permanence et que d'une version à une autre, les résultats sont différents,

- la modification des données pour un seul patient : la petite taille de nos cohortes, d'étude et de validation, rend les analyses très sensibles puisque toute modification des données cliniques ou biologiques d'un seul patient peut modifier les conclusions.

Toutefois, et malgré toutes ces limites, le poids pronostique des miRs révélé par notre étude me semble robuste. La cohorte « Desminib » incluant des patients récidivants n'est pas adaptée à l'analyse du pronostic de ces tumeurs. Et pourtant, les courbes de survie sans progression entre les 2 groupes de patients identifiés par l'analyse non supervisée après arrêt de l'imatinib étaient très nettement distinctes, à la limite de la significativité statistique. La cohorte de validation, moins biaisée, confirme clairement cet impact pronostique.

Après avoir identifié la signification clinique des profils d'expression miR, l'étape suivante consiste à étudier les miRs justifiant la formation de ces groupes pronostiques pour analyser leurs gènes cibles et ouvrir la voie à de nouvelles perspectives de recherche. On réalise des tests Anova qui nous donnent un niveau de significativité des miRs différentiellement exprimés entre nos groupes. Statistiquement, ces tests identifient 15 miRs qui ciblent 3040 gènes (!) selon les bases de données. On se retrouve alors confronté au problème d'interprétation commun aux analyses à large échelle : parmi toutes les cibles identifiées, laquelle ou lesquelles sont fiables, pertinentes, intéressantes à explorer pour tenter de découvrir un mécanisme d'oncogénèse encore inconnu pour ces tumeurs voire une potentielle cible thérapeutique ? Dans quelle mesure la significativité statistique est corrélée à la significativité biologique ? Plus la p value d'un test est petite, plus on est sûr que la différence étudiée existe ; cela ne veut pas dire que cette différence soit importante, et donc, biologiquement pertinente. Dans le cas de miRs, nous n'avons pu identifier de miRs qui soient « toujours » versus « jamais » exprimés dans un groupe par rapport à l'autre. Il nous a donc semblé intéressant de tenir compte du différentiel de Ct entre les 2 groupes pour un miR donné.

Dans le but de réduire cette liste de gènes (en conservant les plus intéressants), nous avons donc sélectionné les miRs puis les gènes ainsi:

- nous n'avons conservé que les miRs dont le différentiel d'expression de la médiane des Ct normalisés entre les 2 groupes identifiés est supérieur à 2 (la valeur de 2 Ct d'écart est considérée comme étant minimum pour soutenir une différence biologique) : on retient alors 9 miRs, qui ciblent encore 2623 gènes
- nous n'avons ensuite conservé que les gènes ciblés par au moins 3 miRs : il reste alors 23 gènes dont *BCL2 PTEN VEGFA CCND1 CDK6*.

Il ne semble pas juste de tenter de corréler directement le niveau d'expression d'un miR à l'activité biologique de son gène cible (i.e. miR sous exprimé, gène sur exprimé). En effet, compte-tenu de la complexité des systèmes biologiques et du caractère particulier et encore imprécis de la biologie des FA qui se situe à la frontière entre des tumeurs malignes et bénignes, l'analyse doit en être très prudente. Cette liste de gènes peut seulement orienter vers des pistes de travail et des voies de signalisation à explorer, et se poursuivre, par exemple, par la recherche d'expression de protéines correspondantes en IHC.

B. FACTEURS PREDICTIFS

Identification de facteurs biologiques prédictifs de la réponse à l'imatinib mésylate dans les fibromatoses agressives

A partir de « Identification of biological factors predictive of response to imatinib mesylate in aggressive fibromatosis. Dufresne A, Bertucci F, Penel N, Le Cesne A, Bui B, Tubiana-Hulin M, Ray-Coquard I, Cupissol D, Chevreau C, Perol D, Goncalves A, Jimenez M, Bringuier PP, Blay JY. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):482-5 »

Et « Impact of KIT exon 10 M541L allelic variant on the response to imatinib in aggressive fibromatosis: analysis of the desminib series by competitive allele specific Taqman PCR technology. A. Dufresne, L. Alberti, M. Brahmi, H. Philippon, D. Perol and J.-Y. Blay. Under review for *BMC Cancer* »

Ces 2 études ont été menées sur la cohorte de patients inclus dans l'essai « Desminib ». Les résultats de cet essai randomisé de phase I/II ont été publiés en 2011 (Penel *et al.* 2011). Il s'agissait d'un essai multicentrique, national, dont l'objectif principal était de déterminer l'efficacité et la tolérance de l'imatinib mésylate chez des patients atteints de FA récidivante ou progressive. Quarante patients ont été inclus entre Septembre 2004 et Octobre 2005, issus de 15 centres français. Les caractéristiques des patients étaient similaires à celles décrites dans les séries littéraires. Trente-trois patients (85%) présentaient une progression radiologique objectivée lors de leur entrée dans l'essai. Les résultats ont rapporté une grande majorité de stabilisations de la maladie (3/4 des patients, au moins) et seulement 4 réponses objectives. Le taux de survie sans progression à 1 an est de 66%, identique à celui publié par Chugh dans les mêmes conditions (Chugh *et al.* 2010).

Table 1. Efficacy of imatinib (400 mg/day) for recurrent or progressive aggressive fibromatosis/desmoid tumors

		Assessment by investigator (n = 40)	Central blinded radiological review (n = 35)
Objective response at 3 months (RECIST)	Complete response	1 (2.5%)	1 (2.9%)
	Partial response	2 (5.0%)	3 (8.6%)
	Stable disease	30 (75.0%)	28 (80.0%)
	Progressive disease	5 (12.5%)	3 (8.6%)
	Not evaluable	2 (5.0%)	–
	Not centrally reviewed	–	5/40 (12.5%)
Non-progression rate	At 3 months	At 6 months	At 12 months
	32/35 (91.5%)	28/35 (80.0%)	14/21 (66.7%)

L'un des objectifs secondaires de l'étude était d'identifier des facteurs biologiques, prédictifs de la réponse à l'imatinib.

Identification de facteurs biologiques prédictifs de la réponse à l'imatinib mésylate dans les fibromatoses agressives.

Rationnel L'imatinib induit des réponses et des stabilisations de la maladie chez les patients porteurs de fibromatoses agressives (FA) non opérables. La cible précise de l'imatinib dans les FA et les facteurs prédictifs de réponse ne sont pas connus.

Méthodes Nous avons étudié les facteurs potentiellement prédictifs de réponse à l'imatinib dans une série de 40 patients porteurs de FA progressive inclus dans un essai de phase II d'imatinib : nous avons testé la présence du variant M541L de l'exon 10 de KIT, l'expression des kinases sensibles à l'imatinib et des protéines du cycle cellulaire par immunohistochimie, ainsi que d'autres facteurs cliniques et biologiques.

Résultats Parmi les 10 patients dont on a pu extraire l'ADN, 3 étaient porteurs du variant de l'exon 10 de KIT (30%), sans corrélation avec la réponse ou la survie sans progression. L'expression des autres cibles de l'imatinib (PDGFRA/B, MCSF-R), et des éléments en aval du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire et des voies de prolifération (cycline D1, ERK, MEK 1-2) n'étaient pas corrélés à la survie sans progression. La lymphopénie avant traitement (<1500/ μ l) et la taille tumorale > 120 mm étaient corrélés à une survie sans progression plus courte dans les analyses uni et multivariées.

Conclusion Nos travaux montrent que des caractéristiques biologiques de base du patient sont le paramètre majeur influençant la réponse à l'imatinib dans les FA. Les caractéristiques de la tumeur, incluant la présence du variant M541L de l'exon 10 de KIT, peuvent influencer le contrôle tumoral mais cela doit être confirmé et mieux expliqué.

Impact du variant allélique M541L de l'exon 10 de KIT sur la réponse à l'imatinib dans les fibromatoses agressives: analyse de la série Desminib par la technologie PCR de competitive allele specific Taqman

Rationnel La fibromatose agressive (FA) est une maladie proliférative fibroblastique rare avec un comportement local agressif et pas de métastases à distance, caractérisée par des mutations des gènes CTNNB1 ou APC. Quand les FA progressives et/ou symptomatiques, ne sont pas accessibles à un traitement local, différents traitements médicaux peuvent être efficaces, dont l'imatinib mésylate. L'essai de phase II « Desminib » a inclus 40 patients atteints de FA pour évaluer la toxicité et l'efficacité de l'imatinib et a conclu à un taux de contrôle tumoral de 65% à 1 an. Nous avons étudié la potentielle valeur prédictive du variant M541L de l'exon 10 de KIT (KIT M541L) sur cette série prospective.

Méthodes L'ADN a été extrait en quantité suffisante pour 33 patients inclus dans l'essai Desminib. La détection du KIT M541L a été réalisée par la technologie PCR de Competitive Allele-Specific Taqman®. Le statut de l'allèle de KIT a été analysé par rapport à la présentation clinique et à l'évolution du patient.

Résultats Dans 6 des 33 cas (18%), la technique n'a pu conclure au statut mutationnel ; 5 patients (19%) étaient porteurs du KIT L541 et 22 patients (81%) étaient classés « sauvages ». Par rapport à la cohorte globale, KIT M541L était observé à des fréquences identiques selon les caractéristiques cliniques. Dans les sous-groupes KIT M541L et KIT « sauvage », les taux de contrôle tumoral à 1 an sont respectivement de 100% et 68% ($p = 0.316$). La médiane de survie sans progression des patients porteurs de KIT M541L ou non est respectivement de 29.9 et 24.5 mois ($p = 0.616$), la médiane de survie globale n'est pas atteinte, dans aucun des 2 groupes.

Conclusion Nos résultats ne sont pas en faveur d'un effet prédictif de KIT M541L sur l'efficacité de l'imatinib pour les patients atteints de FA.

A partir de « A V530I Mutation in c-KIT Exon 10 Is Associated to Imatinib Response in Extraabdominal Aggressive Fibromatosis. Kurtz JE, Asmane I, Voegeli AC, Neuville A, Dufresne A, Litique V, Chevreau C, Bergerat JP. *Sarcoma*. 2010;2010:458156 »

Cette publication rapporte le cas d'une patiente présentant une FA et traitée par imatinib permettant d'obtenir une réponse partielle d'excellente qualité associée à une amélioration complète des symptômes fonctionnels et algiques. Cherchant à expliquer biologiquement cette réponse, le séquençage de l'exon 10 de KIT réalisé a permis d'identifier la présence d'une mutation V503I.

Article 7

Une mutation V530I de l'exon 10 de KIT est associée à la réponse à l'imatinib dans une fibromatose agressive extra abdominale.

Les fibromatoses agressives (FA) ou tumeurs desmoïdes sont des tumeurs rares, caractérisées par une invasion des tissus profonds par une prolifération néoplasique monoclonale de fibroblastes, développée à partir des structures musculo-aponévrotiques. La chirurgie est le traitement de référence mais les marges négatives sont difficiles à obtenir dans le cas de volumineuses tumeurs et peuvent entraîner des séquelles fonctionnelles importantes. Le traitement médical des FA comporte des anti-inflammatoires non stéroïdiens, du tamoxifène avec des résultats inconstants. Plusieurs publications rapportant une efficacité de l'imatinib dans les FA apparaissent dans la littérature. Ici, nous décrivons pour la première fois un variant V530I de l'exon 10 de KIT qui est associé à une réponse majeure à l'imatinib dans une FA extra abdominale. La substitution V530I précédemment découverte a été caractérisée dans les leucémies myéloïdes aiguës, mais n'a jamais été décrites dans d'autres pathologies, jusqu'ici. Dans cet article, nous discutons les mutations ou polymorphismes de l'exon 10 de KIT qui ont été décrits dans plusieurs situations liées à KIT, dont la leucémie myéloïde aiguë, la mastocytose et la fibromatose agressive.

L'imatinib mésylate est un inhibiteur de récepteurs tyrosine-kinase pour lequel les cibles clairement identifiées sont aujourd'hui au nombre de 4 : ABL, KIT, CSF-1R et PDGFR α et β . Logiquement, la recherche de facteurs prédictifs dans l'essai Desminib a commencé par la recherche de l'expression des cibles connues de l'imatinib pour tenter de corrélérer leur présence à la réponse au traitement. Deux autres publications ont abordé ce sujet sous le même angle : celle de Heinrich (Heinrich *et al.* 2006) qui a étudié l'expression de KIT, PDGFR α et β et PDGF-AA et -BB ainsi que la présence de mutations de KIT, PDGFRA et PDGFRB et celle de Chugh (Chugh *et al.* 2010) qui a recherché l'expression et les mutations des mêmes cibles chez respectivement 19 et 51 patients atteints de FA et traités par imatinib dans 2 essais de phase II.

	Heinrich <i>et al.</i>	Chugh <i>et al.</i>	Dufresne <i>et al.</i>
KIT	3/19	1/7	0/29
PDGFR α	0/19	7/7	0/29
PDGFR β	19/19	7/7	29/29
PDGF-AA	14/14	ND	ND
PDGF-BB	14/14	ND	ND

Tableau 9 Etude IHC des cibles connues de l'imatinib des patients inclus dans les essais de phase II évaluant l'imatinib dans les FA (nombre cas positifs/nombre de cas étudiés) (Heinrich *et al.* 2006; Chugh *et al.* 2010)

L'expression d'aucune de ces cibles n'a pu être corrélée à la réponse tumorale à l'imatinib.

Des mutations ont également été recherchées au niveau de ces cibles. Dans l'étude de Heinrich, le séquençage des exons 9, 11, 13 et 17 de KIT, des exons 12, 14 et 18 de *PDGFR α* et des exons 11 et 17 de *PDGFR β* n'a retrouvé aucune mutation. Les mêmes exons étaient séquencés dans l'étude de Chugh et on retrouvait une délétion sur l'exon 12 de *PDGFR α* et deux délétions sur l'exon 12 de *PDGFR β* . Deux patients sur 19 étaient porteurs du variant M541L sur l'exon 10 de KIT. Aucune de ces anomalies n'était corrélée à la réponse à l'imatinib. Dans notre étude, la présence du variant M541L de l'exon 10 de *KIT* n'était pas corrélée à la réponse tumorale.

La démarche « officielle » pour identifier une thérapie ciblée efficace consiste à 1) identifier une cible moléculaire exprimée et/ou activée dans une pathologie tumorale pour 2) déterminer l'efficacité d'une thérapie ciblant cette molécule anormale. Dans les travaux présentés ici, la démarche inverse a été menée : 1) la thérapie ciblée a été administrée à une cohorte de patients non sélectionnés, atteints de cette pathologie et 2) les cibles de cette thérapie ont été analysées dans la cohorte de patients pour tenter d'établir une corrélation entre leur présence et l'efficacité du traitement.

Si cette démarche semble surtout motivée par le fait qu'elle permette au praticien de faire bénéficier le plus rapidement possible à ses patients d'une nouvelle molécule, l'absence des étapes de « preuve du mécanisme » et « preuve du concept » peut freiner voire stopper le développement d'une thérapie ciblée dans une pathologie (e. g. gefitinib dans les cancers bronchiques non à petites cellules). Toutefois, avec un peu de chance, cette méthode d'analyse rétrospective peut parfois donner des résultats. Lorsque l'imatinib a été administré pour la première fois à une patiente atteinte de GIST en 2001 (Joensuu *et al.* 2001), on savait juste depuis 2-3 ans que les GISTs exprimaient KIT qui semblait activé par des

mutations spécifiques (Sarlomo-Rikala *et al.* 1998; Hirota *et al.* 1998; Lux *et al.* 2000). Ces mutations n'avaient pas encore été identifiées comme puissants biomarqueurs de l'efficacité de l'imatinib.

Dans le modèle idéal, une cible thérapeutique est une protéine exprimée, modifiée par une mutation génétique et dont le mécanisme d'action est impliqué dans la carcinogénèse du modèle tumoral étudié. Si en plus il existe un médicament capable d'inhiber cette protéine, on a toutes les chances d'avoir identifié une cible prometteuse (Fletcher, Blay). Mais la conjonction de tous ces critères est rarement obtenue et, en pratique, l'identification d'une cible doit se concevoir à différents niveaux.

Elle peut se rechercher au niveau génomique : c'est dans ce cadre qu'Heinrich et Chugh ont recherché les mutations des exons 9, 11, 13 et 17 de *KIT*, des exons 12, 14 et 18 de *PDGFR* α et des exons 11 et 17 de *PDGFR* β . Ces mutations ont été identifiées comme activatrices du récepteur c-kit et biomarqueurs de l'efficacité de l'imatinib dans les GISTs ou les leucémies myéloïdes chroniques (Apperley *et al.* 2002; Heinrich, Corless, Duensing, *et al.* 2003; Heinrich, Corless, Demetri, *et al.* 2003). Ces mutations juxta-membranaires entraînent une activation constitutionnelles du récepteur qui active plusieurs voies de signalisation jouant un rôle crucial dans la prolifération ou la survie cellulaire telles que les voies Ras/Raf/MAP kinases, Janus/Stat, PI3K/Akt/mTOR et SRC. Aucune de ces mutations n'a été retrouvée dans les FA.

Dans la même idée, nous avons recherché la présence du variant M541L de l'exon 10 de *KIT* pour évaluer l'éventuelle corrélation de sa présence à l'efficacité de l'imatinib. Au moment où ces travaux ont débuté, en 2006, 2 « case report », l'un portant sur une patiente (Gonçalves *et al.* 2006) et l'autre sur 4 (Seinfeld *et al.* 2006) rapportaient une réponse intéressante à l'imatinib chez des patients porteurs de FA et chez qui la présence de ce variant était retrouvée. Notre première analyse portant sur les patients inclus dans l'essai Desminib était motivante puisque, parmi les 10 patients pour lesquels l'ADN avait pu être amplifié et séquencé, le variant était présent dans 3 cas, dont la seule patiente de l'étude présentant une réponse complète à l'imatinib (et 2 stabilisations). Devant la difficulté technique et le faible rendement du séquençage chez ces patients, l'étude s'est poursuivie par une technique de PCR quantitative : la « Competitive-Allele Specific Taqman[®] PCR ». En effet, les FA sont des tumeurs peu cellulaires, très fibrotiques, dont l'ADN est altéré au cours du temps par les méthodes de fixation et conservation. La fixation en formol et à fortiori en Bouin, l'inclusion en paraffine et les méthodes d'extraction entraînent la dégradation et la fragmentation des acides nucléiques. Le rendement du séquençage classique (dit de Sanger) est très mauvais pour ces tumeurs. L'utilisation de la CAST PCR semble avoir contourné en partie ces problèmes. Dans cette technique, l'amplification de seul l'allèle muté (après blocage spécifique de l'allèle « wild type ») permet d'augmenter la sensibilité de détection d'une mutation. Cette méthode nous a permis de déterminer le statut de l'exon 10 de *KIT* pour 27 patients (variant M541L détecté dans 5 cas). Si aucun patient porteur du variant n'a progressé sous imatinib, les analyses statistiques de taux de réponse et de survie n'ont pu identifier la présence de ce variant comme facteurs prédictif de réponse au traitement. Dans l'étude de Chugh, 2 patients sur 19 étaient porteurs du variant et ne répondaient pas mieux à l'imatinib que les autres.

Si le rationnel de ces études génomiques est discutable, l'interprétation des résultats négatifs doit se faire au regard des limites statistiques liées à la faible taille globale des

cohortes de cette maladie rare et au faible nombre d'évènements (grande majorité de stabilisations).

Depuis, ce variant a été identifié comme étant un polymorphisme (Grabellus *et al.* 2011). En effet, sa fréquence est de 7/42 soit 16.7% des FA ce qui n'est pas statistiquement différent de sa fréquence chez des donneurs sains (26/166 soit 15.7%). De plus, comme on peut l'attendre d'un polymorphisme, le variant est présent dans les tissus sains adjacents à 4 échantillons de tumeur porteurs du variant. Des travaux menés ensuite dans notre équipe ont conclu dans le même sens en retrouvant la présence du variant dans des couples de blocs FFPE de GIST et de PBMC correspondant, pour 5 patients. Ces données ne sont pas en faveur d'un potentiel rôle du variant dans la carcinogénèse des tumeurs. Toutefois, ceci n'excluait pas à priori son rôle dans l'efficacité d'un traitement.

La significativité de ce variant demeure inexpliquée et s'ils ne sont pas publiés, des travaux ont depuis été menés sur ce sujet.

Parmi les 426 patients de la base de données nationale de FA (mentionnée ci-dessus), l'exon 10 a été séquencé pour 167 d'entre eux permettant d'identifier la présence du variant chez 34 patients (soit 19%). La présence du variant a été analysée par rapport à de nombreux critères cliniques et biologiques : sexe du patient, contexte d'hormonodépendance ou de syndrome de Gardner, présence d'une mutation du gène *APC*, localisation et taille tumorales, meilleure réponse observée à un traitement, récurrence, délai à récurrence. L'analyse de la survie globale a été abandonnée car le nombre trop faible d'évènements ne la rend pas fiable.

Aucun de ces critères n'était corrélé à la présence du variant M541L sauf le contexte d'hormonodépendance, celui-ci étant défini comme une FA se développant au cours d'une grossesse ou dans les 6 mois suivant l'accouchement. Le taux de corrélation était hautement significatif avec une p-value du test chi-deux à 0.006.

		Kit exon 10 mutation		Number (%)
		Wild type	M541-L	Total
Hormonal dependency Number (%)	No	130 (84)	24 (16)	154
	Yes	7 (54)	6 (46)	13
	Total	137 (82)	30 (18)	167

Tableau 10 Répartition de la présence du variant M541L de l'exon 10 de KIT en fonction du caractère hormonodépendant des FA

Le variant est présent dans plus de la moitié des FA qui se développent dans un contexte d'hormonodépendance. Nous avons émis l'hypothèse que le variant M541L puisse sensibiliser les cellules à la stimulation hormonale. Nous avons donc développé un modèle *in vitro* et étudié pendant de longs mois l'influence éventuelle d'hormones et traitements anti-hormonaux sur la prolifération et la mort cellulaire de lignées cellulaires de fibroblastes 3T3 transfectées par le variant M541L. Comparativement aux 3T3 transfectées par le vecteur, la prolifération cellulaire des 3T3 M541L semble effectivement stimulée par l'ajout d'E2 dans les milieux de culture. Toutefois, ce résultat a été difficile à obtenir et à reproduire pour conclure de manière formelle. Nous avons remis en cause le modèle utilisé de 3T3

transfectées et travaillons actuellement à la transfection du variant dans des lignées cellulaires de GIST n'exprimant pas KIT, comme les FA.

Le variant M541L a également été étudié dans 90 prélèvements de GISTs et sa présence semble corrélée à la survie sans récurrence des patients. Le taux de survie sans récurrence à 5 ans est de 27.7% et de 75.7% ($p = .003$) respectivement pour les patients porteurs ou non du variant M541L. Nous n'avons pas retrouvé cet impact pronostique de la présence du variant pour la récurrence des FA.

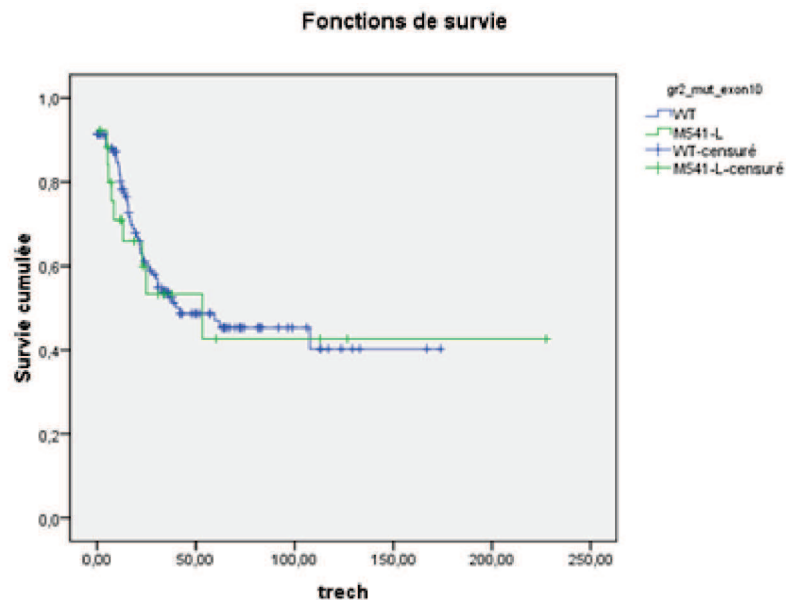


Figure 9 Survie sans récurrence de 167 patients atteints de FA en fonction du statut du variant M541L de l'exon 10 de *KIT*

De même que l'intérêt pour le variant M541L est né d'un cas rapporté, l'équipe de JE Kurtz s'est intéressée à la mutation V503I de ce même exon 10 de *KIT*, décrivant le cas d'une patiente atteinte de FA et présentant une réponse objective de très bonne qualité sous imatinib.

Le rationnel biologique de l'implication, sur l'efficacité de l'imatinib, d'une mutation située au niveau de l'exon 10 de *KIT* peut se discuter. L'exon 10 de *KIT* code pour la portion transmembranaire du récepteur. Les mutations situées au niveau des exons 9 et 11 (les plus fréquentes dans les GISTs) codent pour les domaines juxta membranaires (extra cellulaire pour l'exon 9 et intra cellulaire pour l'exon 11) dont la fonction est d'inhiber la dimérisation du récepteur en l'absence de son ligand (le stem cell factor). Les mutations au niveau des exons 9 ou 11 sont activatrices car elles entraînent la dimérisation constante du récepteur avec activation des voies de signalisation en aval. Les conséquences fonctionnelles d'une mutation de l'exon codant pour la portion transmembranaire du récepteur sont inconnues. De plus, la majorité des publications ne rapportent pas d'expression de c-kit en IHC (Chugh *et al.* 2010; Heinrich *et al.* 2006; A Leithner *et al.* 2005; Lucas *et al.* 2003) : au total, une expression faible de c-kit a été détectée sur 6 FA parmi 154 testées. On peut se demander quelle est la valeur fonctionnelle du variant d'un gène codant pour une protéine qui n'est pas exprimée. On ne trouve pas, dans la littérature, de cas rapporté de tumeur n'exprimant ni *KIT* ni PDGFR α et répondant à l'imatinib.

L'identification d'une cible thérapeutique peut également se rechercher au niveau protéique. Les protéines sont les effecteurs des processus cellulaires dont les modifications de nombre ou de fonction peuvent être caractéristiques de tumeurs et représenter ainsi des cibles thérapeutiques. Dans notre étude comme dans celles de Chugh et Heinrich, les récepteurs Kit, PDGFR α et M-CSF R, cibles connues de l'imatinib, ne sont pas exprimés à la surface des cellules de FA. Ils ne semblent donc pas pouvoir médier la réponse à l'imatinib dans ces tumeurs. PDGFR β , par contre, détecté par IHC dans notre étude et celle de Chugh et par immunoblot dans celle d'Heinrich, est exprimé chez tous les patients, à différents niveaux. Il n'a pas été possible de corrélérer le niveau d'expression à la réponse à l'imatinib.

En aval de ces récepteurs, différentes voies de signalisation peuvent être activées et ont été également analysées dans les 3 études. Les récepteurs tyrosine-kinase activent les voies Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/PTEN et JAK/STAT3. L'expression des formes phosphorylées d'AKT, MAPK, STAT3, ERK et MEK et non phosphorylées AKT, MAPK, STAT3, PTEN et PI3K ne sont pas corrélées à la réponse à l'imatinib. De plus, les niveaux de phosphorylation ne changent pas lorsqu'on les compare avant et après traitement par imatinib. Les jonctions adhérentes intercellulaires incluent E-cadhérine et β -caténine ; E-cadhérine n'est exprimée dans aucun cas et β -caténine dans tous les cas. Plus que l'expression globale de β -caténine, on sait que c'est sa localisation intra cellulaire qui est informative : sous membranaire en conditions physiologiques elle est transloquée en intra nucléaire en conditions pathologiques. Ce facteur n'a pas été étudié.

Dans notre étude, l'expression de la cycline D1 est retrouvée chez 5 patients sur 33. Aucun des patients dont la tumeur exprime la Cycline D1 n'est progressif à 1 an. La cycline D1 est un régulateur du cycle cellulaire dont le poids pronostique péjoratif a été démontré dans plusieurs types de cancers (cancer bronchique, prostatique, oesophagien, carcinome urothélial de vessie...). De plus, il a été démontré, dans 38 cas de FA sporadiques, que sa surexpression était corrélée à la localisation intra cellulaire de β -caténine (T Saito *et al.* 2001).

L'analyse des profils d'expression des miRNAs n'a pas pu identifier de miRs exprimés différemment et avec un niveau de significativité statistique suffisante entre les patients répondeurs et non répondeurs à l'imatinib dans l'essai Desminib.

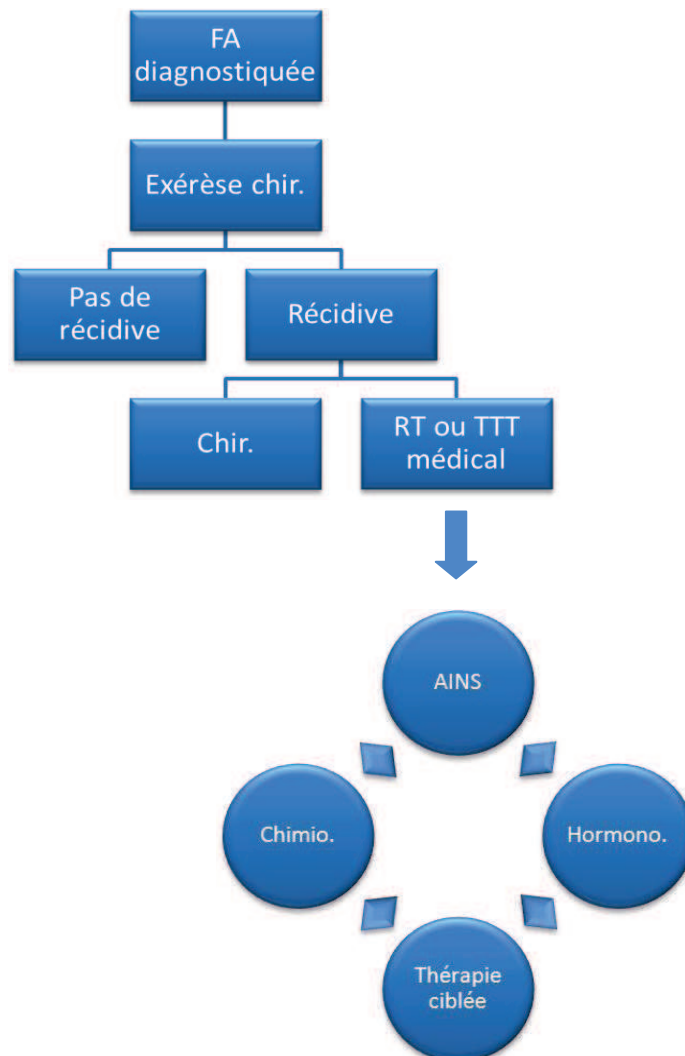
Au total, l'objectif initial de nos travaux qui était d'identifier dans les FA des facteurs biologiques de réponse à l'imatinib n'a pas abouti. Toutefois, lorsque l'on connaît la lenteur naturelle d'évolution des FA et les cas de régression spontanée, on peut se poser la question de savoir si les réponses au traitement quantifiées selon les critères RECIST dans ces études sont réellement dues à une éventuelle efficacité du traitement ou simplement le reflet de l'évolution naturelle de la maladie. En d'autres termes, la recherche de facteurs prédictifs équivaut peut-être, dans ces tumeurs, à rechercher des facteurs pronostiques.

III. DISCUSSION

Le but de la recherche de transfert en médecine est d'améliorer la prise en charge des malades. Dans ce chapitre, je tenterai d'exposer dans quelle mesure les résultats des travaux présentés dans ce manuscrit peuvent s'intégrer dans différentes étapes de cette prise en charge et vers quelles perspectives de recherche ils peuvent ouvrir.

A. Evolution des concepts de prise en charge

Jusqu'en 2010, et encore actuellement dans de très nombreuses structures, la prise en charge des FA pouvait se résumer ainsi :



Cette stratégie n'est pas satisfaisante, à plusieurs niveaux :

- La résection chirurgicale est souvent réalisée d'emblée, sans diagnostic anatomo-pathologique préalablement établi sur biopsie,
- Le diagnostic anatomo-pathologique est difficile à établir uniquement sur les analyses macro et microscopique. De nombreuses erreurs diagnostiques de FA sont corrigées par la relecture centralisée des sarcomes (RRePs). (Ray-Coquard *et al.* 2012)
- Il n'existe pas de recommandations sur le type d'exérèse chirurgicale (manque de données notamment sur l'influence de la qualité des marges sur la récurrence). Le geste chirurgical est pourtant souvent compliqué par une taille volumineuse et l'envahissement des organes de voisinage,
- Plus de la moitié des patients opérés récidivent, et souvent plusieurs fois de suite,
- La place de la radiothérapie reste mal définie,
- Les traitements médicaux sont multiples mais globalement peu efficaces ; ils sont donc prescrits dans le cas de tumeurs évolutives et/ou symptomatiques, non accessibles à un traitement local de chirurgie ou radiothérapie. Il n'existe pas de recommandations sur la séquence optimale des traitements systémiques. Il n'existe pas non plus de facteur prédictif orientant vers le choix d'un traitement plus qu'un autre. Le praticien a donc naturellement et logiquement tendance à prescrire les traitements les moins toxiques en 1^{ère} intention pour les faire se succéder au rythme des évolutions de la maladie, en espérant qu'ils puissent soulager le patient.

Cette stratégie de prise en charge a été bouleversée par l'introduction de la notion de surveillance dans la prise en charge initiale des tumeurs.

B. Contribution de nos travaux à l'évolution de ces concepts

Le pronostic des FA reste mystérieux et représente pourtant un élément essentiel dans la prise en charge des patients. L'immense hétérogénéité des modes évolutifs des FA observée en clinique et rapportée dans les séries rétrospectives (de la régression spontanée à l'invasion et la récurrence loco-régionales invalidantes) est forcément sous-tendue par des caractéristiques biologiques différentes, de la tumeur et/ou de son micro environnement, et non identifiées à ce jour.

Dans la nouvelle stratégie de prise en charge des patients, la question du pronostic doit être abordée sous 2 angles : identification de facteurs de récurrence après exérèse chirurgicale d'une tumeur et pronostic évolutif d'une tumeur en place. On ne dispose pas d'éléments actuellement pour penser que ces facteurs soient les mêmes dans les 2 situations mais ce n'est pas impossible. Les 1^{ers} ont été beaucoup plus étudiés car ils correspondaient à la stratégie de prise en charge adoptée jusqu'à présent. Les 2^{nds} seront issus d'une stratégie plus récemment développée mais devraient rapidement se révéler indispensables.

1. Facteurs pronostiques cliniques

On a, jusqu'à présent, beaucoup plus étudié de facteurs pronostiques cliniques que biologiques, essentiellement du fait de la simplicité/complexité des études à mener. Des résultats des 2 études cliniques portant sur ce sujet et auxquelles nous avons participé, il ressort que l'âge jeune du patient, la taille importante de la tumeur et sa localisation extra-abdominale soient des facteurs de récurrence après exérèse chirurgicale. Bien qu'issues de séries rétrospectives, on peut considérer que ces résultats soient valables, compte-tenu de la très grande taille des effectifs étudiés et de la concordance des résultats entre les 2 études. Aujourd'hui, il me semble légitime de commencer à intégrer dans nos discussions en RCP ces 3 facteurs cliniques : la présence de ces facteurs de récurrence chez un patient devrait orienter la stratégie de prise en charge vers une surveillance plutôt qu'une chirurgie d'exérèse, compte-tenu du risque élevé de récurrence.

2. Facteurs pronostiques biologiques

La présence de la mutation S45F de *CTNNB1* est le seul facteur de récurrence biologique identifié à ce jour. Ce résultat doit être confirmé de 2 manières avant de s'intégrer à nos discussions :

- confirmation de l'impact pronostique de S45F par des études cliniques plus larges et prospectives dans l'idéal,
- identification du mécanisme biologique sous-tendant cet impact pronostique : les conséquences fonctionnelles de la présence de cette mutation doivent être explorées *in vitro* et *in vivo* par l'étude de lignées cellulaires transfectées par cette mutation.

L'étude des miRs comme facteur pronostique abordée dans nos travaux, doit être approfondie, pour les FA mais aussi de manière plus générale. L'impact pronostique des miRs a été une surprise dans notre étude initialement élaborée pour identifier des facteurs prédictifs de réponse au traitement médical. De cela découle plusieurs conséquences : statistiquement significative, la corrélation entre le profil miR et la survie sans récurrence en fait une piste très intéressante. Toutefois, la cohorte de patients analysés, tous récidivants et multitraités, et la survie sans récurrence étudiés (survie sans progression après l'arrêt de l'imatinib) ne sont pas pertinents. Même si la cohorte rétrospective de validation, plus adaptée, confirme ces résultats, la validation sur une cohorte large, indépendante et prospective sera indispensable.

L'impact réel, biologique, des miRs sur les gènes dont le transcrit est ciblé et l'expression protéique qui en découle doit être précisé.

3. Facteurs prédictifs

L'utilisation des traitements systémiques dans les FA doit être globalement repensée. L'efficacité réelle des traitements reste à déterminer. Il est évident que, face à ces tumeurs qui présentent spontanément des stabilisations dans 50% des cas et des réponses objectives dans 20% des cas, l'utilisation des critères RECIST, habituelle dans l'évaluation des cancers, ne soit pas pertinente. Etudiant une tumeur qui ne métastase pas, les

symptômes et la qualité de vie du patient devraient être beaucoup plus pris en compte. De plus, il est perturbant de constater que ces taux d'évolution naturelle ne soient finalement pas très différents des taux de réponse observés sous traitement : taux de réponse partielle de 20-50% dans les essais randomisés de chimiothérapie, 25% de réponse objective et 50% de stabilisations dans les essais de phase II évaluant l'hormonothérapie ou une association hormonothérapie/AINS. Les 3 essais de phase II évaluant l'imatinib rapportent 6 à 15% de réponses objectives. On manque actuellement de grandes séries rétrospectives et prospectives pour évaluer précisément l'évolution naturelle de la maladie. En attendant, on est en droit de se demander si l'efficacité rapportée dans ces essais reflète réellement une activité du médicament ou tout simplement cette évolution naturelle. Seul des essais randomisés, contre placebo en l'absence de bras standard, permettront de trancher cette question de manière formelle. Une manière d'optimiser les résultats de ces essais serait d'identifier des cibles pour sélectionner les patients, que ce soit les cibles de traitements actuels ou les cibles de nouveaux médicaments.

Nos travaux ne nous ont pas permis d'identifier de facteurs biologiques prédictifs de réponse à l'imatinib.

C. Les limites de notre travail

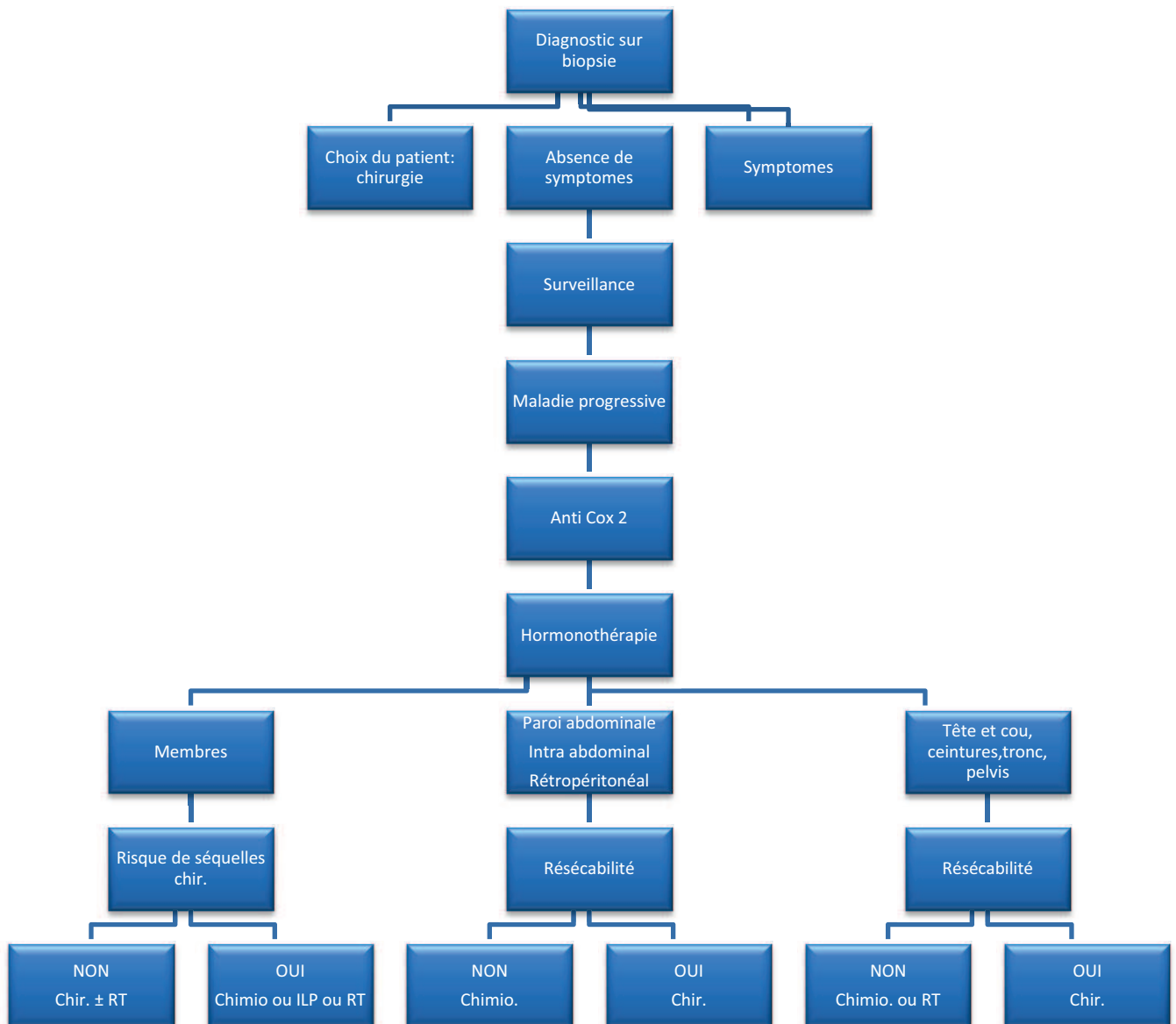
L'avancée de nos travaux s'est heurtée à différentes caractéristiques cliniques et biologiques liées aux FA :

- Les démonstrations statistiques sont rendues très difficiles par le faible nombre de cas étudiés et le faible nombre d'évènements. Ces tumeurs sont globalement rares. Elles sont mal connues, les erreurs diagnostiques sont fréquentes. Peu d'essais cliniques sont développés. L'absence de métastases, et donc de décès liés à la maladie nous empêche d'étudier la survie globale des patients. La survie sans progression est biaisée par la proportion non négligeable de patients dont la tumeur est spontanément stable voire régressive.
- Le matériel biologique disponible est souvent difficilement exploitable. Comme pour beaucoup de tumeurs, on dispose essentiellement de blocs FFPE (et non pas de matériel congelé) qui altère la conservation des acides nucléiques et des protéines phosphorylées. De plus, ces tumeurs sont peu cellulaires et très fibrotiques (le collagène inhibe les PCR).

D. Propositions stratégiques

1. Stratégie clinique

Aujourd'hui, il semble licite de proposer l'algorithme suivant dans la stratégie de prise en charge des FA :



Bien sûr, à chaque étape de décision thérapeutique doit se poser la question de l'inclusion possible dans un essai clinique, de stratégie ou de thérapeutique (actuellement, l'essai « Desmopaz » est un essai randomisé de phase II évaluant le pazopanib comparé à l'association méthotrexate-vinblastine dans les FA). Tout nouveau cas de FA doit être référencé dans la base nationale des traitements systémiques des FA.

Les résultats de l'essai clinique de phase II du Dr Bonvalot (en cours) évaluant de manière prospective l'évolution des FA simplement surveillées seront fondamentaux pour définitivement intégrer cette stratégie dans nos pratiques et apporter des données inédites sur l'évolution naturelle de la maladie. L'identification de facteurs cliniques pronostiques, permettant de prédire l'évolutivité d'une tumeur en place, seront essentiels dans la discussion de stratégie de prise en charge des patients, d'autant plus qu'ils seront associés aux facteurs cliniques de récurrence identifiés dans nos travaux.

Enfin, le projet développé au niveau national, d'établir une base clinico-biologique des FA, prospective sur 3 ans, permettra de répondre à plusieurs questions :

- incidence exacte de la maladie par un recueil exhaustif des cas,
- identification de facteurs associés au développement des FA (traumatisme, intervention chirurgicale...),
- analyse du caractère mutuellement exclusif des anomalies moléculaires de *CTNNB1* et *APC* et identification d'autres anomalies génétiques,
- facteurs de progression d'une tumeur en place,
- contrôle local après traitement focal,
- résultat en population réelle des traitements systémiques utilisés hors essai,
- évolutivité pendant/après grossesse,
- particularités des formes pédiatriques.

2. Stratégie de recherche biologique

De multiples travaux de recherche peuvent être développés pour poursuivre l'exploration des mécanismes biologiques des FA.

Le diagnostic de FA est maintenant confirmé grâce à l'aide de la biologie moléculaire. Dans le cadre d'un syndrome de Gardner, les FA sont liées à une mutation du gène *APC* et dans le cadre de FA sporadiques, le gène *CTNNB1* est muté. La recherche de ces mutations est maintenant effectuée en routine pour confirmer le diagnostic de FA. Trois questions persistent:

- les mutations d'*APC* et *CTNNB1* sont-elles mutuellement exclusives ? (ou faut-il les rechercher toutes les 2 systématiquement ?).
- D'autres mutations spécifiques des FA existent-elles ? Cette notion est défendue par le fait qu'un certain nombre ($\approx 10\%$) de FA ne contiennent ni mutation d'*APC* ni de *CTNNB1*. On ne peut aujourd'hui exclure qu'il y ait d'autres mutations que *APC* ou *CTNNB1* impliquées dans la carcinogénèse des FA et qui surviennent seules ou associées aux mutations déjà connues. Leur identification pourrait avoir un intérêt diagnostique et orienter vers d'autres mécanismes de carcinogénèse.
- Les mutations d'*APC* et *CTNNB1* sont des mutations pilotes mais sont-elles suffisantes au développement des FA ? Dans ce cas, elles pourraient représenter des cibles thérapeutiques de choix, d'autant plus que les inhibiteurs de la voie Wnt/ β caténine commencent à se développer.

Le rôle pronostique du sous-type de mutation de *CTNNB1* peut être exploré de 2 manières : son impact réel pourra être déterminé à partir de l'essai prospectif du Dr Bonvalot et de la

base clinico-biologique. On pourra rechercher une corrélation statistique entre sa présence et l'évolutivité des tumeurs. On peut également imaginer développer un modèle pré-clinique, avec transfection de cellules par le gène *CTNNB1* porteur de la mutation S45F. Le type de lignées cellulaires à transfecter reste un problème : il n'existe pas, actuellement, de lignées cellulaires de FA, qui meurent après quelques dizaines de passages. La transfection de fibroblastes est un modèle imparfait (un temps utilisé dans notre laboratoire). Nous travaillons actuellement à la transfection de lignées de GIST (48B) ayant la caractéristique de ne pas exprimer le récepteur KIT à leur surface (ce qui est aussi le cas des FA). La prolifération cellulaire des lignées *CTNNB1* S45F pourra être analysée dans des modèles *in vitro* et *in vivo* et comparée à celle des lignées transfectées par les autres mutations ou porteuses du vecteur vide.

Pour déterminer réellement si le profil d'expression des miR a un poids pronostique dans ces tumeurs, il conviendrait de l'évaluer en prospectif, par exemple dans l'essai du Dr Bonvalot.

La constatation que les FA ne donnent jamais de métastases reste totalement inexpliquée. Quelques autres tumeurs, dites « à malignité intermédiaire » présentent également cette caractéristique. Ce qui est surprenant dans les FA est le potentiel d'agressivité loco-régional qui peut être très important avec envahissement majeur des structures de voisinage. Dans l'article référence sur les caractéristiques du cancer, Hanahan et Weinberg reprennent la thèse de Talmadge et Fidler (Talmadge and Fidler 2010) qui considèrent que « invasion » et « métastases » sont 2 étapes successives d'un seul et même processus. Sans beaucoup de rationnel scientifique, Vogelstein évoque également l'idée qu'il puisse exister des mutations génétiques qui transforment un cancer primitif en un cancer métastatique comme il existe des mutations qui transforment une cellule normale en tumeur bénigne et une tumeur bénigne en tumeur maligne (Bert Vogelstein *et al.* 2013). Vogelstein reconnaît également que ces mutations, qui seraient spécifiques des phénomènes de métastatisation, sont parfaitement inconnues à ce jour. L'observation des FA tend plutôt à défendre cette 2nde théorie. Elles représenteraient un excellent modèle pour étudier ces anomalies.

IV. CONCLUSION

Devant la multiplicité des anomalies des cellules cancéreuses et la complexité de leur étude, le schéma ci-après a été élaboré pour tenter de coordonner ces anomalies entre elles.

La conception de ce schéma m'a aidée à articuler entre eux les différents acteurs d'une cellule cancéreuse et les différents niveaux de lecture qu'il faut distinguer. Ces acteurs peuvent se répartir en 3 catégories : le gène, le transcrit et la protéine. Normalement, il doit y avoir une corrélation entre les 3 mais une anomalie génétique ne se traduit pas forcément par une anomalie protéique.

Il me semble licite de distinguer les anomalies génétiques initiatrices de tumeurs (ou carcinogènes ou « driver mutation » ou mutation pilote) des anomalies génétiques secondaires de l'activation anormale des voies de signalisation, qui confèrent leurs caractéristiques tumorales aux cellules. Via l'ARN messenger, ces anomalies initiales sont transmises aux protéines qui acquièrent ainsi des modifications quantitatives et/ou qualitatives. Vogelstein a listé 138 gènes pilotes (annexe 1) et considère cette liste quasiment exhaustive. Les thérapies ciblées ayant démontré des résultats d'efficacité tels qu'ils ont pu obtenir des autorisations de mise sur le marché ciblent des protéines dont le gène est souvent présent dans cette liste (ABL, ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KIT...). Il faut garder à l'esprit qu'un même gène puisse être oncogène ou gène suppresseur de tumeur en fonction du type de tumeur dans lequel il est présent. Il faut également intégrer l'hétérogénéité des tumeurs décrites par Vogelstein, et présente à plusieurs niveaux : hétérogénéité intra-tumorale, inter-métastatique, intra-métastatique, inter-patients. Aujourd'hui, l'attitude clinique de plus en plus pratiquée qui consiste à biopsier un site métastatique pour adapter la stratégie thérapeutique ne prend en compte qu'une toute petite partie de cette hétérogénéité. Parallèlement, ce système est sous le contrôle de phénomènes épigénétiques (méthylation, miRNA, longs ARN non codants).

Les anomalies quantitatives/qualitatives des protéines entraînent des modifications des voies de signalisation qui aboutissent à la transcription d'autres gènes conférant leur caractéristiques aux cellules tumorales.

Hétérogénéité - spatiale (intra-tum ; intra-méta, inter-méta, inter-patient)
- temporelle

Processus néoplasique : accumulation de mut. ou transloc. successives qui, chacune, stimulent la croissance cellulaire : « driver mutation ». Il faut 5 à 8 « hits » pour faire un cancer.
Le nombre de « passager mut. », sans lien avec le cancer, augmente avec l'âge

Cancer : 33-66 gènes ont des mutations somatiques
95% substitution

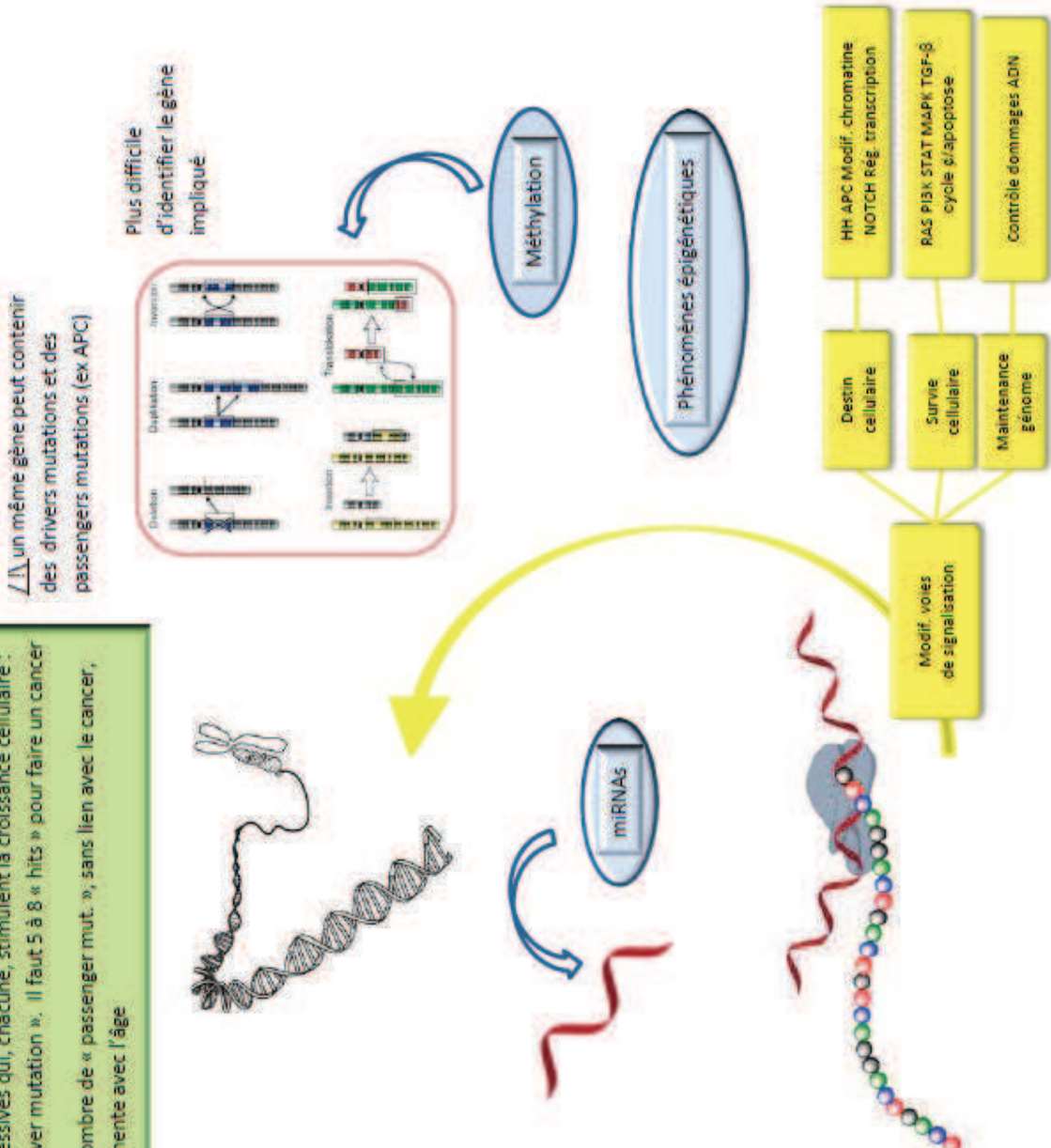
Substitution
Déletion
Insertion

Fréquence de mutations du gène
Oncogène > 20% mut. faux-sens sur des sites récurrents
Gène sup. tumeur > 20% mut. tronquante sur toute longueur

Identifier un gène driver

Prédire l'effet de la mutation sur la protéine :
modif. quantitative/qualitative

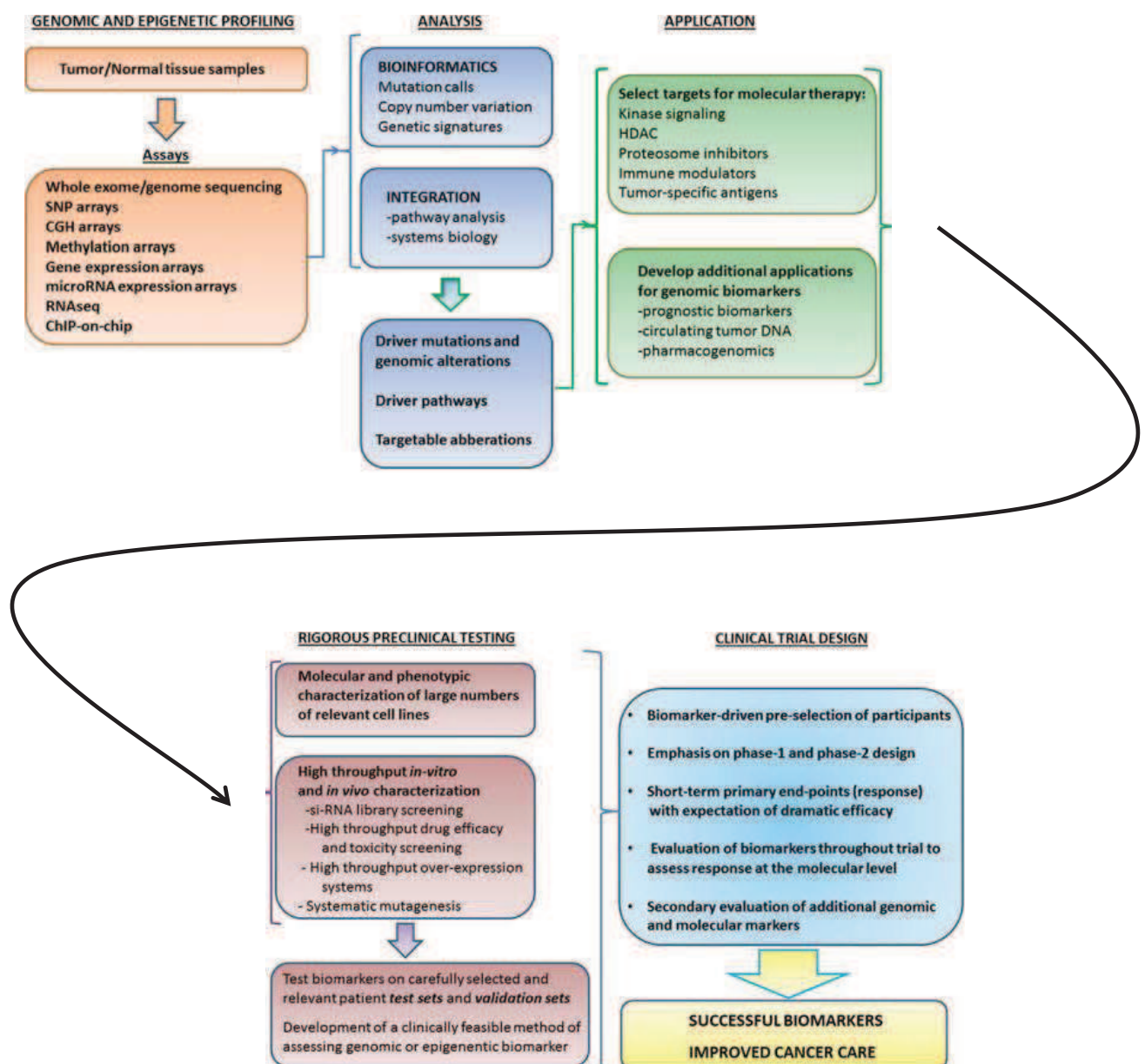
Aujourd'hui : 138 gènes porteurs de driver mut.
Autres ??.....pas sûr



Davoli *et al.* ont récemment encore compliqué ces notions autour des gènes pilotes en y intégrant l'aneuploïdie: ils ont analysé l'impact fonctionnel des mutations génétiques de 8200 tumeurs qui ont permis d'identifier environ 320 gènes suppresseurs de tumeur et 250 oncogènes (Davoli *et al.*, 2013). La dérégulation des cellules cancéreuses proviendrait de la somme de mutations d'oncogènes, et de perte de gènes suppresseurs de tumeurs. La distribution et la puissance (variable) de ces gènes pilotes sur les chromosomes serait l'élément essentiel pour prédire les pertes et gains caractéristiques de l'aneuploïdie.

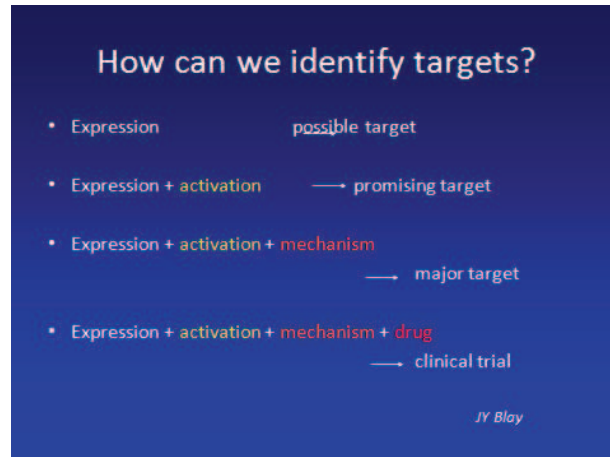
Le but initial du travail de cette thèse était d'identifier un ou des facteurs prédictifs de réponse à l'imatinib dans les FA. L'analyse protéique en IHC, épigénétique par étude des miRs et génétique par CAST-PCR n'a donné aucun résultat concluant. Comment, alors, orienter les recherches pour augmenter les chances de résultat, c'est-à-dire, comment identifier un (bon) facteur prédictif ?

Ow *et al.* (Ow *et al.* 2013) proposent la schématisation d'une démarche très complète pour intégrer la génomique du cancer dans la sélection de traitement :



Si la découverte d'Her2 et trastuzumab, d'Alk et crizotinib, ou de BRCA1 et inhibiteurs de PARP ont suivi en grande partie ces étapes, d'autres exemples passés ont montré que l'on pouvait identifier des biomarqueurs particulièrement efficaces en court-circuitant tout ce processus (KIT et imatinib mésylate).

Entre ces 2 extrêmes, JY Blay et JA Fletcher proposent la démarche ci-dessous :



Le fait de baser les recherches sur l'expression de cibles ne prend pas en compte les gènes suppresseurs de tumeurs qui sont pourtant présent en nombre bien plus grand que les oncogènes dans les cellules tumorales. L'analyse de l'activation de la cible recherche des anomalies qualitatives de la protéine mais pas quantitatives (qui peuvent pourtant être importantes, e. g. Her2). Le mécanisme dans lequel la cible est impliquée me semble fondamental ; s'il s'agit d'un mécanisme de carcinogénèse, elle sera sûrement pertinente. Le fait qu'une molécule ciblant existe déjà accélérera forcément le transfert vers la thérapeutique.

Au-delà de la recherche développée sur de solides concepts scientifiques, basés sur la continuité logique d'un processus initié par des analyses à large échelle permettant d'identifier de potentiels biomarqueurs confirmés dans des modèles pré-cliniques et aboutissant à la conception d'essais cliniques sur des populations sélectionnées de patients, la pratique m'est apparue toute autre : 40 patients atteints de FA ont été traités par de l'imatinib sans vrai rationnel scientifique mais plutôt motivé par un laboratoire pharmaceutique développant une thérapie ciblée dans plusieurs indications. Une fois les patients traités, on s'est posé la question de savoir par quel mécanisme biologique le traitement pouvait potentiellement être efficace. Toutefois, l'exercice intellectuel qui consiste à intégrer les résultats ainsi obtenus dans les données scientifiques n'en est pas moins intéressant et utile.

Aujourd'hui, dans les FA, on peut évoquer que l'évolution des tumeurs et la réponse au traitement dépendent de :

- La mutation primaire (*CTNNB1* ou *APC*)
- Les SNP (M541L de l'exon 10 de *KIT* par exemple)
- Les caractéristiques cliniques du patient (âge, activité génitale...) et de la tumeur (taille, topographie, envahissement...).

Bibliographie

- Allen, R.C. *et al.*, 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor *gene* correlates with X chromosome inactivation. *American journal of human genetics*, 51(6), pp.1229–39.
- Alman, B.A. *et al.*, 1997. Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is a monoclonal disorder. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 6(2), pp.98–101.
- Anon, 2012. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23 Suppl 7, pp.vii92–9.
- Apperley, J.F. *et al.*, 2002. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *The New England journal of medicine*, 347(7), pp.481–7.
- Ashley, D.J., 1969. Colonic cancer arising in polyposis coli. *Journal of medical genetics*, 6(4), pp.376–8.
- Ashton-Rickardt, P.G. *et al.*, 1989. High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene*, 4(10), pp.1169–74.
- Azzarelli, A. *et al.*, 2001. Low-dose chemotherapy with methotrexate and vinblastine for patients with advanced aggressive fibromatosis. *Cancer*, 92(5), pp.1259–64.
- Bacac, M. *et al.*, 2006. A gene expression signature that distinguishes desmoid tumours from nodular fasciitis. *The Journal of pathology*, 208(4), pp.543–53.
- Ballo, M.T. *et al.*, 1999. Desmoid tumor: prognostic factors and outcome after surgery, radiation therapy, or combined surgery and radiation therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(1), pp.158–67.
- Barbier, O. *et al.*, 2010. Primary or recurring extra-abdominal desmoid fibromatosis: assessment of treatment by observation only. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*, 96(8), pp.884–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075698> [Accessed March 25, 2014].
- Benoit, L. *et al.*, 2007. 3' Mutation of the APC gene and family history of FAP in a patient with apparently sporadic desmoid tumors. *Journal of clinical gastroenterology*, 41(3), pp.297–300.
- Bertani, E. *et al.*, 2012. Recurrence and prognostic factors in patients with aggressive fibromatosis. The role of radical surgery and its limitations. *World journal of surgical oncology*, 10, p.184.

- Bertario, L. *et al.*, 2001. Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 95(2), pp.102–7.
- Bocale, D. *et al.*, 2011. Anti-oestrogen therapy in the treatment of desmoid tumours: a systematic review. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 13(12), pp.e388–95.
- Bonvalot, S. *et al.*, 2008. Extra-abdominal primary fibromatosis: Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 34(4), pp.462–8.
- Brandal, P. *et al.*, 2003. Molecular cytogenetic characterization of desmoid tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*, 146(1), pp.1–7.
- Bridge, J.A. *et al.*, 1992. Clonal chromosomal abnormalities in desmoid tumors. Implications for histopathogenesis. *Cancer*, 69(2), pp.430–6.
- Bridge, J.A. *et al.*, 1999. Trisomies 8 and 20 characterize a subgroup of benign fibrous lesions arising in both soft tissue and bone. *The American journal of pathology*, 154(3), pp.729–33.
- Van Broekhoven, D.L.M. *et al.*, 2013. Local recurrence after surgery for primary extra-abdominal desmoid-type fibromatosis. *The British journal of surgery*, 100(9), pp.1214–9.
- Brueckl, W.M. *et al.*, 2005. Genetic testing for germline mutations of the APC gene in patients with apparently sporadic desmoid tumors but a family history of colorectal carcinoma. *Diseases of the colon and rectum*, 48(6), pp.1275–81.
- Brueckl, W.M. *et al.*, Ki-67 expression and residual tumour (R) classification are associated with disease-free survival in desmoid tumour patients. *Anticancer research*, 21(5), pp.3615–20.
- De Camargo, V.P. *et al.*, 2010. Clinical outcomes of systemic therapy for patients with deep fibromatosis (desmoid tumor). *Cancer*, 116(9), pp.2258–65.
- Carothers, A.M. *et al.*, 2012. Mesenchymal stromal cell mutations and wound healing contribute to the etiology of desmoid tumors. *Cancer research*, 72(1), pp.346–55.
- Caspari, R. *et al.*, 1995. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Human molecular genetics*, 4(3), pp.337–40.
- Cheon, S.S. *et al.*, 2002. beta-Catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), pp.6973–8.

- Cheon, S.S. *et al.*, 2006. Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), pp.692–701.
- Chugh, R. *et al.*, 2010. Efficacy of imatinib in aggressive fibromatosis: Results of a phase II multicenter Sarcoma Alliance for Research through Collaboration (SARC) trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(19), pp.4884–91.
- Colombo, C. *et al.*, 2013. CTNNB1 45F mutation is a molecular prognosticator of increased postoperative primary desmoid tumor recurrence: an independent, multicenter validation study. *Cancer*, 119(20), pp.3696–702.
- Colombo, C. *et al.*, 2012. FAP-related desmoid tumors: a series of 44 patients evaluated in a cancer referral center. *Histology and histopathology*, 27(5), pp.641–9.
- Constantinidou, A. *et al.*, 2011. Advanced aggressive fibromatosis: Effective palliation with chemotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 50(3), pp.455–61.
- Cottrell, S. *et al.*, 1992. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet*, 340(8820), pp.626–30.
- Couture, J. *et al.*, 2000. A germline mutation at the extreme 3' end of the APC gene results in a severe desmoid phenotype and is associated with overexpression of beta-catenin in the desmoid tumor. *Clinical genetics*, 57(3), pp.205–12.
- Davies, D.R. *et al.*, 1995. Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. *American journal of human genetics*, 57(5), pp.1151–8.
- Davoli T, *et al.*, 2013. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome *Cell*, 155(4), pp 948-62.
- Debled, M. *et al.*, 2012. Complete response to exemestane in a patient with a desmoid tumor. *Future oncology (London, England)*, 8(4), pp.483–6.
- Deyrup, A.T., Tretiakova, M. & Montag, A.G., 2006. Estrogen receptor-beta expression in extraabdominal fibromatoses: an analysis of 40 cases. *Cancer*, 106(1), pp.208–13.
- Dobbie, Z. *et al.*, 1996. Correlation between the development of extracolonic manifestations in FAP patients and mutations beyond codon 1403 in the APC gene. *Journal of medical genetics*, 33(4), pp.274–80.
- Eccles, D.M. *et al.*, 1996. Hereditary desmoid disease due to a frameshift mutation at codon 1924 of the APC gene. *American journal of human genetics*, 59(6), pp.1193–201.
- Emori, M. *et al.*, 2014. Desmoid tumor-associated pain is dependent on mast cell expression of cyclooxygenase-2. *Diagnostic pathology*, 9, p.14.

- Erben, P. *et al.*, 2012. Molecular analysis of desmoid tumors with a high-density single-nucleotide polymorphism array identifies new molecular candidate lesions. *Onkologie*, 35(11), pp.684–9.
- Fiore, M. *et al.*, 2009. Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Annals of surgical oncology*, 16(9), pp.2587–93.
- Fletcher, J.A. *et al.*, 1995. Chromosome aberrations in desmoid tumors. Trisomy 8 may be a predictor of recurrence. *Cancer genetics and cytogenetics*, 79(2), pp.139–43.
- Fodde, R., Smits, R. & Clevers, H., 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(1), pp.55–67.
- Garbay, D. *et al.*, 2012. Chemotherapy in patients with desmoid tumors: a study from the French Sarcoma Group (FSG). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(1), pp.182–6.
- Gebert, C. *et al.*, 2007. Expression of beta-catenin and p53 are prognostic factors in deep aggressive fibromatosis. *Histopathology*, 50(4), pp.491–7.
- Gebert, J.F. *et al.*, 1999. Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. *Annals of surgery*, 229(3), pp.350–61.
- Gega, M. *et al.*, 2006. Successful chemotherapeutic modality of doxorubicin plus dacarbazine for the treatment of desmoid tumors in association with familial adenomatous polyposis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(1), pp.102–5.
- Giarola, M. *et al.*, 1998. Mutations of adenomatous polyposis coli (APC) gene are uncommon in sporadic desmoid tumours. *British journal of cancer*, 78(5), pp.582–7.
- Gonçalves, A. *et al.*, 2006. Response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(8), pp.562–3.
- Gouin, F. *et al.*, 2007. [Rating of tumoral growth in non-operated primary or recurrent extra-abdominal aggressive fibromatosis]. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*, 93(6), pp.546–54.
- Gounder, M.M. *et al.*, 2011. Activity of Sorafenib against desmoid tumor/deep fibromatosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(12), pp.4082–90.
- Grabellus, F. *et al.*, 2011. The prevalence of the c-kit exon 10 variant, M541L, in aggressive fibromatosis does not differ from the general population. *Journal of clinical pathology*, 64(11), pp.1021–4.
- Groden, J. *et al.*, 1991. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), pp.589–600.

- Gronchi, A. *et al.*, 2003. Quality of surgery and outcome in extra-abdominal aggressive fibromatosis: a series of patients surgically treated at a single institution. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(7), pp.1390–7.
- Gronchi, A. *et al.*, 2014. Sporadic desmoid-type fibromatosis: a stepwise approach to a non-metastasising neoplasm--a position paper from the Italian and the French Sarcoma Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25(3), pp.578–83.
- Le Guellec, S. *et al.*, 2012. CTNNB1 mutation analysis is a useful tool for the diagnosis of desmoid tumors: a study of 260 desmoid tumors and 191 potential morphologic mimics. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 25(12), pp.1551–8.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hansmann, A. *et al.*, 2004. High-dose tamoxifen and sulindac as first-line treatment for desmoid tumors. *Cancer*, 100(3), pp.612–20. He, T.C. *et al.*, 1999. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 99(3), pp.335–45.
- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Demetri, G.D., *et al.*, 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(23), pp.4342–9.
- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Duensing, A., *et al.*, 2003. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5607), pp.708–10.
- Heinrich, M.C. *et al.*, 2006. Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(7), pp.1195–203.
- Hirota, S. *et al.*, 1998. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), pp.577–80. Honeyman, J.N. *et al.*, 2013. Desmoid fibromatosis in children and adolescents: a conservative approach to management. *Journal of pediatric surgery*, 48(1), pp.62–6.
- Hoos, A. *et al.*, 2001. Characterization of molecular abnormalities in human fibroblastic neoplasms: a model for genotype-phenotype association in soft tissue tumors. *Cancer research*, 61(7), pp.3171–5.
- Huang, K. *et al.*, 2013. Prognostic factors influencing event-free survival and treatments in desmoid-type fibromatosis: analysis from a large institution. *American journal of surgery*.
- Huss, S. *et al.*, 2013. β -catenin (CTNNB1) mutations and clinicopathological features of mesenteric desmoid-type fibromatosis. *Histopathology*, 62(2), pp.294–304.

- Jo, J.-C. *et al.*, 2014. A prospective multicenter phase II study of sunitinib in patients with advanced aggressive fibromatosis. *Investigational new drugs*, 32(2), pp.369–76.
- Joensuu, H. *et al.*, 2001. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *The New England journal of medicine*, 344(14), pp.1052–6.
- Kasper, B. *et al.*, 2013. Positron emission tomography as a surrogate marker for evaluation of treatment response in patients with desmoid tumors under therapy with imatinib. *BioMed research international*, 2013, p.389672.
- Keus, R.B. *et al.*, 2013. Results of a phase II pilot study of moderate dose radiotherapy for inoperable desmoid-type fibromatosis--an EORTC STBSG and ROG study (EORTC 62991-22998). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(10), pp.2672–6.
- Kim, K. *et al.*, 2000. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Molecular biology of the cell*, 11(10), pp.3509–23.
- Kinzler, K.W. *et al.*, 1991. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5020), pp.661–5.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), pp.159–70.
- Klaus, A. & Birchmeier, W., 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 8(5), pp.387–98.
- Knudson, A.G., 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), pp.820–3.
- Kopp, P. *et al.*, 1997. Clonal X-inactivation analysis of human tumours using the human androgen receptor gene (HUMARA) polymorphism: a non-radioactive and semiquantitative strategy applicable to fresh and archival tissue. *Molecular and cellular probes*, 11(3), pp.217–28.
- Lamlum, H. *et al.*, 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's "two-hit" hypothesis. *Nature medicine*, 5(9), pp.1071–5.
- Larramendy, M.L. *et al.*, 1998. Chromosome band 1q21 is recurrently gained in desmoid tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 23(2), pp.183–6.
- Lazar, A.J.F. *et al.*, 2008. Specific mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. *The American journal of pathology*, 173(5), pp.1518–27.
- Leppert, M. *et al.*, 1987. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4832), pp.1411–3.

- Leithner, A. *et al.*, 2004. Margins in extra-abdominal desmoid tumors: a comparative analysis. *Journal of surgical oncology*, 86(3), pp.152–6.
- Leithner, A. *et al.*, 2005. Immunohistochemical analysis of desmoid tumours. *Journal of clinical pathology*, 58(11), pp.1152–6.
- Lev, D. *et al.*, 2007. Optimizing treatment of desmoid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(13), pp.1785–91.
- Li, M. *et al.*, 1996. Desmoid fibromatosis is a clonal process. *Human pathology*, 27(9), pp.939–43.
- Lucas, D.R. *et al.*, 2003. c-Kit expression in desmoid fibromatosis. Comparative immunohistochemical evaluation of two commercial antibodies. *American journal of clinical pathology*, 119(3), pp.339–45.
- Lux, M.L. *et al.*, 2000. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *The American journal of pathology*, 156(3), pp.791–5.
- Maher, E.R. *et al.*, 1992. Phenotypic variation in hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. Association with infiltrative fibromatosis (desmoid tumor). *Cancer*, 69(8), pp.2049–51.
- Martin-Liberal, J. *et al.*, 2013. Pazopanib is an active treatment in desmoid tumour/aggressive fibromatosis. *Clinical sarcoma research*, 3(1), p.13.
- Matono, H. *et al.*, 2011. Abnormalities of the Wnt/ β -catenin signalling pathway induce tumour progression in sporadic desmoid tumours: correlation between β -catenin widespread nuclear expression and VEGF overexpression. *Histopathology*, 59(3), pp.368–75.
- Mayer, M. *et al.*, 2007. Molecular cytogenetic analysis of chromosome aberrations in desmoid tumors. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 58(3), pp.167–71.
- Von Mehren, M. *et al.*, 2012. Soft tissue sarcoma, version 2.2012: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 10(8), pp.951–60.
- Merchant, N.B. *et al.*, 1999. Extremity and trunk desmoid tumors: a multifactorial analysis of outcome. *Cancer*, 86(10), pp.2045–52.
- Mertens, F. *et al.*, 1995. Trisomy 20 is a primary chromosome aberration in desmoid tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 63(4), pp.527–9.
- Mignemi, N.A. *et al.*, 2012. Signal transduction pathway analysis in desmoid-type fibromatosis: transforming growth factor- β , COX2 and sex steroid receptors. *Cancer science*, 103(12), pp.2173–80.

- Mills, B.G., Frausto, A. & Brien, E., 2000. Cytokines associated with the pathophysiology of aggressive fibromatosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 18(4), pp.655–62.
- Misemer, B.S. *et al.*, 2014. Expression of FAP, ADAM12, WISP1, and SOX11 is heterogeneous in aggressive fibromatosis and spatially relates to the histologic features of tumor activity. *Cancer medicine*, 3(1), pp.81–90.
- Miyaki, M. *et al.*, 1993. Coexistence of somatic and germ-line mutations of APC gene in desmoid tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer research*, 53(21), pp.5079–82.
- Miyoshi, Y. *et al.*, 1998. Frequent mutations in the beta-catenin gene in desmoid tumors from patients without familial adenomatous polyposis. *Oncology research*, 10(11-12), pp.591–4.
- Mullen, J.T. *et al.*, 2012. Desmoid tumor: analysis of prognostic factors and outcomes in a surgical series. *Annals of surgical oncology*, 19(13), pp.4028–35.
- Mullen, J.T. *et al.*, 2013. β -Catenin mutation status and outcomes in sporadic desmoid tumors. *The oncologist*, 18(9), pp.1043–9.
- Muller, E. *et al.*, 1996. Molecular genetic and immunohistochemical analysis of the tumor suppressor genes Rb and p53 in palmar and aggressive fibromatosis. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 5(3), pp.194–200.
- Nieuwenhuis, M.H. & Vasen, H.F.A., 2007. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Critical reviews in oncology/hematology*, 61(2), pp.153–61.
- Nishida, Y. *et al.*, 2010. Successful treatment with meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor, of patients with extra-abdominal desmoid tumors: a pilot study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(6), pp.e107–9.
- Nusse, R. & Varmus, H.E., 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), pp.99–109.
- Nuytens, J.J. *et al.*, 2000. Surgery versus radiation therapy for patients with aggressive fibromatosis or desmoid tumors: A comparative review of 22 articles. *Cancer*, 88(7), pp.1517–23.
- Okamoto, M. *et al.*, 1990. Molecular nature of chromosome 5q loss in colorectal tumors and desmoids from patients with familial adenomatous polyposis. *Human genetics*, 85(6), pp.595–9.

- Oshima, M. *et al.*, 1995. Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), pp.4482–6.
- Oshima, M. *et al.*, 1996. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, 87(5), pp.803–9.
- Ow, T.J. *et al.*, 2013. Integration of cancer genomics with treatment selection: From the genome to predictive biomarkers. *Cancer*, 119(22), pp.3914–28.
- Patel, S.R., Evans, H.L. & Benjamin, R.S., 1993. Combination chemotherapy in adult desmoid tumors. *Cancer*, 72(11), pp.3244–7.
- Penel, N. *et al.*, 2011. Imatinib for progressive and recurrent aggressive fibromatosis (desmoid tumors): an FNCLCC/French Sarcoma Group phase II trial with a long-term follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22(2), pp.452–7.
- Peng, P.D. *et al.*, 2012. Management and recurrence patterns of desmoids tumors: a multi-institutional analysis of 211 patients. *Annals of surgical oncology*, 19(13), pp.4036–42.
- Poon, R. *et al.*, 2001. Cyclooxygenase-two (COX-2) modulates proliferation in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene*, 20(4), pp.451–60.
- Poon, R. *et al.*, 2012. A high throughput screen identifies Nefopam as targeting cell proliferation in β -catenin driven neoplastic and reactive fibroproliferative disorders. *PLoS one*, 7(5), p.e37940.
- Qi, H. *et al.*, 1996. Trisomies 8 and 20 in desmoid tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*, 92(2), pp.147–9.
- Rao, U.N.M. *et al.*, 2013. Distinct profiles of oxidative stress-related and matrix proteins in adult bone and soft tissue osteosarcoma and desmoid tumors: a proteomics study. *Human pathology*, 44(5), pp.725–33.
- Ray-Coquard, I. *et al.*, 2012. Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(9), pp.2442–9.
- Reich, S. *et al.*, 1999. Low-dose chemotherapy with vinblastine and methotrexate in childhood desmoid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(3), p.1086.
- Reitamo, J.J. *et al.*, 1982. The desmoid tumor. I. Incidence, sex-, age- and anatomical distribution in the Finnish population. *American journal of clinical pathology*, 77(6), pp.665–73.

- Reitamo, J.J., Scheinin, T.M. & Häyry, P., 1986. The desmoid syndrome. New aspects in the cause, pathogenesis and treatment of the desmoid tumor. *American journal of surgery*, 151(2), pp.230–7.
- Reya, T. & Clevers, H., 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), pp.843–50.
- Robanus-Maandag, E. *et al.*, 2011. Familial adenomatous polyposis-associated desmoids display significantly more genetic changes than sporadic desmoids. *PloS one*, 6(9), p.e24354.
- Romero, S. *et al.*, 2012. Role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in desmoid-type fibromatosis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 461(2), pp.117–22.
- Saito, T. *et al.*, 2001. beta-catenin nuclear expression correlates with cyclin D1 overexpression in sporadic desmoid tumours. *The Journal of pathology*, 195(2), pp.222–8.
- Saito, T. *et al.*, 2002. Possible association between higher beta-catenin mRNA expression and mutated beta-catenin in sporadic desmoid tumors: real-time semiquantitative assay by TaqMan polymerase chain reaction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82(1), pp.97–103.
- Salas, S. *et al.*, 2010. Molecular characterization by array comparative genomic hybridization and DNA sequencing of 194 desmoid tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 49(6), pp.560–8.
- Santos, G.A.C. *et al.*, 2010. Evaluation of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, progesterone receptor, and cKIT expression in desmoids tumors and their role in determining treatment options. *Bioscience trends*, 4(1), pp.25–30.
- Sarlomo-Rikala, M. *et al.*, 1998. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(8), pp.728–34.
- Sato, M., 2006. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids. *Acta dermato-venereologica*, 86(4), pp.300–7.
- Seinfeld, J. *et al.*, 2006. Desmoid-type fibromatoses involving the brachial plexus: treatment options and assessment of c-KIT mutational status. *Journal of neurosurgery*, 104(5), pp.749–56.
- Shih, I.M. *et al.*, 2000. The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer research*, 60(6), pp.1671–6.
- Shin, S.H. *et al.*, 2013. Surgical outcome of desmoid tumors: adjuvant radiotherapy delayed the recurrence, but did not affect long-term outcomes. *Journal of surgical oncology*, 108(1), pp.28–33.

- Signoroni, S. *et al.*, 2007. Cyclooxygenase-2 and platelet-derived growth factor receptors as potential targets in treating aggressive fibromatosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(17), pp.5034–40.
- Sinha, A. *et al.*, 2011. Risk factors predicting desmoid occurrence in patients with familial adenomatous polyposis: a meta-analysis. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 13(11), pp.1222–9.
- Skapek, S.X. *et al.*, 1998. Combination chemotherapy using vinblastine and methotrexate for the treatment of progressive desmoid tumor in children. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16(9), pp.3021–7.
- Skapek, S.X. *et al.*, 2007. Vinblastine and methotrexate for desmoid fibromatosis in children: results of a Pediatric Oncology Group Phase II Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(5), pp.501–6.
- Skapek, S.X. *et al.*, 2013. Safety and efficacy of high-dose tamoxifen and sulindac for desmoid tumor in children: results of a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *Pediatric blood & cancer*, 60(7), pp.1108–12.
- Skene, A.I. *et al.*, 1998. Multimodality treatment in the control of deep musculoaponeurotic fibromatosis. *The British journal of surgery*, 85(5), pp.655–8.
- Skubitz, K.M. & Skubitz, A.P.N., 2004. Gene expression in aggressive fibromatosis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 143(2), pp.89–98.
- Smits, R. *et al.*, 1998. Apc1638N: a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology*, 114(2), pp.275–83.
- Smits, R. *et al.*, 1999. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes & development*, 13(10), pp.1309–21.
- Spear, M.A. *et al.*, 1998. Individualizing management of aggressive fibromatoses. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 40(3), pp.637–45.
- Stalinska, L. *et al.*, 2009. Analysis of pRb, p16INK4A proteins and proliferating antigens: PCNA, Ki-67 and MCM5 expression in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Histology and histopathology*, 24(3), pp.299–308.
- Stoeckle, E. *et al.*, 2009. A critical analysis of treatment strategies in desmoid tumours: a review of a series of 106 cases. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 35(2), pp.129–34.
- Su, L.K. *et al.*, 1992. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), pp.668–70.
- Talmadge, J.E. & Fidler, I.J., 2010. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), pp.5649–69.

- Tejpar, S. *et al.*, 1999. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene*, 18(47), pp.6615–20.
- Vogelstein, B. *et al.*, 1985. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4687), pp.642–5.
- Vogelstein, B. *et al.*, 2013. Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), pp.1546–58.
- Wallis, Y.L. *et al.*, 1999. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *Journal of medical genetics*, 36(1), pp.14–20.
- Weiss, A.J. *et al.*, 1999. Therapy of desmoid tumors and fibromatosis using vinorelbine. *American journal of clinical oncology*, 22(2), pp.193–5.
- Weiss, A.J. & Lackman, R.D., 1989. Low-dose chemotherapy of desmoid tumors. *Cancer*, 64(6), pp.1192–4.
- De Wever, I. *et al.*, 2000. Cytogenetic, clinical, and morphologic correlations in 78 cases of fibromatosis: a report from the CHAMP Study Group. CHromosomes And Morphology. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 13(10), pp.1080–5. Available
- Wu, C. *et al.*, 2010. Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells. *Cancer research*, 70(19), pp.7690–8.
- Zhang, H.-Y. *et al.*, 2010. [Expression of beta-catenin and estrogen receptor in desmoid-type fibromatosis]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 41(1), pp.101–5.

ANNEXES

Annexe 1 Liste des 138 “drivers genes” répertoriés par Vogelstein

Driver genes affected by subtle mutations

Gene Symbol	Gene Name	Ocogene score*	Tumor Suppressor Gene score*	Classification*	Core pathway
ABL1	c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase	93%	0%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
ACVR1B	activin A receptor, type IB	0%	42%	TSG	TGF- β
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	93%	1%	Oncogene	PI3K
ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	72%	1%	Oncogene	PI3K; RAS
APC	adenomatous polyposis coli	2%	92%	TSG	APC
AR	androgen receptor	54%	0%	Oncogene	Transcriptional Regulation
ARID1A	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	1%	83%	TSG	Chromatin Modification
ARID1B	AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	0%	50%	TSG	Chromatin Modification
ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	0%	56%	TSG	Chromatin Modification
ASXL1	additional sex combs like 1 (Drosophila)	5%	87%	TSG	Chromatin Modification
ATM	similar to Serine-protein kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T, mutated); ataxia telangiectasia mutated	24%	30%	TSG	DNA Damage Control
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	4%	47%	TSG	Chromatin Modification
AXIN1	axin 1	20%	27%	TSG	APC
B2M	beta-2-microglobulin	18%	39%	TSG	PI3K; RAS; MAPK
BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	8%	70%	TSG	DNA Damage Control
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	27%	1%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
BCOR	BCL6 co-repressor	0%	70%	TSG	Transcriptional Regulation
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	100%	0%	Oncogene	RAS
BRCA1	breast cancer 1, early onset	0%	69%	TSG	DNA Damage Control
BRCA2	breast cancer 2, early onset	0%	30%	TSG	DNA Damage Control
CARD11	caspase recruitment domain family, member 11	30%	1%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	0%	52%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	57%	9%	Oncogene	PI3K; RAS
CDC73	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	4%	78%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	14%	52%	TSG	APC
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	32%	49%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	30%	54%	TSG	PI3K; RAS; MAPK
CIC	capicua homolog (Drosophila)	12%	31%	TSG	RAS
CREBBP	CREB binding protein	24%	34%	TSG	Chromatin Modification; Transcriptional Regulation

CRLF2	cytokine receptor-like factor 2	100%	0%	Oncogene	STAT
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	50%	15%	Oncogene	PI3K; RAS
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	92%	1%	Oncogene	APC
CYLD	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	0%	85%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
DAXX	death-domain associated protein	7%	61%	TSG	Chromatin Modification; Cell Cycle/Apoptosis
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	36%	5%	Oncogene	Chromatin Modification
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	74%	12%	Oncogene	Chromatin Modification
EGFR	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	97%	0%	Oncogene	PI3K; RAS
EP300	E1A binding protein p300	12%	32%	TSG	Chromatin Modification; APC; TGF-β; NOTCH
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	67%	3%	Oncogene	PI3K; RAS
EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	67%	12%	Oncogene	Chromatin Modification
FAM123B	family with sequence similarity 123B	4%	66%	TSG	APC
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7	55%	18%	TSG	NOTCH
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	49%	6%	Oncogene	PI3K; RAS ; STAT
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	99%	0%	Oncogene	PI3K; RAS ; STAT
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	98%	0%	Oncogene	RAS; PI3K; STAT
FOXL2	forkhead box L2	100%	0%	Oncogene	TGF-β
FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	0%	70%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	8%	84%	TSG	NOTCH, TGF-β
GATA2	GATA binding protein 2	53%	4%	Oncogene	NOTCH, TGF-β
GATA3	GATA binding protein 3	9%	66%	TSG	Transcriptional Regulation
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	92%	1%	Oncogene	PI3K; RAS; MAPK
GNAQ	guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide	95%	1%	Oncogene	PI3K;RAS; MAPK
GNAS	GNAS complex locus	93%	2%	Oncogene	APC; PI3K; TGF-β, RAS
H3F3A	H3 histone, family 3B (H3.3B); H3 histone, family 3A pseudogene; H3 histone, family 3A; similar to H3 histone, family 3B; similar to histone H3.3B	93%	0%	Oncogene	Chromatin Modification
HIST1H3B	histone cluster 1, H3j; histone cluster 1, H3i; histone cluster 1, H3h; histone cluster 1, H3g; histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3e; histone cluster 1, H3d; histone cluster 1, H3c; histone cluster 1, H3b; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H2ad; histone cluster 2, H3a; histone cluster 2, H3c; histone cluster 2, H3d	60%	0%	Oncogene	Chromatin Modification
HNF1A	HNF1 homeobox A	29%	55%	TSG	APC
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	96%	0%	Oncogene	RAS

IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	100%	0%	Oncogene	Chromatin Modification
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	99%	0%	Oncogene	Chromatin Modification
JAK1	Janus kinase 1	26%	18%	Oncogene	STAT
JAK2	Janus kinase 2	100%	0%	Oncogene	STAT
JAK3	Janus kinase 3	60%	6%	Oncogene	STAT
KDM5C	lysine (K)-specific demethylase 5C	0%	62%	TSG	Chromatin Modification
KDM6A	lysine (K)-specific demethylase 6A	0%	72%	TSG	Chromatin Modification
KIT	similar to Mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR) (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit) (c-kit) (CD117 antigen); v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	90%	0%	Oncogene	PI3K; RAS; STAT
KLF4	Kruppel-like factor 4	80%	4%	Oncogene	Transcriptional Regulation; WNT
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	100%	0%	Oncogene	RAS
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	67%	0%	Oncogene	RAS
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	0%	63%	TSG	RAS; MAPK
MED12	mediator complex subunit 12	84%	0%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis; TGF- β
MEN1	multiple endocrine neoplasia I	7%	68%	TSG	Chromatin Modification
MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	61%	4%	Oncogene	PI3K; RAS
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	18%	37%	TSG	DNA Damage Control
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	1%	70%	TSG	Chromatin Modification
MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	5%	44%	TSG	Chromatin Modification
MPL	myeloproliferative leukemia virus oncogene	96%	0%	Oncogene	STAT
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	0%	65%	TSG	DNA Damage Control
MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	3%	68%	TSG	DNA Damage Control
MYD88	myeloid differentiation primary response gene (88)	92%	1%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
NCOR1	nuclear receptor co-repressor 1	11%	32%	TSG	Chromatin Modification
NF1	neurofibromin 1	2%	73%	TSG	RAS
NF2	neurofibromin 2 (merlin)	4%	89%	TSG	APC
NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	74%	1%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	44%	27%	TSG	NOTCH
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	0%	27%	TSG	NOTCH
NPM1	nucleophosmin 1 (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) pseudogene 21; hypothetical LOC100131044; similar to nucleophosmin 1; nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	2%	98%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	99%	0%	Oncogene	RAS
PAX5	paired box 5	42%	26%	TSG	Chromatin Modification
PBRM1	polybromo 1	0%	83%	TSG	Chromatin Modification
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	84%	1%	Oncogene	PI3K; RAS

PHF6	PHD finger protein 6	18%	61%	TSG	Transcriptional Regulation
PIK3CA	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	95%	1%	Oncogene	PI3K
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	14%	37%	TSG	PI3K
PPP2R1A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, alpha isoform	85%	2%	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	0%	64%	TSG	Chromatin Modification
PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)	7%	60%	TSG	HH
PTEN	phosphatase and tensin homolog; phosphatase and tensin homolog pseudogene 1	30%	55%	TSG	PI3K
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; similar to protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	90%	0%	Oncogene	RAS
RB1	retinoblastoma 1	4%	80%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
RET	ret proto-oncogene	86%	1%	Oncogene	RAS; PI3K
RNF43	ring finger protein 43	7%	43%	TSG	APC
RUNX1	runt-related transcription factor 1	34%	41%	TSG	Transcriptional Regulation
SETD2	SET domain containing 2	3%	47%	TSG	Chromatin Modification
SETBP1	SET binding protein 1	25%	4%	Oncogene	Chromatin Modification; Replication
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	91%	0%	Oncogene	Transcriptional Regulation
SMAD2	SMAD family member 2	0%	41%	TSG	TGF- β
SMAD4	SMAD family member 4	24%	39%	TSG	TGF- β
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	22%	22%	TSG	Chromatin Modification
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	16%	74%	TSG	Chromatin Modification
SMO	smoothened homolog (Drosophila)	51%	3%	Oncogene	HH
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	15%	46%	TSG	STAT
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	0%	70%	TSG	APC
SPOP	speckle-type POZ protein	66%	3%	Oncogene	Chromatin Modification; HH
SRSF2	SRSF2 serine/arginine-rich splicing factor 2	95%	2%	Oncogene	Transcriptional Regulation
STAG2	stromal antigen 2	0%	33%	TSG	DNA Damage Control
STK11	serine/threonine kinase 11	24%	52%	TSG	mTOR
TET2	tet oncogene family member 2	14%	70%	TSG	Chromatin Modification
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1%	80%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis; MAPK
TRAF7	TNF receptor-associated factor 7	61%	9%	TSG	Apoptosis
TP53	tumor protein p53	73%	20%	TSG	Cell Cycle/Apoptosis; DNA Damage Control
TSC1	tuberous sclerosis 1	0%	45%	TSG	PI3K
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor	86%	0%	Oncogene	PI3K; MAPK
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	92%	1%	Oncogene	Transcriptional Regulation
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	27%	60%	TSG	PI3K; RAS; STAT
WT1	Wilms tumor 1	10%	79%	TSG	Chromatin Modification

*Genes were classified as Oncogenes if they had an Oncogene Score >20% and classified as a Tumor Suppressor Gene (TSG) if the TSG Score was >20% (the 20/20 rule). The Oncogene Score was defined as the number of clustered mutations (i.e., missense mutations at the same amino acid or identical in-frame insertions or deletions) divided by the total number of mutations. The TSG Score was defined as the number of truncating mutations divided by the total number of mutations. Truncating mutations included nonsense mutations, insertions or deletions that alter the reading frame, splice-site mutations, or mutations at the normal stop codon predicted to result in a longer protein. When a gene had an oncogene score >20% and a TSG Score >5%, it was classified as a TSG because well-studied oncogenes rarely harbor stop codons. The major data source for this classification was the COSMIC database (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/). To be classified as an oncogene, there had to be >10 clustered mutations in this database. To be classified as a tumor suppressor gene, there had to be at least 7 inactivating mutations recorded in this database. In those cases in which 7 to 20 inactivating mutations were recorded in the COSMIC database, manual curation was performed. This curation was used to identify other examples of mutations not yet recorded in the COSMIC database and to exclude the most common artifacts encountered in next-generation sequencing, such as mapping errors and high mutation frequencies observed in normal tissues. Genes with mutations occurring predominantly in tumors with very high rates of mutation, such as in mismatch-repair deficient tumors or melanomas, were excluded. As more individual tumors are sequenced in the future, the 20/20 rule can be improved by (i) considering mutations only in particular tumor types, rather than in all tumor types combined (as done here); (ii) requiring a higher number (e.g., 15) of clustered or inactivating mutations as a threshold for inclusion; and (iii) for genes with thousands of recorded mutations, choose a random subset to calculate the Oncogene Score (if enough tumors are sequenced, all mutations will appear to be clustered)

Driver genes affected by amplification or homozygous deletion

<u>Gene Symbol</u>	<u>Gene Name</u>	<u>Genetic alteration</u>	<u>Classification</u>	<u>Core pathway</u>
CCND1	cyclin D1	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	Homozygous deletion	TSG	Cell Cycle/Apoptosis
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaro)	Homozygous deletion	TSG	Transcriptional Regulation
LMO1	LIM domain only 1 (rhombotin 1)	Amplification	Oncogene	Transcriptional Regulation
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	Homozygous deletion	TSG	MAPK
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	Amplification	Oncogene	Chromatin Modification
NKX2-1	NK2 homeobox 1	Amplification	Oncogene	PI3K; MAPK
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	Amplification	Oncogene	Cell Cycle/Apoptosis

Annexe 2 Publications présentées dans ces travaux

- Article 1

Prognostic factors influencing progression-free survival determined from a series of sporadic desmoid tumors: a wait-and-see policy according to tumor presentation. Salas S, Dufresne A, Bui B, Blay JY, Terrier P, Ranchere-Vince D, Bonvalot S, Stoeckle E, Guillou L, Le Cesne A, Oberlin O, Brouste V, Coindre JM. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 10;29(26):3553-8

- Article 2

A prognostic nomogram for prediction of recurrence in desmoid fibromatosis. Crago AM, Denton B, Salas S, Dufresne A, Mezhir JJ, Hameed M, Gonen M, Singer S, Brennan MF. *Ann Surg*. 2013 Aug;258(2):347-53

- Article 3

High frequency of b-catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management. J. Domont, S Salas, L Lacroix, V Brouste, P Saulnier, P Terrier, D Ranchere, A Neuville, A Leroux, L Guillou, R Sciot, F Collin, A Dufresne, J-Y Blay, A Le Cesne, J-M Coindre, S Bonvalot, and J Benard. *British Journal of Cancer* 2010; 102: 1032 - 1036

- Article 4

Identification of biological factors predictive of response to imatinib mesylate in aggressive fibromatosis. Dufresne A, Bertucci F, Penel N, Le Cesne A, Bui B, Tubiana-Hulin M, Ray-Coquard I, Cupissol D, Chevreau C, Perol D, Goncalves A, Jimenez M, Bringuier PP, Blay JY. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):482-5

- Article 5

A V530I Mutation in c-KIT Exon 10 Is Associated to Imatinib Response in Extraabdominal Aggressive Fibromatosis. Kurtz JE, Asmane I, Voegeli AC, Neuville A, Dufresne A, Litique V, Chevreau C, Bergerat JP. *Sarcoma*. 2010;2010:458156

- Article 6

Impact of KIT exon 10 M541L allelic variant on the response to imatinib in aggressive fibromatosis: analysis of the desminib series by competitive allele specific Taqman PCR technology. A. Dufresne, L. Alberti, M. Brahmi, H. Philippon, D. Perol and J.-Y. Blay. En cours de revision à *BMC Cancer*

- Article 7

miRNA expression profile of desmoid tumors predicts their aggressiveness. A. Dufresne, M. Paturel, L. Alberti, H. Philippon, AV Decouvellaere, P. Cassier, JY Blay. Soumis à *International Journal of Cancer*

Prognostic Factors Influencing Progression-Free Survival Determined From a Series of Sporadic Desmoid Tumors: A Wait-and-See Policy According to Tumor Presentation

Sébastien Salas, Armelle Dufresne, Binh Bui, Jean-Yves Blay, Philippe Terrier, Dominique Ranchere-Vince, Sylvie Bonvalot, Eberhard Stoeckle, Louis Guillou, Axel Le Cesne, Odile Oberlin, Véronique Brouste, and Jean-Michel Coindre

Sébastien Salas, L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U916, Bergonié Institute, Bordeaux; Binh Bui, Eberhard Stoeckle, Véronique Brouste, and Jean Michel Coindre, Bergonié Institute; Jean-Michel Coindre, University Victor Ségalen, Bordeaux; Sébastien Salas, Timone Hospital, Marseille; Armelle Dufresne, Jean-Yves Blay, and Dominique Ranchere-Vince, Leon Berard Center, Lyon; Philippe Terrier, Sylvie Bonvalot, Axel Le Cesne and Odile Oberlin, Gustave Roussy Institute, Villejuif; and Louis Guillou, University Institute of Pathology, Lausanne, Switzerland.

Submitted November 3, 2010; accepted June 23, 2011; published online ahead of print at www.jco.org on August 15, 2011.

Supported by the Connective Tissue Cancer Network and La Ligue National Contre le Cancer.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Sébastien Salas, MD, PhD, Département de Pathologie, Institut Bergonié, 229, cours de l'Argonne, Bordeaux, France CEDEX 33076; e-mail: sebastien.salas@ap-hm.fr.

© 2011 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/11/2926-3553/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2010.33.5489

ABSTRACT

Purpose

Desmoid tumors are mesenchymal fibroblastic/myofibroblastic proliferations with locoregional aggressiveness and high ability to recur after initial treatment. We present the results of the largest series of sporadic desmoid tumors ever published to determine the prognostic factors of these rare tumors.

Patients and Methods

Four hundred twenty-six patients with a desmoid tumor at diagnosis were included, and the following parameters were studied: age, sex, delay between first symptoms and diagnosis, tumor size, tumor site, previous history of surgery or trauma in the area of the primary tumor, surgical margins, and context of abdominal wall desmoids in women of child-bearing age during or shortly after pregnancy. We performed univariate and multivariate analysis for progression-free survival (PFS).

Results

In univariate analysis, age, tumor size, tumor site, and surgical margins (R2 v R0/R1) had a significant impact on PFS. PFS curves were not significantly different for microscopic assessment of surgical resection quality (R0 v R1). In multivariate analysis, age, tumor size, and tumor site had independent values. Three prognostic groups for PFS were defined on the basis of the number of independent unfavorable prognostic factors (0 or 1, 2, and 3).

Conclusion

This study clearly demonstrates that there are different prognostic subgroups of desmoid tumors that could benefit from different therapeutic strategies, including a wait-and-see policy.

J Clin Oncol 29:3553-3558. © 2011 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Desmoid tumors (or aggressive fibromatosis) are soft tissue tumors of clonal origin and mesenchymal fibroblastic/myofibroblastic proliferations, with an incidence of two to four new cases per million people per year.^{1,2} Tumorigenesis is linked to beta-catenin stabilization involving beta-catenin/WNT/TCF signaling.³ These benign tumors behave aggressively, deeply infiltrate tissues, and may relapse locoregionally but never metastasize.^{4,5} They arise in the abdominal wall, in the abdominal cavity or, more frequently, in the extremities or the trunk.⁶ Most desmoid tumors develop sporadically in young adults, although some cases occur in the context of Gardner's syndrome (a variant of familial adenomatous polyposis), and their location is more often intra-abdominal compared with the sporadic

form.⁷ Abdominal wall desmoids occur most commonly in women of child-bearing age during or shortly following pregnancy.⁸

Complete surgical removal remains the optimal treatment but may be difficult or mutilating according to the tumor location or local extension. Moreover, a significant proportion of patients will relapse locally and/or regionally after initial surgery. Recurrence rates ranging from 30% to 40% have been reported in the major published series.⁹ In this case, mutilating surgery and/or radiotherapy are often used with a large risk of functional consequences in the case of musculoskeletal or organ resections. When local treatments are not feasible, systemic therapies, including antiestrogen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, chemotherapy and, more recently, targeted therapy, may induce responses.¹⁰ In addition, some desmoids can spontaneously regress

or present growth arrest, so some patients should benefit from a wait-and-see policy without the use of aggressive therapies. For this reason, the benefit of surgery in curing desmoids has recently been questioned.^{4,11-15} The purpose of this study is to investigate the prognostic factors influencing progression-free-survival (PFS) of sporadic desmoids.

PATIENTS AND METHODS

Patient Selection

From February 1, 1965, to March 6, 2008, 426 consecutive patients with sporadic aggressive fibromatosis were diagnosed for their first tumoral event in 24 participating cancer centers and were entered into the European database.¹⁶ Twenty-five patients were excluded from this study because they presented desmoid tumors in the context of Gardner's syndrome. Patients considered as having Gardner's syndrome were those having an association of a desmoid tumor and family history of colorectal polyposis. We excluded this minority population to retain a homogeneous group knowing that PFS in these patients is significantly different from PFS in those with a sporadic desmoid tumor (Appendix Fig A1, online only). The diagnosis of desmoid tumors was con-

firmed in each case by collegial histologic analysis (mesenchymal fibroblastic/myofibroblastic proliferations).

Pathology Review

Histologic slides of all patients entered in this study were reviewed by the pathology subcommittee of the French Sarcoma Group (GSF). The subcommittee included 20 pathologists, and a monthly slide review session was performed. For each tumor, one to eight slides were collegially reviewed. Histologic typing was based on the WHO histologic typing of soft tissue tumors.¹⁷

Data Collection

Data regarding patients' characteristics, tumor description, treatment modalities and their results, and outcome were obtained from a retrospective review of medical records. These records and histologic data were entered into a centralized computerized database.¹⁶ The following eight variables were analyzed for their potential prognostic value: age at presentation, sex, delay between first symptoms and diagnosis, tumor size, tumor site, previous history of surgery or trauma in the area of the primary tumor, surgical margins (macroscopic incomplete resection as R2 resection; microscopic incomplete

Table 1. Patient and Disease Characteristics at Baseline

Characteristic	Overall Patients (N = 426)	
	No.	%
Age at diagnosis, years		
Median	37	
Range	0.3-83	
Sex		
Male	142	33.3
Female	284	66.7
Tumor localization		
Abdominal wall	74	17.4
Abdominal cavity	46	10.8
Extra-abdominal	296	69.5
Multifocal	10	2.3
Tumor size, cm		
Median	7	
Range	0.8-30	
Delay between first symptoms and diagnosis, months		
Median	4.74	
Range	0.1-142	
Extra-abdominal localization		
Trunk	119	40.2
Upper and lower limbs	109	36.8
Head and neck	27	9.1
Buttocks	22	7.4
Unknown	19	6.5
Limb localization		
Proximal	52	47.7
Distal	57	52.3
Context of abdominal wall desmoids in women of child-bearing age during or shortly after pregnancy		
Yes	33	7.7
Previous history of surgery in area of primary tumor		
Yes	36	8.4
Previous history of trauma in area of primary tumor		
Yes	17	3.9

Table 2. Treatment Characteristics and Outcome

Characteristic	Overall Patients (N = 426)		
	No.	%	95% CI
Surgery			
Yes	370	86.9	
No	56	13.1	
Wait-and-see policy			
Yes	27	6.3	
No	399	93.7	
Surgical margins			
Microscopically complete tumor resection (R0)	111	30	
Microscopically incomplete tumor resection (R1)	110	29.7	
Macroscopically incomplete resection (R2)	37	8.6	
Unknown	112	30.3	
Radiotherapy			
No radiotherapy	376	88.3	
Radiotherapy	43	10.1	
Unknown	7	1.6	
Medical treatment			
None	363	85.1	
Preoperative	6	1.5	
Postoperative	29	6.8	
Exclusive	23	5.4	
Unknown	5	1.2	
Median follow-up, months	52		43 to 60
Outcome			
Spontaneous remission after wait-and-see policy	5	1.2	
Stable disease after wait-and-see policy	16	3.8	
Progression after wait-and-see policy	6	1.4	
Progression during treatment	9	1.9	
Absence of residual tumor after treatment	323	75.8	
Residual tumor after treatment	63	14.7	
Currently under treatment	1	0.02	
Status unknown	4	1	
Median progression-free survival, months	41		29 to 53
Local recurrence for patients with absence of residual tumor after treatment	143	44.3	
Progression for patients with residual tumor after treatment	42	66.6	
Death from desmoid tumor	0		
Death	15	3.5	

resection as R1 resection; microscopic complete resection as R0 resection), and context of abdominal wall desmoids in women of child-bearing age during or shortly after pregnancy. The status of resection margins in surgically treated patients was classified according to the International Union Against Cancer (UICC) R classification.¹⁸ Absence of residual tumor after local treatment meant that the patients had no disease visible on imaging after surgery and/or radiotherapy.

Statistical Analysis

PFS is defined as time from the date of initial diagnosis to the date of progression or recurrence or last follow-up. Follow-up times were described as medians by using the inverse Kaplan-Meier estimator.¹⁹ Continuous variables were expressed as medians and range, and categorical variables were expressed as percentage. Survival curves were obtained by using the Kaplan-Meier method and were compared with the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to calculate adjusted hazard ratios (HRs) and their 95% CIs. All statistical tests were two-sided, and the threshold for statistical significance was $P = .05$. Variables with a P value of less than .05 in univariate analyses were tested in the multivariate analysis. Analyses were performed with SPSS software, version 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Patient and Disease Characteristics

Patient characteristics are listed in Table 1. The median age was 37 years (range, 0.3 to 83 years). Fifty-six patients (13%) were younger than age 18 years. Two thirds of the 426 patients were female. Tumor locations were as follows: abdominal wall, 74 (17.4%); abdominal cavity, 46 (10.8%); and extra-abdominal 296 (69.5%). Ten tumors (2.3%) were multifocal (lesions affecting more than one primary site). Among patients with an extra-abdominal tumor, 119 (40.2%) had fibromatosis arising in the trunk, 109 (36.8%) in the upper and lower limbs, 27 (9.1%) in the head and neck region, and 22 (7.4%) in the buttocks. Among patients with limb tumors, 57 (52.3%) had distal limb tumors and 52 (47.7%) had proximal limb tumors. Tumor size was known in 329 patients (77.2%), and the median largest diameter was 7.0 cm. Median time between first symptoms and diagnosis was 4.74 months (range, 0.1 to 142 months). Thirty-six patients (8.4%) had a previous history of surgery in the area of the primary tumor, and 17 (3.9%) had a previous history of trauma in the area of the primary

tumor. Thirty-three (7.7%) abdominal wall desmoids occurred in women of childbearing age during or shortly after pregnancy.

Local Treatment

Patients' treatment characteristics and outcomes are described in Table 2. Three hundred seventy patients (86.9%) had an initial surgical resection. Histologic evaluation of surgical margins was available in 258 patients (70%). One hundred eleven patients (30%) had R0 resection, 110 (29.7%) had R1 resection, and 37 (8.6%) had R2 resection. Radiotherapy generally included photons or electrons with a median dose of 50 Gy. Forty-three patients received radiotherapy. Surgery was followed by radiotherapy in 37 patients. Among these patients, one had R0 resection, 24 had R1 resection, five had R2 resection, and seven had unknown margins. Six patients received radiotherapy as the only treatment for their disease.

Medical Treatment

Only 23 patients (5.4%) received medical treatment exclusively as first-line treatment. Ten patients received chemotherapy: six patients were treated with chemotherapy only, three patients were treated with chemotherapy and tamoxifen or toremifene, and one patient was treated with chemotherapy and a nonsteroidal anti-inflammatory drug. Twelve patients were treated with tamoxifen or toremifene and/or a nonsteroidal anti-inflammatory drug. One patient was treated with imatinib. Medical treatment was given as adjuvant treatment in 29 patients (6.8%) and as neoadjuvant treatment in six patients (1.5%). Twenty patients who received chemotherapy were treated with an anthracycline or with a methotrexate-vinblastine-containing regimen. Thirty-three patients were treated with tamoxifen or toremifene, 22 with a nonsteroidal anti-inflammatory drug, and one with imatinib. Association of different medical treatments was possible.

Wait-and-See Policy

A nonaggressive approach was adopted in a subgroup of patients in an attempt to avoid surgery. Twenty-seven patients (6.3%) were thus placed under initial attentive medical surveillance. A wait-and-see policy

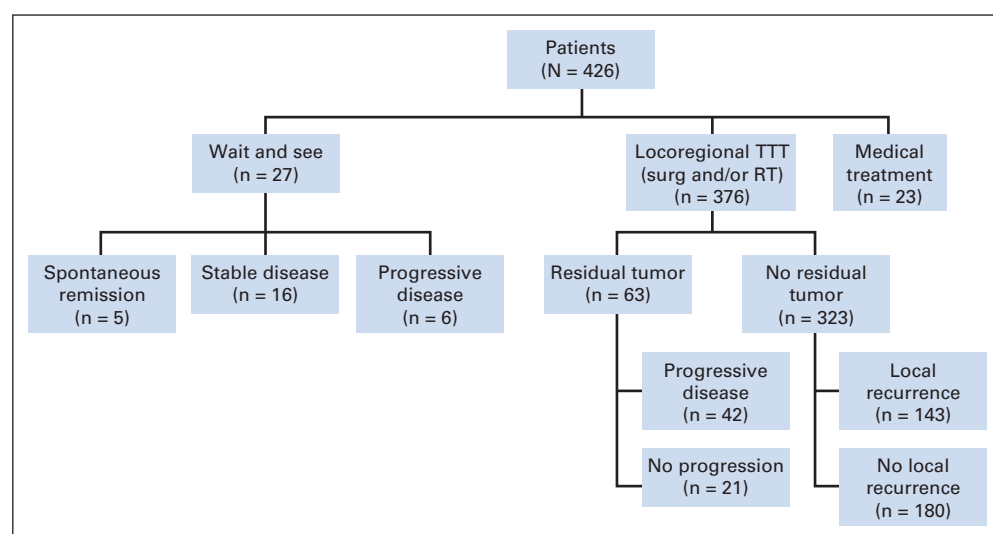


Fig 1. Diagram of patient outcomes. RT, radiotherapy; surg, surgery; TTT, treatment.

was chosen mostly according to the site of progression, which could not be life-threatening or at risk for mutilation (adjacent nerves or vessels).

Outcome in Patients With the Wait-and-See Policy

Patients' outcomes are shown in Figure 1. Median follow-up was 52 months (95% CI, 43.6 to 61.6 months). Among 27 patients with the wait-and-see policy, six presented with progression during follow-up. Median delay to progression was 19.7 months (range, 7.8 to 46.2 months). Sixteen patients had stable disease. Spontaneous tumor regressions occurred in five patients. None of these patients presented with progression at the end of the follow-up.

Response

Absence of residual tumor after local treatment (surgery and/or radiotherapy) was observed in 323 patients (75.8%). Among patients

treated with chemotherapy, partial responses were reported in six patients, stable disease in three patients, and progression in one patient. At the time of data analysis, local recurrences had been observed in 143 (44.3%) of 323 patients with no residual tumor after first-line treatment.

Survival Analysis

Overall survival is shown in Appendix Figure A4 (online only) and PFS is shown in Appendix Figure A5 (online only). PFS rates at 5 and 10 years were 35% and 22.8%, respectively. Two hundred forty-eight patients were alive without disease at the end of the follow-up. The mean number of recurrences was two (range, one to 20). No patient died of the disease. Fifteen patients died of other causes. Median PFS was 41 months (range, 29 to 53 months).

Table 3. Univariate Analysis for Prognostic Factors in Progression-Free Survival

Factor	No. of Patients	Progression-Free Survival Rate			Log-Rank <i>P</i>
		2-Year	5-Year	10-Year	
Age, years					
≤ 37	199	57.4	36.3	28.7	.005
> 37	205	70.9	49.5	42.1	
Sex					
Male	130	63.1	41.3	23	.35
Female	276	64.4	43.3	39.9	
Context of abdominal wall desmoids in women of child-bearing age during or shortly after pregnancy					
No	374	63.1	41.2	32.9	.06
Yes	32	75	62.3	62.3	
Previous history of surgery in area of primary tumor					
No	371	63.3	41.4	34	.264
Yes	35	70.5	54.5	48.5	
Previous history of trauma in area of primary tumor					
No	389	64.3	42.9	35	.456
Yes	17	55.1	44.1	—	
Tumor localization					
Abdominal wall	91	78.2	61.7	57.2	< .001
Abdominal cavity	43	70	50.2	50.2	
Extra-abdominal	267	59.2	36.5	26.9	
Extra-abdominal localization					
Trunk	93	65.5	53.9	42.6	< .001
Upper and lower limbs	105	50.3	23.9	21.7	
Head and neck	28	71.9	60.4	—	
Buttocks	20	62.3	16.6	—	
Limb localization					
Proximal	52	68.8	54.5	49.5	.006
Distal	59	54.4	22.8	18.3	
Delay between first symptoms and diagnosis, months					
≤ 4.74	114	69.3	54.9	47.8	.942
> 4.74	114	71.9	52.7	46.2	
Tumor size, cm					
≤ 7	181	75.1	57.4	47	.004
> 7	136	58.3	40.6	32.8	
Surgical margins (R0 v R1 v R2)					
R0	110	76.5	62.5	47.5	< .001
R1	107	73.7	60.5	48.1	
R2	35	43.4	22	16.5	
Surgical margins (R0 v R1)					
R0	110	76.5	62.5	47.5	.867
R1	107	73.7	60.5	48.1	

Prognostic Factors for PFS

In univariate analysis (Table 3), poor prognostic factors were age younger than 37 years (median of the whole cohort; $P = .005$; Appendix Fig A6, online only), size more than 7 cm (median of the whole cohort; $P = .004$; Appendix Fig A7, online only), extra-abdominal localization ($P < .001$; Appendix Fig A8, online only), and macroscopic residual disease after surgery (R0/R1 v R2; $P < .001$; Appendix Fig A9, online only). Among extra-abdominal tumors, the worst outcome was observed in limb and buttocks tumors. Among limb tumors, distal tumors were those with the worst prognosis. PFS curves were not significantly different for the microscopic assessment of surgical margin (R0 v R1). In multivariate analysis, age (HR, 1.97; 95% CI, 1.36 to 2.84; $P = .010$), tumor size (HR, 1.64; 95% CI, 1.13 to 2.36; $P = .008$), and tumor site (extra-abdominal tumor; HR, 2.55; 95% CI, 1.48 to 4.4; $P < .001$) remained significant prognostic variables (Table 4). Three prognostic groups for PFS were defined on the basis of the number of unfavorable prognostic factors. Since only 26 patients had zero poor prognostic factors, we grouped patients with zero or one poor prognostic factors together to constitute three prognostic groups: good prognosis, fair prognosis, and poor prognosis.

Figure 2 shows the PFS curves in patients with zero or one, two, and three unfavorable prognostic factors, respectively. Patients with zero or one prognostic factor were mainly treated with surgery alone (data not shown).

DISCUSSION

We present here the results of the largest series of sporadic desmoid tumors ever published to determine the prognostic factors of these rare tumors. One of the main problems in managing desmoids tumor is their locoregional aggressiveness and their high ability to recur after initial treatment. In this study, no patients died of their disease probably because we excluded desmoid tumors in the context of Gardner's syndrome. Seventy-five percent of patients were in complete remission after initial management but nearly 50% did relapse. This explains the choice of PFS and not overall survival in this study to search for prognostic factors. Surgical resection is often responsible for severe functional and esthetic consequences. Moreover, the observation of spontaneous regression in some rare cases of desmoid tumor led us to conduct this study to search for factors of progression and thus identify subgroups of patients eligible for individualized management, including a wait-and-see policy, early surgery, and neoadjuvant or adjuvant treatments.²⁰⁻²² In this cohort of patients under the wait-and-see policy, nearly 20% spontaneously regressed and 60% had

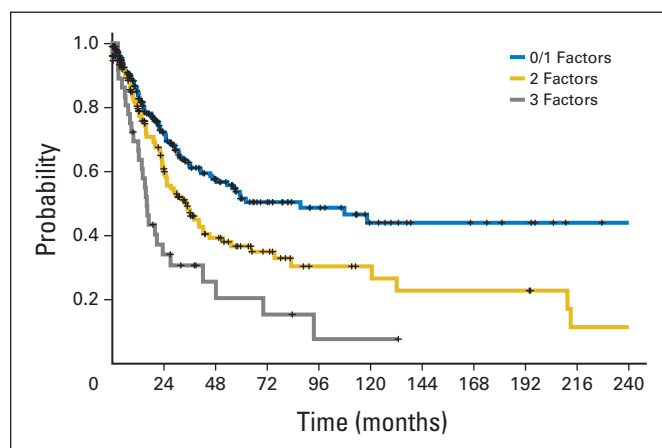


Fig 2. Probability of survival of patients with zero, one, two, or three factors.

stable disease, and only 20% had tumor progression. However, this retrospective study cannot provide conclusions regarding the outcome of these patients since the sample was small and the patients were selected.

In contrast with other studies, prognosis was not significantly different for microscopic assessment of surgical margins (R0 v R1).^{9,13,23-26} In other studies, however, the presence of microscopic disease did not necessarily affect long-term disease-free survival.^{5,14} These results are probably due to the fact that desmoid tumors are extremely infiltrative locally, making it difficult to assess microscopic resection margins. Thus, function-sparing surgery should be preferred to aggressive surgery seeking negative margins.¹⁴

Our results show that age (older than 37 years) is statistically associated with longer PFS. Age as a prognostic factor for local recurrence of desmoids has already been studied in several publications. In one series, age (older than 30 years) was a negative prognostic factor,²⁷ in two series it was a positive factor (age younger than 18 years in the study by Spear et al²⁸; age younger than 32 years in the study by Sorensen et al²⁵), and in most of the other series, it had no prognostic value.^{5,9,13,24,29} Recently, the identification of biologic pathways involved in the tumorigenesis of desmoids emphasized these age differences, genomic alterations being more common in older patients. This could explain the prognostic role of age.³

Tumor location as a prognostic factor has already been demonstrated, with tumors of the extremities having the worst prognosis.^{9,13,25,27,30} In our study, among extra-abdominal tumors, the worst outcomes were observed in limb tumors, especially in distal locations. A subset of patients with extra-abdominal fibromatosis could be managed with a different policy: head and neck and trunk tumors have a better prognosis. Thus, location is an important factor in the assessment of patients at diagnosis and for stratifying patients taking part in randomized trials. It is unclear, however, whether these differences are related to biologic or to surgical management differences.

These findings therefore point to three prognostic factors of PFS (age, tumor size, and tumor site) based on the results of the largest series ever published. The natural history of these tumors is unique. Although considered nonmalignant because of their inability to metastasize, their locoregional aggressiveness and recurrence rate after resection are particularly high. With nearly 50% of recurrences and the likelihood of accelerating the evolution of the disease, the value of surgery (ie, the mainstay in initial management) is under debate.

Table 4. Multivariate Progression-Free Survival Analysis

Variable	Crude HR	95% CI	P
Median age	1.97	1.36 to 2.84	< .001
Median size	1.64	1.13 to 2.36	.008
Tumor site			
Abdominal wall			
Intra-abdominal tumor	1.95	0.92 to 4.15	.084*
Extra-abdominal tumor	2.55	1.48 to 4.4	< .001

Abbreviation: HR, hazard ratio.

*Not significant.

Several physicians now adopt a wait-and-see policy as initial strategy for some selected patients.

This study clearly demonstrates that there are different prognostic subgroups of desmoid tumors that could benefit from different therapeutic strategies. The main question raised by our findings is how patients should be managed. Should we consider that patients with good prognostic factors (older than 37 years, tumor size < 7 cm, and tumor located in the abdominal wall or intra-abdominally) have less risk of recurrence after surgery and should they thus undergo surgery straightaway in a curative intent? Or that such patients must have indolent tumors that could benefit from a wait-and-see policy? It would be interesting to take subjective morbidity into account as well as the morbidity associated with treatment, which could have an impact on therapeutic management.

This study could be the starting point for prospective studies, the only way to answer these questions and optimize the management (surgery versus wait-and-see policy) of desmoid tumors. While awaiting such results, it seems logical to carefully watch the evolution of a desmoid tumor after its diagnosis and propose local treatment only in the case of progressive and/or symptomatic disease.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Sébastien Salas, Jean-Michel Coindre

Administrative support: Jean-Michel Coindre

Provision of study materials or patients: Binh Bui, Jean-Yves Blay, Sylvie Bonvalot, Axel Le Cesne, Odile Oberlin, Eberhard Stoeckle

Collection and assembly of data: Sébastien Salas, Armelle Dufresne, Philippe Terrier, Dominique Ranchere-Vince, Louis Guillou, Odile Oberlin, Jean-Michel Coindre

Data analysis and interpretation: Sébastien Salas, Armelle Dufresne, Binh Bui, Jean-Yves Blay, Sylvie Bonvalot, Eberhard Stoeckle, Louis Guillou, Odile Oberlin, Véronique Brouste, Jean-Michel Coindre

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

REFERENCES

- Shields CJ, Winter DC, Kirwan WO, et al: Desmoid tumours. *Eur J Surg Oncol* 27:701-706, 2001
- Li M, Cordon-Cardo C, Gerald WL, et al: Desmoid fibromatosis is a clonal process. *Hum Pathol* 27:939-943, 1996
- Salas S, Chibon F, Noguchi T, et al: Molecular characterization by array comparative genomic hybridization and DNA sequencing of 194 desmoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 49:560-568, 2010
- Phillips SR, A'Hern R, Thomas JM: Aggressive fibromatosis of the abdominal wall, limbs and limb girdles. *Br J Surg* 91:1624-1629, 2004
- Merchant NB, Lewis JJ, Woodruff JM, et al: Extremity and trunk desmoid tumors: A multifactorial analysis of outcome. *Cancer* 86:2045-2052, 1999
- Weiss RJ, Treiber M, Zalten-Hinguranage A, et al: Improving local control in patients with aggressive fibromatosis by combined surgery and radiotherapy [in German]. *Chirurg* 73:615-621, 2002
- Hizawa K, Iida M, Mibu R, et al: Desmoid tumors in familial adenomatous polyposis/Gardner's syndrome. *J Clin Gastroenterol* 25:334-337, 1997
- Reitamo JJ, Scheinin TM, Häyry P: The desmoid syndrome. New aspects in the cause, pathogenesis and treatment of the desmoid tumor. *Am J Surg* 151:230-237, 1986
- Ballo MT, Zagars GK, Pollack A, et al: Desmoid tumor: Prognostic factors and outcome after surgery, radiation therapy, or combined surgery and radiation therapy. *J Clin Oncol* 17:158-167, 1999
- Penel N, Le Cesne A, Bui BN, et al: Imatinib for progressive and recurrent aggressive fibromatosis (desmoid tumors): An FNCLCC/French Sarcoma Group phase II trial with a long-term follow-up. *Ann Oncol* 22:452-457, 2011
- Nuytens JJ, Rust PF, Thomas CR Jr, et al: Surgery versus radiation therapy for patients with aggressive fibromatosis or desmoid tumors: A comparative review of 22 articles. *Cancer* 88:1517-1523, 2000
- Fiore M, Rimareix F, Mariani L, et al: Desmoid-type fibromatosis: A front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Ann Surg Oncol* 16:2587-2593, 2009
- Bonvalot S, Eldweny H, Haddad V, et al: Extra-abdominal primary fibromatosis: Aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. *Eur J Surg Oncol* 34:462-468, 2008
- Gronchi A, Casali PG, Mariani L, et al: Quality of surgery and outcome in extra-abdominal aggressive fibromatosis: A series of patients surgically treated at a single institution. *J Clin Oncol* 21:1390-1397, 2003
- Smith AJ, Lewis JJ, Merchant NB, et al: Surgical management of intra-abdominal desmoid tumors. *Br J Surg* 87:608-613, 2000
- Conticane: Conticabase: European sarcoma database and tumour bank. www.conticabase.org
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (eds): World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon, France, IARC Press, 2002
- Tumor of bone and soft tissues, in Sobin LH, Wittekind C (eds): TNM Classification of Malignant Tumors (UICC) (ed 6). New York, NY, Wiley Liss, 2002
- Shuster JJ: Median follow-up in clinical trials. *J Clin Oncol* 9:191-192, 1991
- Dalén BP, Geijer M, Kvist H, et al: Clinical and imaging observations of desmoid tumors left without treatment. *Acta Orthop* 77:932-937, 2006
- Barbier O, Anract P, Pluot E, et al: Primary or recurring extra-abdominal desmoid fibromatosis: Assessment of treatment by observation only. *Orthop Traumatol Surg Res* 96:884-889, 2010
- Nakayama T, Tsuboyama T, Toguchida J, et al: Natural course of desmoid-type fibromatosis. *J Orthop Sci* 13:51-55, 2008
- Huang PW, Tzen CY: Prognostic factors in desmoid-type fibromatosis: A clinicopathological and immunohistochemical analysis of 46 cases. *Pathology* 42:147-150, 2010
- Huang K, Fu H, Shi YQ, et al: Prognostic factors for extra-abdominal and abdominal wall desmoids: A 20-year experience at a single institution. *J Surg Oncol* 100:563-569, 2009
- Sørensen A, Keller J, Nielsen OS, et al: Treatment of aggressive fibromatosis: A retrospective study of 72 patients followed for 1-27 years. *Acta Orthop Scand* 73:213-219, 2002
- Faulkner LB, Hajdu SI, Kher U, et al: Pediatric desmoid tumor: Retrospective analysis of 63 cases. *J Clin Oncol* 13:2813-2818, 1995
- Rock MG, Pritchard DJ, Reiman HM, et al: Extra-abdominal desmoid tumors. *J Bone Joint Surg Am* 66:1369-1374, 1984
- Spear MA, Jennings LC, Mankin HJ, et al: Individualizing management of aggressive fibromatosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40:637-645, 1998
- Ozger H, Eralp L, Tokur B, et al: Evaluation of prognostic factors affecting recurrences and disease-free survival in extra-abdominal desmoid tumors [in Turkish]. *Acta Orthop Traumatol Turc* 41:291-294, 2007
- Stoeckle E, Coindre JM, Longy M, et al: A critical analysis of treatment strategies in desmoid tumours: A review of a series of 106 cases. *Eur J Surg Oncol* 35:129-134, 2009

A Prognostic Nomogram for Prediction of Recurrence in Desmoid Fibromatosis

Aimée M. Crago, MD, PhD,* Brian Denton, MS,† Sébastien Salas, MD, PhD,‡ Armelle Dufresne, MD,§ James J. Mezhir, MD,* Meera Hameed, MD,¶ Mithat Gonen, PhD,† Samuel Singer, MD, FACS,* and Murray F. Brennan, MD, FACS*

Objective: To construct a postoperative nomogram to estimate the risk of local recurrence for patients with desmoid tumors.

Background: The standard management of desmoid tumors is resection, but many recur locally. Other options include observation or novel chemotherapeutics, but little guidance exists on selecting treatment.

Methods: Patients undergoing resection during 1982–2011 for primary or locally recurrent desmoids were identified from a single-institution prospective database. Cox regression analysis was used to assess risk factors and to create a recurrence nomogram, which was validated using an international, multi-institutional data set.

Results: Desmoids were treated surgically in 495 patients (median follow-up of 60 months). Of 439 patients undergoing complete gross resection, 100 (23%) had recurrence. Five-year local recurrence–free survival was 69%. Eight patients died of disease, all after R2 resection. Adjuvant radiation was not associated with improved local recurrence–free survival. In multivariate analysis, factors associated with recurrence were extremity location, young age, and large tumor size, but not margin. Abdominal wall tumors had the best outcome (5-year local recurrence–free survival rate of 91%). Age, site, and size were used to construct a nomogram with concordance index of 0.703 in internal validation and 0.659 in external validation. Integration of additional variables (R1 margin, sex, depth, and primary vs recurrent presentation) did not importantly improve concordance (internal concordance index of 0.707).

Conclusions: A postoperative nomogram including only size, site, and age predicts local recurrence and can aid in counseling patients. Systemic therapies may be appropriate for young patients with large, extremity desmoids, but surgery alone is curative for most abdominal wall lesions.

Keywords: aggressive fibromatosis, desmoid, nomogram

(*Ann Surg* 2013;258: 347–353)

Desmoid tumors are clonal proliferations that may arise from mesenchymal stem cells.^{1,2} Desmoids are associated with β -catenin mutations in more than 75% of cases; a smaller proportion are associated with *APC* mutations and familial adenomatous

polyposis (FAP).^{3–7} The lesions do not have the ability to metastasize, but progressive disease and local recurrence can lead to significant morbidity.⁸ Intra-abdominal tumors may cause intestinal obstruction or fistulization and extremity tumors may result in neuropathic pain and limited mobility. For these reasons, aggressive treatment strategies were historically employed to completely extirpate disease. Patients were often managed with radical surgery and adjuvant or definitive radiation therapy. For many tumors, however, the anatomic location can make resection impossible or extremely morbid, and postoperative recurrence rates have been reported as more than 70% in some series.^{8–15}

The clinical course of desmoid fibromatosis varies widely; in some instances, the lesions remain stable for long periods with no intervention, whereas in others the tumors grow rapidly.^{8,16,17} The difficulty of surgical eradication of desmoids, together with their variable clinical course, has led to exploration of alternative treatment strategies. In instances in which operation carries substantial risk, systemic therapies have been prescribed.¹⁸ Up to 70% of patients treated with novel systemic therapies may have improvement of desmoid-related symptoms.¹⁹ In several series, patients with asymptomatic desmoid were observed for 3 to 6 months after presentation.¹⁶ In these series, up to 65% of patients did not progress, suggesting that some patients with desmoid do not require any intervention.

Although observation, systemic therapy, and surgery are currently options for management of desmoid tumors, an optimal management strategy and how best to select patients for therapy have yet to be defined. We sought to identify patients ideally suited for surgical intervention versus those who might be candidates for neoadjuvant/definitive systemic therapies or nonoperative management. To do so, we examined characteristics of a large cohort of patients with surgically resected desmoids. We identified characteristics that predict local recurrence, and we constructed a clinical nomogram that predicts postoperative tumor recurrence.

METHODS

Patient Cohort

Approval for evaluation of patients with desmoid managed at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) was obtained from the institutional review board. Patients who underwent surgical resection between July 1, 1982 and November 1, 2011 were identified from the institutional soft tissue sarcoma database, in which clinicopathologic characteristics and survival outcomes were prospectively recorded. Diagnosis and margin status were determined by a sarcoma pathologist at the time of surgical resection.

Clinicopathologic characteristics were defined as follows. Lesions at the axilla, shoulder joint, buttock, and groin were classified as extremity. Lesions at the neck, because of their small number in our cohort (n = 29), were considered collectively with extremity lesions. Chest wall and abdominal wall lesions were differentiated on the basis of their position relative to the tenth rib. Visceral, intra-abdominal, and retroperitoneal lesions were considered collectively; each of these lesions was considered deep to the fascia. Tumor depth

From the Departments of *Surgery; †Biostatistics and Epidemiology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY; ‡Aix-Marseille Université, INSERM U911 and Timone Hospital, Department of Medicine, Division of Adult Oncology, Marseille, France; §Léon Bérard Center, INSERM U590, 69373, Lyon, France; and ¶Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY.

Disclosure: Funding support was received from Cycle for Survival, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, the Kristen Ann Carr Fund, the National Institutes of Health through Soft Tissue Sarcoma Program Project grant P01 CA047179, and the National Cancer Institute of the National Institutes of Health through a SPORE in soft tissue sarcoma. The authors declare no conflicts of interest.

Reprints: Aimée M. Crago, MD, PhD, Gastric and Mixed Tumor Service, Department of Surgery, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, H1220, New York, NY 10065. E-mail: cragoa@mskcc.org.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0003-4932/13/25802-0347

DOI: 10.1097/SLA.0b013e31828c8a30

in the extremity or trunk was defined as superficial or deep according to the relationship to the investing fascia. Margin was classified as gross positive (R2), microscopic positive (R1), or negative (R0).

An external validation set included 274 patients who underwent complete surgical resection between February 1, 1965 to March 6, 2008 in 24 cancer centers from the French Sarcoma Group; clinicopathologic correlates were entered into the European database (www.conticabase.org).²⁰

Statistical Methods

Characteristics of primary versus recurrent tumors and tumors with complete versus incomplete gross resection were compared using χ^2 analysis. Local recurrence-free survival (LRFS) was defined from the time of first surgery at MSKCC. Patients who underwent R2 resection were not included in the analysis of LRFS. Deaths in patients without documented recurrence were considered events; patients who were alive at most recent follow-up were censored. LRFS probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method and stratified according to various clinicopathologic variables. Age and tumor size (at primary presentation) were considered on a continuous scale for nomogram construction and were considered by category (age: 16–25, 26–45, 46–65, and >65 years; size: ≤ 5 , 5–10, and >10 cm) in the univariate and multivariate analyses; the categories were chosen before modeling.

Cox proportional hazards regression was used to perform univariate and multivariate analyses; all variables (excluding treatment-related variables) were included in the multivariate analysis. No correlation was found between significant variables when evaluated by Spearman rank correlation. Two nomograms were constructed, one

including only those variables significant to 0.05 on multivariate analysis and the second including all variables. The Cox model of nomogram construction has been described.²¹ Validation, in this case, was performed internally by creating 100 bootstrap resamples and externally on the European database set. Nomogram calibration was checked using the calibration plot.

RESULTS

Characteristics of Surgically Resected Patients

The study cohort consisted of 495 individual patients who underwent surgical resection of a desmoid tumor at MSKCC (Table 1). The cohort was predominantly female (67%, $n = 329$). Overall, 382 patients (77%) had primary disease, whereas 113 (23%) had recurrent disease. Patients with primary and recurrent disease were similar in terms of sex and depth. Patients with recurrent disease tended to be younger (79% vs 66% younger than 45 years, $P = 0.074$; median age, 34 vs 38 years). They more commonly presented with extremity or chest wall lesions (83% vs 54%, $P < 0.001$). Patients presenting with primary disease were more likely to undergo complete microscopic resection (57% vs 45% in recurrent disease, $P = 0.05$). They were less likely to undergo treatment with radiation (12% vs 32%, $P < 0.001$) or chemotherapy (9% vs 19%, $P = 0.002$) than were patients presenting with recurrent disease.

FAP had been documented in 15 patients, 6 of them male and 9 female. Their age at resection ranged from 16 to 43 years. Ten had intra-abdominal lesions, 4 had chest wall desmoids, and one had a paraspinal lesion.

TABLE 1. Characteristics of Patients

Characteristic	Primary (n = 382)	Recurrent (n = 113)	P
Sex			0.734
Male	130 (34%)	36 (32%)	
Female	252 (66%)	77 (68%)	
Age, yrs			0.074
15–25	67 (18%)	28 (25%)	
26–45	184 (48%)	60 (53%)	
46–65	92 (24%)	18 (16%)	
>65	39 (10%)	7 (6.2%)	
Location of primary tumor			<0.001
Abdominal wall	77 (20%)	11 (9.7%)	
Chest wall	50 (13%)	26 (23%)	
GI/intra-abdominal	94 (25%)	6 (5.3%)	
Extremity	138 (36%)	68 (60%)	
Other	23 (6.0%)	2 (2%)	
Depth			0.914
Superficial	28 (7.3%)	7 (6.2%)	
Deep	351 (92%)	105 (93%)	
Unknown	3 (0.79%)	1 (0.88%)	
Margin status			0.05
R0	216 (57%)	51 (45%)	
R1	130 (34%)	43 (38%)	
R2	35 (9.2%)	18 (16%)	
Unknown	1 (0.26%)	1 (0.88%)	
Size of primary tumor			<0.001
≤ 5 cm	112 (29%)	36 (32%)	
>5 cm, ≤ 10 cm	155 (41%)	45 (40%)	
>10 cm	113 (30%)	12 (11%)	
Unknown	2 (0.52%)	20 (18%)	
Any chemotherapy	34 (8.9%)	22 (19%)	0.002
Adjuvant RT	46 (12%)	36 (32%)	<0.001

RT indicates radiation therapy.

Determinants of Complete Gross Resection

Complete gross resection was confirmed in 440 patients (89%), whereas 53 patients (11%) underwent R2 resection with gross residual disease in place after surgery. The R2-resected tumors were more commonly large (38% vs 24% were >10 cm; $P = 0.001$) and located in the abdomen (47% vs 17%, $P < 0.001$). Twenty-five percent of R2 resections were in extremity tumors. Of 15 patients with documented FAP, 8 underwent incomplete gross resection.

Predictors of Local Recurrence

Median follow-up of the cohort was 60 months (range, 0–327 months). Overall, 44 patients were dead at last follow-up, but only 8 died of disease. All of these patients had undergone R2 resection; 6 of them had intra-abdominal tumors and 3 were patients with FAP. Two patients died after intestinal transplant.

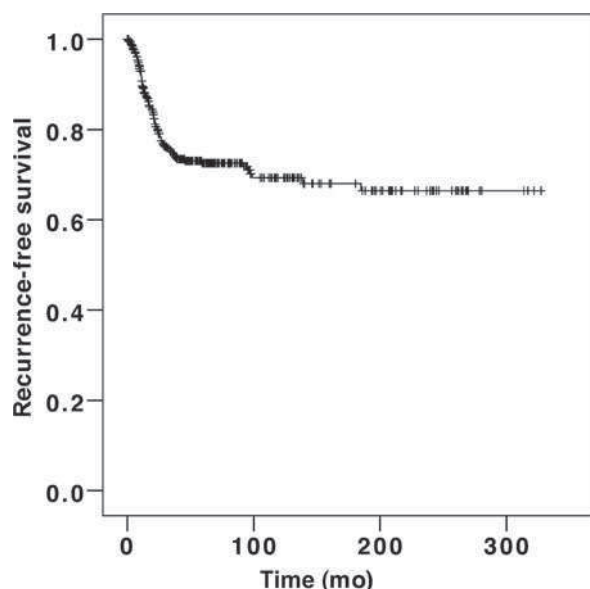


FIGURE 1. Recurrence-free survival in 439 patients undergoing complete gross resection of a desmoid tumor analyzed by the Kaplan-Meier method.

Of 439 patients undergoing complete gross resection, 100 had recurrence. Among these, 92 (92%) had their recurrence within 5 years. Five-year LRFS was 69% (Fig. 1).

The clinicopathologic characteristics were examined for association with LRFS after complete gross resection (Table 2). Patient sex, tumor depth, and presentation status (primary vs recurrent) were not associated with LRFS. However, patients younger than 26 years at the time of diagnosis had a significantly higher rate of local recurrence (hazard ratio: 4.27, $P = 0.006$; Fig. 2A). Five-year LRFS among these patients was 52% compared with 81% among patients older than 65 years.

Size of the patient's primary tumor was associated with outcome. Tumors larger than 10 cm in largest diameter were associated with 5-year LRFS rates of 57% compared with 72% for tumors of 5 cm or smaller and 74% for tumors larger than 5 cm and 10 cm or smaller (Fig. 2B). There was a striking association between site and LRFS. Intra-abdominal, chest wall, and extremity tumors had relatively poor outcomes (5-year LRFS rates of 76%, 72%, and 60%, respectively). Desmoids in the neck, which were considered collectively with extremity lesions in the main analyses, behaved nearly identically to extremity tumors (5-year LRFS rates of 43% for neck vs 47% for lower extremity). Abdominal wall tumors had the best outcome [5-year LRFS rates of 90% (Fig. 2C) vs 34% in patients aged 25 years or younger with large, extremity tumors ($n = 11$)]. Only 8 of 79 patients with abdominal wall tumors had recurrence. All were 40 years of age or younger, and 3 of the 8 patients had tumors larger than 10 cm. Only 1 abdominal wall tumor that recurred, a rectus sheath lesion, was smaller than 5 cm.

A multivariate analysis demonstrated that age, tumor size, and tumor site are independent predictors of recurrence (Table 2). Margin status (R1 vs R0) was not associated with altered outcome in the cohort as a whole or in subgroups defined by age or tumor site. However, among patients with small tumors (<5 cm), R0 resection was associated with longer LRFS compared with R1 resection (76% vs 60%, $P = 0.007$). Margin was not associated with recurrence in larger lesions.

Adjuvant Radiation Therapy

The role of radiation therapy in desmoid fibromatosis has been debated. In our series, there was no improvement in outcomes in patients who had received radiation therapy during the course of their treatment (5-year LRFS rates of 68% vs 72% without radiation; Fig. 3A). In addition, adjuvant radiation therapy was not significantly associated with improved LRFS in any subset of tumors (stratified

TABLE 2. Analysis of Factors Predicting Local Recurrence After Desmoid Resection

Factor	Univariate		Multivariate	
	Hazard Ratio (95% CI)	<i>P</i>	Hazard Ratio (95% CI)	<i>P</i>
Margin status (R1 vs R0)	1.18 (0.78–1.80)	0.42	0.99 (0.65–1.52)	0.97
Presentation status (recurrent vs primary)	1.32 (0.82–2.14)	0.28	1.16 (0.70–1.90)	0.57
Depth (deep vs superficial)	1.56 (0.63–3.84)	0.34	1.37 (0.54–3.45)	0.51
Sex (female vs male)	1.17 (0.75–1.84)	0.49	1.32 (0.82–2.10)	0.25
Location (vs abdominal wall)				
Extremity	5.21 (2.25–12.1)	<0.001	5.02 (2.14–8.42)	<0.001
Chest wall	3.31 (1.27–8.62)	0.014	3.12 (1.20–8.42)	0.02
Intra-abdominal	2.79 (1.03–7.55)	0.043	2.73 (0.98–7.59)	0.054
Other	1.52 (0.31–7.56)	0.61	1.54 (0.31–7.63)	0.6
Size (>10 cm vs ≤10 cm)	1.87 (1.22–2.86)	0.005	1.94 (1.23–3.05)	0.004
Age (vs >65 yrs)				
≤25 yrs	4.27 (1.51–12.2)	0.006	3.55 (1.23–10.3)	0.013
26–65 yrs	1.99 (0.72–5.48)	0.19	2.02 (0.72–5.70)	0.21

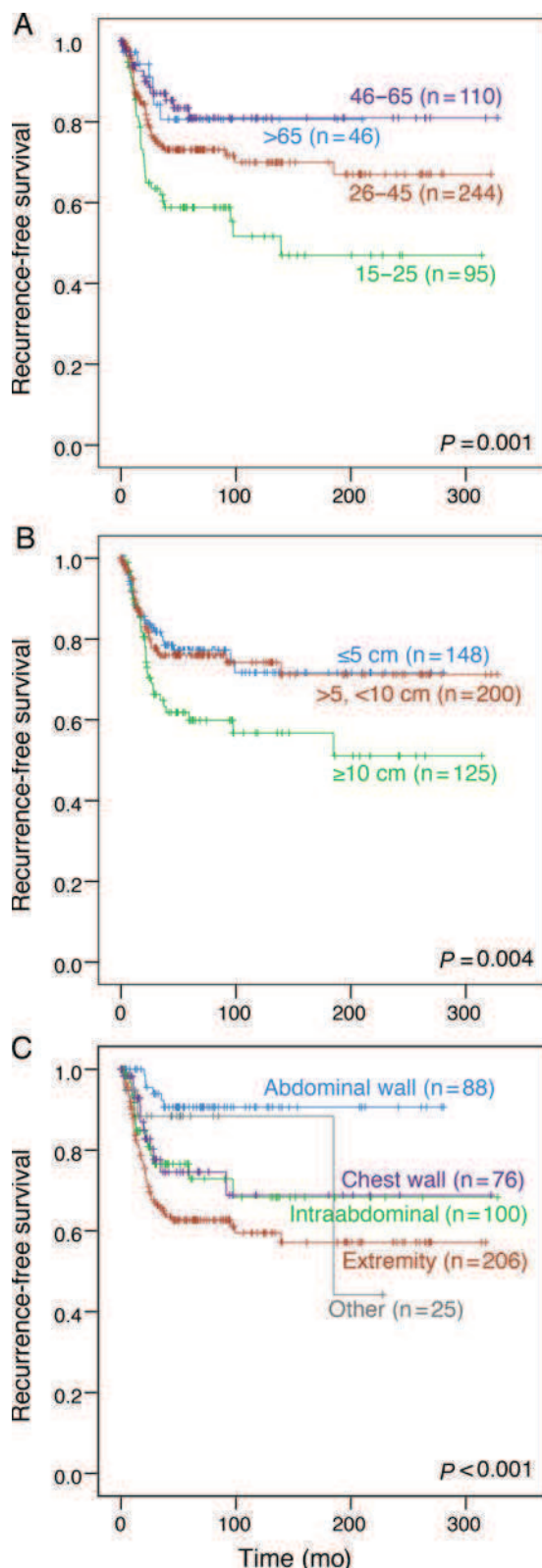


FIGURE 2. Recurrence-free survival in 439 patients undergoing complete gross resection of a desmoid tumor stratified by (A) patient age, (B) tumor size, and (C) tumor location.

by size, site, and patient age at diagnosis) except extremity tumors. Adjuvant radiation was most commonly used for extremity tumors (in 23% of these patients), and radiation for extremity tumors was associated with a 15% absolute reduction in local recurrence; LRFS among patients with extremity tumors was 71% with radiation versus 56% without ($P = 0.029$).

To eliminate the contribution of selection bias to analysis of the role radiation plays in management of desmoid tumors, we analyzed outcomes over time. Before 1997, 30% of patients received adjuvant radiation therapy, but in 1997 and later, only 7% of patients received this treatment ($P < 0.0001$). The decreased use of radiation was not accompanied by a statistically significant change in LRFS (71% vs 70%; Fig. 3B).

A Nomogram to Predict Local Recurrence After Surgical Resection

On the basis of the univariate and multivariate models, we integrated clinicopathologic risk factors into a nomogram to predict postoperative recurrence of desmoid tumors at 3, 5, and 7 years after surgery. Because prescription of radiation had no association with outcome, we retained patients receiving this therapy in our analysis. Included in the model were the significant predictors of local recurrence on univariate analysis, that is, patient age and tumor site and size. The nomogram is shown in Figure 4. The bootstrapping concordance index of this model was 0.703. Addition of margin, depth, sex, or presentation status to the model did not improve concordance significantly (0.707). Actual incidence of recurrence was plotted versus predicted recurrence, confirming good calibration of the nomogram (Fig. 5).

External validation of this nomogram was performed on a cohort of patients ($n = 274$) treated at sarcoma specialty centers in Europe. Patients within this cohort were of similar age as those treated at MSKCC (mean 38.6 vs 37.5 years). Tumors in the validation set were slightly smaller (mean 6 vs 7 cm; $P = 0.001$) and were more commonly seen in the chest wall (27% vs 16%) and less often in the extremity (36% vs 41%; $P = 0.009$). The concordance index in the validation set was 0.659 (confidence interval, 0.598–0.712). The external validation set was previously used to create a 3-point scoring system to predict progression-free survival after desmoid resection. Compared with the nomogram, the 3-point tool had substantially lower concordance index for both in the MSKCC cohort (0.532) and in the external validation cohort (0.570). Calibration of the nomogram in the validation cohort demonstrated that the tool is particularly accurate for high-risk lesions (predicted vs actual 3-year survival in the quintile with poorest prognosis being 51% vs 49%). The tool overestimated recurrence-free survival rates for the tumors with good prognosis (89% predicted vs 69% actual risk of local recurrence at 5 years in the upper quintile).

DISCUSSION

Desmoid tumors can be managed by observation, surgery, or chemotherapy, but little information exists on how to select the best treatment of the individual patient. Given promising responses to some novel chemotherapies and the high rate of local recurrence after resection, we sought to define subgroups of patients with desmoid tumors who should be considered for surgical resection and subsets in whom a multimodality approach to management can be explored. To accomplish this, we have used a large, prospectively collected database to find risk factors for local recurrence after complete gross resection and to create a clinical nomogram that predicts risk of recurrence.

In a multivariate analysis, only tumor site and size and patient age were associated with recurrence. A nomogram that uses these 3

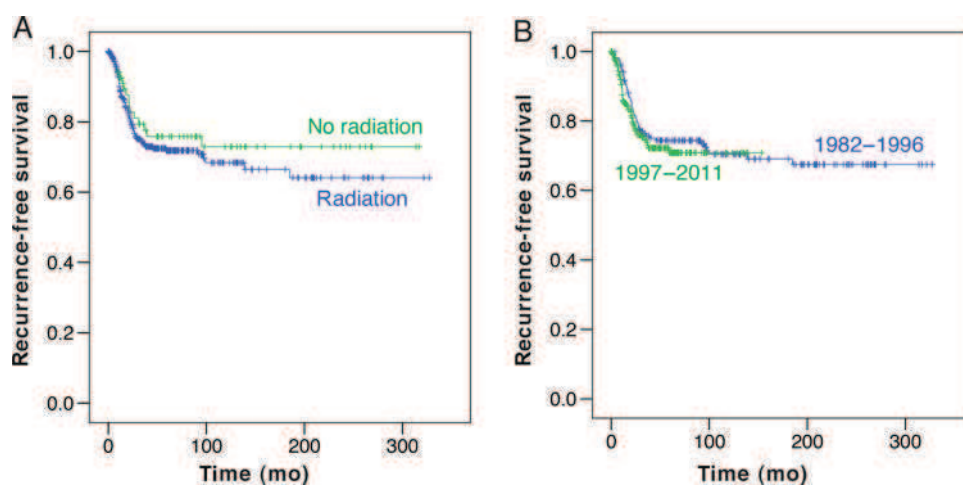


FIGURE 3. A, Recurrence-free survival in patients receiving adjuvant radiation versus those not treated with radiation. B, Recurrence-free survival in patients treated before 1997, when 30% of patients received adjuvant radiation, versus during 1997 and later, when only 7% of patients received adjuvant radiation.

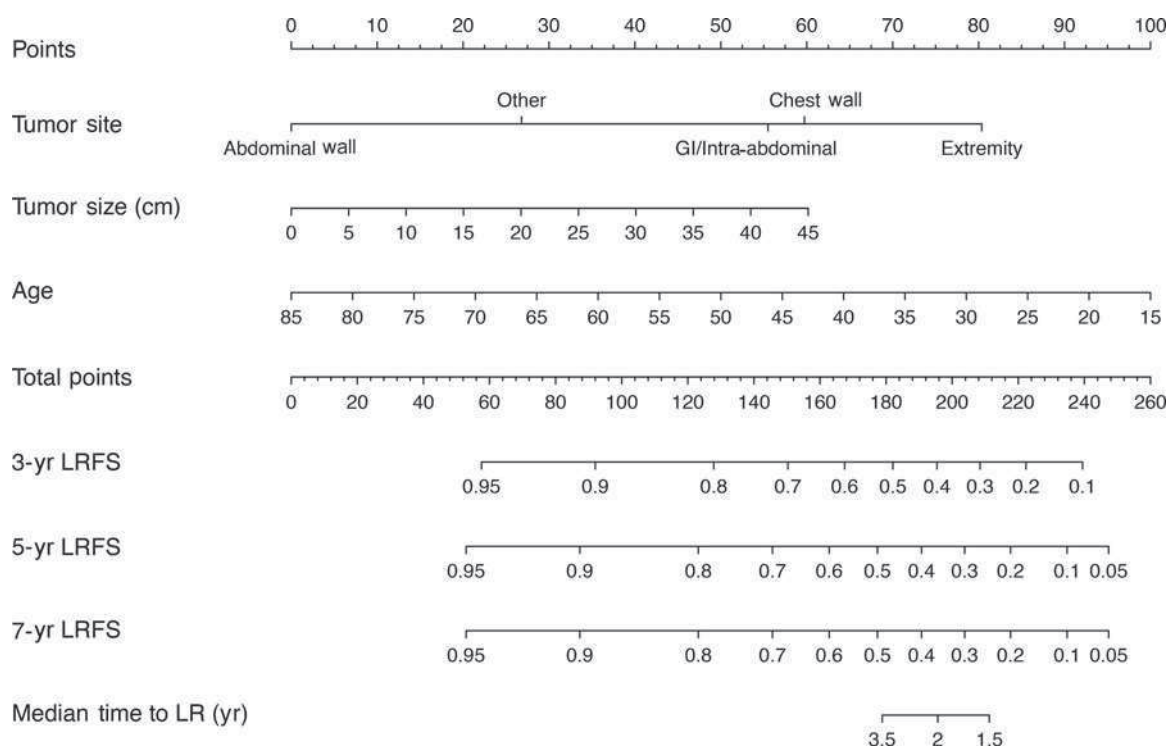


FIGURE 4. A nomogram estimating the probability of local recurrence-free survival at 3, 5, and 7 years after desmoid resection. Desmoids at the axilla, shoulder joint, buttock, groin, and neck are classified with extremity desmoids. LR indicates local recurrence.

variables predicts LRFS, exhibiting good concordance in internal and external validation (concordance indices 0.70 and 0.66, respectively). Although the concordance indices are lower than observed with our institution's nomograms for outcome after surgical resection of liposarcoma and synovial sarcomas,^{22,23} they suggest that the desmoid nomogram's predictive ability is better than those describing prognosis in pancreatic cancer (concordance index, 0.64) and melanoma (concordance, 0.69) and FIGO staging for ovarian cancer (0.62) and AJCC staging systems (eg, colon with concordance of 0.60).^{24–27}

Although the concordance index was lower in the validation data than in the test set, this is not overly concerning for 2 reasons. First, performance on a validation set is generally worse than on the test set used to develop a given tool. This phenomenon was also observed in validating the 3-point scoring system describing desmoid outcome (concordance index 0.57 in the data set on which it was developed versus 0.53 in the MSKCC data set). Second, as noted previously, the concordance for the validation set suggests that the desmoid nomogram is better than staging systems routinely applied to

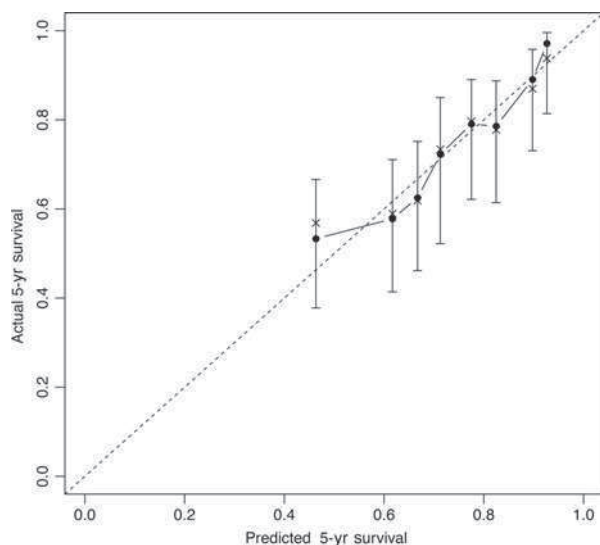


FIGURE 5. Calibration of the nomogram shown in Figure 4 in predicting 5-year recurrence-free survival after resection of a desmoid tumor. Solid line indicates performance of the nomogram; vertical bars, 95% confidence interval; O, subcohorts of the database; x, bootstrap-corrected estimate of the nomogram's performance.

more common cancers. We did note that calibration of the predicted outcome to actual outcome among the patients treated at the European centers is more accurate in high-risk tumors than in the low-risk tumors, where the nomogram may underestimate local recurrence rates. The tool persists in being an excellent means in this second population for performing its purpose, that is, identifying high-risk patients who may be candidates for nonoperative management.

All of these predictors of recurrence can be evaluated preoperatively, allowing efficient preoperative estimation of risk and counseling of patients using the nomogram. For example, abdominal wall tumors have less than 10% risk of recurrence whereas extremity lesions recur often. In this context, we currently recommend surgical intervention for abdominal wall lesions if they are symptomatic or progressing. Patients with large extremity lesions are ideal candidates for enrollment in clinical trials examining neoadjuvant or definitive systemic treatment. Although easily resectable lesions in the extremity are still approached surgically, we believe that the high risk of local recurrence justifies discussion with the patient regarding alternative therapies including definitive or neoadjuvant therapy with sorafenib or other investigational agents, particularly in patients in whom resection may result in significant morbidity. In analysis of factors associated with incomplete resection, we noted that patients with large, intra-abdominal tumors were prone to R2 resection. This is likely related to the risk of mesenteric vessel involvement, and the surgeon should carefully consider the anatomy before recommending surgery to these patients, despite the fact that their predicted risk of local recurrence is characteristically in the intermediate range (eg, 10-cm lesions in 25-year-old patients are predicted to recur in ~30% of patients).

This single-institution series of surgically resected desmoids, the largest reported to date, enables examination of the role of margin status and radiation in the clinical management of these tumors. In the cohort as a whole, we observed no association between R0 versus R1 margin of resection and recurrence. In a subgroup analysis of small tumors (<5 cm), those excised with R1 margins had an increased risk

of local recurrence compared with R0 excisions (76% vs 60%, $P = 0.007$). Regardless, most patients with small tumors undergoing R1 resection did not have recurrence, and therefore it seems reasonable to employ a period of observation in this clinical scenario rather than aggressive attempts to achieve complete microscopic resection.

Although prior studies have suggested that adjuvant radiation may be of benefit in desmoids, no randomized trials have been performed. Selection bias and recent data regarding the role of stable disease even in untreated tumors make historical reports describing the role of adjuvant radiation difficult to interpret. In small case series, local control rates of 75% and 81% for patients receiving radiation are comparable to the overall risk of recurrence observed here even in the absence of such treatment.^{28,29} A retrospective review of 189 patients at a single specialty center showed no association between adjuvant radiation and improved outcomes.³⁰ In updated data, an increased rate of local recurrence associated with R1 margins was abrogated by prescription of adjuvant radiation.³¹ In our study, margin of resection did not alter outcomes, and radiation treatment was not related to statistically significantly better overall LRFS, despite the large number of patients studied. Moreover, over the duration of our series the frequency of patients receiving adjuvant radiation dropped from 30% to 7%, but this has resulted in no increase in the local recurrence rate. In extremity lesions, the use of radiation was associated with a statistically lower rate of recurrence, with absolute risk reduction of 15%. Balancing this scant evidence of benefit against the short- and long-term complications associated with radiation (wound complications, fibrosis, edema, bone fracture, radiation-associated sarcoma) in what is a young patient population, we have now removed radiation from our treatment algorithm for patients with resectable desmoids.

Our results are concordant with the proposal that among patients with desmoid tumors, there exists a spectrum of disease biology. Patients undergoing resection for an abdominal wall desmoid have a long-term disease-free survival rate of more than 90%, whereas in young patients with large extremity lesions the rate is less than 40%. Given the very different rates of local recurrence of abdominal wall lesions compared with extremity and chest wall tumors, these tumors may have a different biology or a different host-tumor-site interaction. Similarly, the worse outcomes for younger patients, which has been reported previously,²⁰ suggests differences in tumor biology. In addition to providing insight into patient risk, these data provide a framework in which we can examine the molecular biology of desmoid fibromatosis. Recent data suggest that genomic factors, such as the exact mutation in β -catenin (*CTNNB1*) associated with a given desmoid, help stratify patient risk.⁶ The nomogram could potentially be used as a basis for investigating whether such determinants are independent predictors of local recurrence or whether they are associated with clinical factors that we already define as contributing to risk. Future work will entail examining whether inclusion of genetic markers of disease may allow us to identify molecular characteristics of desmoid tumors that can be integrated into the nomogram to improve its concordance.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Janet Novak, of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, for substantive editing of the manuscript and Nicole Moraco for database assistance. Funding for the study was received from Cycle for Survival, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, the Kristen Ann Carr Fund, the National Institutes of Health through Soft Tissue Sarcoma Program Project grant P01 CA047179, and the National Cancer Institute through a SPORC in soft tissue sarcoma. The patient advocacy group SOS Desmoids and the French Sarcoma Group are thanked for their support of this project.

REFERENCES

1. Wu C, Nik-Amini S, Nadesan P, et al. Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*. 2010;70:7690–7698.
2. Li M, Cordon-Cardo C, Gerald WL, et al. Desmoid fibromatosis is a clonal process. *Hum Pathol*. 1996;27:939–943.
3. Alman BA, Li C, Pajerski ME, et al. Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Am J Pathol*. 1997;151:329–334.
4. Li C, Bapat B, Alman BA. Adenomatous polyposis coli gene mutation alters proliferation through its beta-catenin-regulatory function in aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Am J Pathol*. 1998;153:709–714.
5. Tejpar S, Nollet F, Li C, et al. Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene*. 1999;18:6615–6620.
6. Lazar AJ, Tuvin D, Hajibashi S, et al. Specific mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. *Am J Pathol*. 2008;173:1518–1527.
7. Robanus-Maandag E, Bosch C, Amini-Nik S, et al. Familial adenomatous polyposis-associated desmoids display significantly more genetic changes than sporadic desmoids. *PLoS One*. 2011;6:e24354.
8. Lewis JJ, Boland PJ, Leung DH, et al. The enigma of desmoid tumors. *Ann Surg*. 1999;229:866–872; discussion 872–873.
9. Merchant NB, Lewis JJ, Woodruff JM, et al. Extremity and trunk desmoid tumors: a multifactorial analysis of outcome. *Cancer*. 1999;86:2045–2052.
10. Easter DW, Halasz NA. Recent trends in the management of desmoid tumors. Summary of 19 cases and review of the literature. *Ann Surg*. 1989;210:765–769.
11. Higaki S, Tateishi A, Ohno T, et al. Surgical treatment of extra-abdominal desmoid tumours (aggressive fibromatoses). *Int Orthop*. 1995;19:383–389.
12. Lopez R, Kemalyan N, Moseley HS, et al. Problems in diagnosis and management of desmoid tumors. *Am J Surg*. 1990;159:450–453.
13. Markhed G, Lundgren L, Bjurstam N, et al. Extra-abdominal desmoid tumors. *Acta Orthop Scand*. 1986;57:1–7.
14. Plukker JT, van Oort I, Vermey A, et al. Aggressive fibromatosis (non-familial desmoid tumour): therapeutic problems and the role of adjuvant radiotherapy. *Br J Surg*. 1995;82:510–514.
15. Rock MG, Pritchard DJ, Reiman HM, et al. Extra-abdominal desmoid tumors. *J Bone Joint Surg Am*. 1984;66:1369–1374.
16. Fiore M, Rimareix F, Mariani L, et al. Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:2587–2593.
17. Smith AJ, Lewis JJ, Merchant NB, et al. Surgical management of intra-abdominal desmoid tumours. *Br J Surg*. 2000;87:608–613.
18. de Camargo VP, Keohan ML, D'Adamo DR, et al. Clinical outcomes of systemic therapy for patients with deep fibromatosis (desmoid tumor). *Cancer*. 2010;116:2258–2265.
19. Gounder MM, Lefkowitz RA, Keohan ML, et al. Activity of sorafenib against desmoid tumor/deep fibromatosis. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4082–4090.
20. Salas S, Dufresne A, Bui B, et al. Prognostic factors influencing progression-free survival determined from a series of sporadic desmoid tumors: a wait-and-see policy according to tumor presentation. *J Clin Oncol*. 2011;29:3553–3558.
21. Kattan MW, Leung DH, Brennan MF. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J Clin Oncol*. 2002;20:791–796.
22. Canter RJ, Qin LX, Maki RG, et al. A synovial sarcoma-specific preoperative nomogram supports a survival benefit to ifosfamide-based chemotherapy and improves risk stratification for patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14:8191–8197.
23. Dalal KM, Kattan MW, Antonescu CR, et al. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann Surg*. 2006;244:381–391.
24. Brennan MF, Kattan MW, Klimstra D, et al. Prognostic nomogram for patients undergoing resection for adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg*. 2004;240:293–298.
25. Wong SL, Kattan MW, McMasters KM, et al. A nomogram that predicts the presence of sentinel node metastasis in melanoma with better discrimination than the American Joint Committee on Cancer staging system. *Ann Surg Oncol*. 2005;12:282–288.
26. Barlin JN, Yu C, Hill EK, et al. Nomogram for predicting 5-year disease-specific mortality after primary surgery for epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;125:25–30.
27. Weiser MR, Gonen M, Chou JF, et al. Predicting survival after curative colectomy for cancer: individualizing colon cancer staging. *J Clin Oncol*. 2011;29:4796–4802.
28. Guadagnolo BA, Zagars GK, Ballo MT. Long-term outcomes for desmoid tumors treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;71:441–447.
29. Jelinek JA, Stelzer KJ, Conrad E, et al. The efficacy of radiotherapy as postoperative treatment for desmoid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50:121–125.
30. Ballo MT, Zagars GK, Pollack A, et al. Desmoid tumor: prognostic factors and outcome after surgery, radiation therapy, or combined surgery and radiation therapy. *J Clin Oncol*. 1999;17:158–167.
31. Lev D, Kotilingam D, Wei C, et al. Optimizing treatment of desmoid tumors. *J Clin Oncol*. 2007;25:1785–1791.

High frequency of β -catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management

J Dômont^{1,13}, S Salas^{2,13}, L Lacroix^{3,4}, V Brouste², P Saulnier³, P Terrier¹, D Ranchère⁵, A Neuville⁶, A Leroux⁷, L Guillou⁸, R Sciôt⁹, F Collin¹⁰, A Dufresne⁵, J-Y Blay⁵, A Le Cesne¹, J-M Coindre^{*,2,11}, S Bonvalot^{*,1} and J Bénard^{*,1,4,12}

¹Sarcoma Committee, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Institut Bergonié, Bordeaux, France; ³Translational Laboratory, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁴Department of Clinical Biology and Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁵Centre Léon Bérard, Lyon, France; ⁶Department of Pathology, Hôpital Hautepierre, Strasbourg, France; ⁷Department of Pathology, Centre Alexis Vautrin, Nancy, France; ⁸University Institute of Pathology, Lausanne, Switzerland; ⁹Department of Pathology, KU Leuven, Belgium; ¹⁰Department of Pathology, Centre Georges-François Leclerc, Dijon, France; ¹¹INSERM U916, Pathology Department, University Victor Segalen, Bordeaux, France; ¹²CNRS-UMR 8126, IFR54, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

BACKGROUND: Fibromatosis comprises distinct clinical entities, including sporadic extra-abdominal fibromatosis, which have a high tendency for recurrence, even after adequate resection. There are no known molecular biomarkers of local recurrence. We searched for β -catenin mutations in a European multicentre series of fibromatosis tumours to relate β -catenin mutational status to disease outcome.

METHODS: Direct sequencing of exon 3 β -catenin gene was performed for 155 frozen fibromatosis tissues from all topographies. Correlation of outcome with mutation rate and type was performed on the extra-abdominal fibromatosis group (101 patients).

RESULTS: Mutations of β -catenin were detected in 83% of all cases. Among 101 extra-abdominal fibromatosis, similar mutation rates (87%) were observed, namely T41A (39.5%), S45P (9%), S45F (36.5%), and deletion (2%). None of the clinico-pathological parameters were found to be significantly associated with β -catenin mutational status. With a median follow-up of 62 months, 51 patients relapsed. Five-year recurrence-free survival was significantly worse in β -catenin-mutated tumours regardless of a specific genotype, compared with wild-type tumours (49 vs 75%, respectively, $P=0.02$).

CONCLUSION: A high frequency (87%) of β -catenin mutation hallmarks extra-abdominal fibromatosis from a large multicentric retrospective study. Moreover, wild-type β -catenin seems to be an interesting prognostic marker that might be useful in the therapeutic management of extra-abdominal fibromatosis.

British Journal of Cancer (2010) 102, 1032–1036. doi:10.1038/sj.bjc.6605557 www.bjcancer.com

Published online 2 March 2010

© 2010 Cancer Research UK

Keywords: β -catenin mutation; fibromatosis; prognostic factor

Fibromatoses are rare, locally invasive soft-tissue tumours composed of spindle cells that display a wide spectrum of aggressiveness. These star-shaped soft tissues, devoid of a capsule, invade surrounding structures and have a high propensity for local recurrence (Sobin and Wittekind, 2002).

Clinical forms of the disease depend on the tumour site: abdominal fibromatosis (deep or desmoid), which occurs on the abdominal wall of women in association with hormonal factors; intra-abdominal fibromatosis, some forms of which are associated with germ-like mutations of the adenomatous polyposis coli (APC) gene-associated Gardner syndrome; and extra-abdominal fibro-

matosis, which occurs in the head and neck, trunk, and limbs. Sporadic extra-abdominal fibromatosis has a high tendency for local recurrence, even after apparently adequate resection. In institutional retrospective studies, local failure rates at 5 years have ranged from 25 to 60% (Bonvalot *et al*, 2008). This wide range reflects the great variability of accrual, treatments, and follow-up in this rare disease, which has not yet been investigated in a randomised controlled study. Traditionally, patients undergo standard surgery, with the primary goal always being to achieve complete resection with negative margins, as indicated for sarcomas. However, Bonvalot *et al* (2008) recently questioned the need for systematically including surgery and other aggressive treatments in the first-line treatment of primary extra-abdominal desmoid tumours. In their study, tumour growth arrest occurred in two-thirds of patients managed non-surgically. A larger, multi-institutional study conducted recently also showed that a wait-and-see approach avoided the need for aggressive surgery and radiotherapy in the majority of patients with primary tumours

*Correspondence: Dr J Bénard; E-mail: benard@igr.fr or Dr S Bonvalot; E-mail: bonvalot@igr.fr or Dr J-M Coindre; E-mail: coindre@bergonie.fr

¹³ These authors contributed equally to this work

Received 21 October 2009; revised 5 January 2010; accepted 8 January 2010; published online 2 March 2010

(Fiore *et al*, 2009). Intrinsic biological characteristics of tumour cells and the host microenvironment, for example, could account for highly diverse outcomes.

To date, no predictive criteria (clinical, histological, or biological) that might help oncologists in the clinical management of patients with extra-abdominal fibromatosis have been identified. From a biological point of view, desmoids and extra-abdominal fibromatosis tumours typically harbour mutations of APC and/or β -catenin genes (Alman *et al*, 1997; Tejpar *et al*, 1999). Adenomatous polyposis coli is known to regulate the cytoplasmic level of β -catenin, which is involved in cell adhesion and has a key role in the Wnt (Wingless) signalling pathway. The phosphorylation of β -catenin on threonine 41 and serine 33, 37, and 45, encoded by exon 3 of the β -catenin gene, occurs when β -catenin binds to APC and leads to protein degradation through the ubiquitin–proteasome pathway (Orford *et al*, 1997; Rubinfeld *et al*, 1997). Adenomatous polyposis coli mutations give rise to β -catenin protein accumulation and induce Wnt pathway activation. β -Catenin gene missense mutations, in turn, lead to post-translational stabilisation of the protein and translocation from the cytoplasm to the nucleus, where β -catenin binds to the T-cell factor lymphoid enhancer family, resulting in transcription transactivation (Morin *et al*, 1997). Such mutations had only been described in small series of desmoid tumours until very recently when Lazar *et al* (2008) reported a high frequency of β -catenin mutations in the vast majority of fibromatoses.

In this study, we analysed a large series of extra-abdominal fibromatoses (with follow-up data spanning over 5 years) collected through the connective tissue cancer network *Conticanet* in France, Belgium, and Switzerland to evaluate whether β -catenin mutational status might constitute a valuable biomarker for recurrence that could improve the therapeutic management of such disabling tumours.

MATERIALS AND METHODS

Tumour material of patients

All tumour samples were collected through CONTICANET and stored in a centralised tumour data bank at the Bergonié Institute in Bordeaux, France, after obtaining approval from the appropriate ethics committees. This European fibromatosis tumour database contained exhaustive clinical information and follow-up data for over 5 years. From this tumour database, 187 eligible fibromatosis tumour tissues collected between December 1987 and January 2007 were tested in this retrospective study. Most of the patients with extra-abdominal fibromatosis had been surgically treated with curative intent. The tumour material comprised tumour samples from biopsies or microbiopsies performed using 16- or 18-gauge needles. The tissues had been obtained after surgery at diagnosis and snap-frozen in liquid nitrogen. Twenty-three formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumour samples paired to frozen tumour samples were also obtained, as were 35- μ m-thick tumour slices flanked by 4- μ m sections from either frozen or FFPE fibromatosis tumours for use as histological controls (haematoxylin–eosin–safran staining). The histological controls were analysed by pathologists specialised in soft-tissue tumours (Ph T and JMC). Over 90% of the histological features identified were typical of fibromatosis in all tumours analysed.

β -Catenin gene sequencing

Following lysis of the 35 μ m tumour slices, nucleic acids were obtained using Qiagen column separation according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Available

DNA for sequencing was obtained in 155 desmoid-type fibromatosis tumour biopsy specimens including all clinical forms of the disease. DNA lymphocytes from 96 anonymous individuals were used as non-mutated controls. The *CTNNB1* mutations located in exon 3 were analysed by direct DNA sequencing. The genomic DNA was first amplified by polymerase chain reaction (PCR) of over 35 cycles at an annealing temperature of 55°C (forward primers: 5'-ATTTGATGGAGTTGGACATGGC-3' and reverse: 5'-CCAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG-3') as previously described (Delmas *et al*, 2007). All PCR amplicons were checked using 1% agarose gel electrophoresis. Sequencing reactions were performed using a BigDye terminator cycle sequencing kit and analysed on a 48-capillary 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Exonic sequences were read and aligned using SeqScapeR software (Applied Biosystems). As reference for β -catenin gene, NM 00109822091 aligned on a sequence of chromosome 3 (NCBI 36) was used.

Patient population and clinical data

The varying clinical forms of fibromatosis (sporadic tumours, intra-abdominal tumours associated with hereditary syndrome, and deep and extra-abdominal tumours) were all represented in the *Conticanet* series of tumours used for this study. Of 155 fibromatosis tissues from all topologies available for DNA sequencing, 101 extra-abdominal fibromatoses were used to investigate the correlation between β -catenin mutational status and clinical characteristics: age, sex, tumour size, tumour location (head and neck, abdominal and thoracic walls and limbs), therapy (including quality of surgical resection as assessed by type of resection (R0, R1, or R2 according to the UICC-R classification system)) (Lev *et al*, 2007), and outcome (for 101 patients treated with a curative intent). R0 resection was obtained for 42 patients.

Statistical analysis

Survival times were calculated from the date of diagnosis to the date of relapse (disease-free survival). Log-rank tests were used for survival outcome analysis. Descriptive statistics were used to correlate patient characteristics to the β -catenin genotype, and the relationship between clinical characteristics and β -catenin mutational status was analysed using logistic regression analysis.

RESULTS

High frequency of β -catenin gene mutation in frozen tumour specimens

Of the 155 sequenced DNA from tumour samples obtained from the *Conticanet* fibromatosis tumour database, 129 (83%) contained a mutation of β -catenin exon 3. No mutations were detected in the DNA extracted from lymphocytes of the 96 controls. All sequences were controlled in an independent experiment. The rate of mutation identified (83%) confirms and updates the findings of a preliminary report by our group on the basis of 95 cases from the same series (Domont *et al*, 2009).

β -Catenin missense mutations were essentially found at codons 41 and 45, identified as c.121 A>G or pThr41-Ala (T41A), c.133T>C or pSer45Pro (S45P), and c.134C>T or pSer45Phe (S45F). The 41A and S45F mutations were relatively common, occurring in 41% (64 out of 155) and 34% (53 out of 155) of cases, whereas the S45P mutation occurred in just 6% (9 out of 155) (Figure 1). In three cases (2%), we also detected a small in-frame deletion of 3, 6, and 30 base pairs, which removed codon 36, codons 33 and 34, and codons 45–54, respectively.

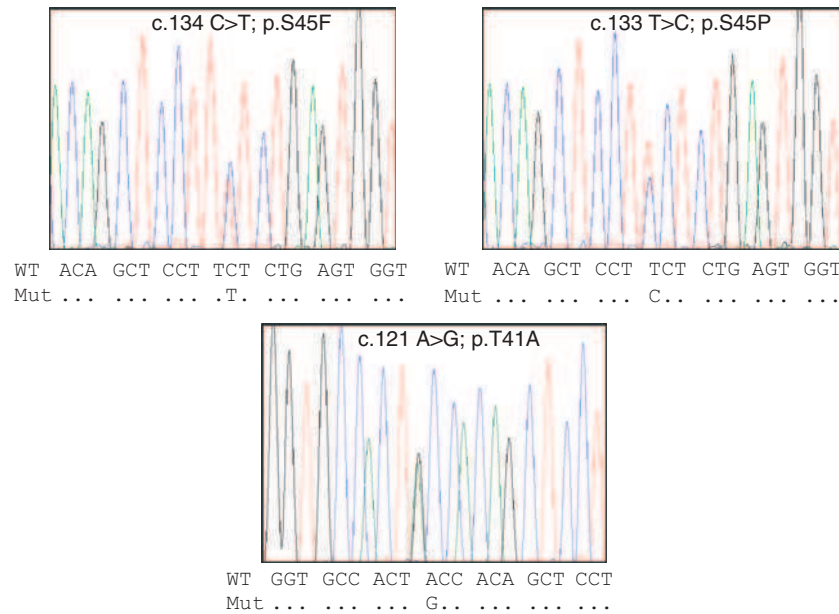


Figure 1 β -Catenin mutations detected in extra-abdominal fibromatosis tumours. Typical heterozygous missense mutations found in exon 3 β -catenin gene at codons 41 (T41A) and 45 (S45F and S45P).

Potential diagnostic interest of mutation analysis on formalin-fixed tissues

The clinical potential of the above results obtained from frozen tumour tissues led us to test the feasibility of sequencing using FFPE tissues, which are more readily available in daily practice. We therefore compared sequencing results from the FFPE samples paired to the frozen tumour specimens of the series. We observed identical data in 20 out of 23 (87%) samples, with no false positives and just three false negatives from FFPE tissues. Archival FFPE tumour tissues might thus provide useful and easily obtainable material for determining β -catenin mutational status in daily practice.

Characteristics of patients with extra-abdominal fibromatosis by β -catenin genotype

The European fibromatosis tumour database contained exhaustive clinical information, with follow-up data for over 5 years, for 101 patients (36 men) with extra-abdominal fibromatosis that had been surgically treated with curative intent. Fifty-seven patients had been treated for primary fibromatosis (57%) and 40 for relapse (40%) (Table 1). The β -catenin mutation rate detected in this group (87% (88 out of 101)) was similar to that detected for the whole series, as was the distribution of mutation types (T41A, 39.5% (40 out of 101), S45F, 36.5% (37 out of 101), and S45P, 9% (9 out of 101)) (Figure 1). We also found two deletions (2%). Table 1 shows patient characteristics according to β -catenin mutational status. Most of the surgical margins were R0 (42%) or R1 (34%). Few patients had received postoperative radiation therapy (18%) or medical treatment (8%). With a median follow-up of 62 months (range 3–452), 51 patients (51%) relapsed. β -Catenin mutational status was not found to be significantly associated with sex, age, tumour site, presentation (primary or relapse), or therapy. No correlation could be established between surgical resection quality and mutation rate.

Correlation of outcome with mutation rate and type

To test whether β -catenin mutational status correlated with clinical outcome in patients with extra-abdominal fibromatosis, we

compared the frequency of disease-free survival (estimated from the date of diagnosis to the date of relapse) in patients with wild-type and β -catenin-mutated tumours. Among 51 relapses (51% of the cohort), 1 and 50 were from patients with wild-type tumour and mutated tumour, respectively. Five-year recurrence-free survival (Figure 2) was significantly shorter in all β -catenin-mutated tumours (43%), compared with wild-type tumours (75%) ($P=0.02$). We then attempted to relate poor outcome to a specific genotype but found no significant differences for T41A, S45F, or S45P mutants, although the 45F mutation did seem to show a weak trend of significance for poorer outcome. Given the possible prognostic impact of surgical margin quality, we analysed the β -catenin genotype in patients with R0 resection ($n=42$) and found relapse to be significantly higher in patients with mutated tumours (18 out of 33) than wild-type tumours (0 out of 9) ($P=0.02$), as shown in the Kaplan–Meier graph (Figure 3).

DISCUSSION

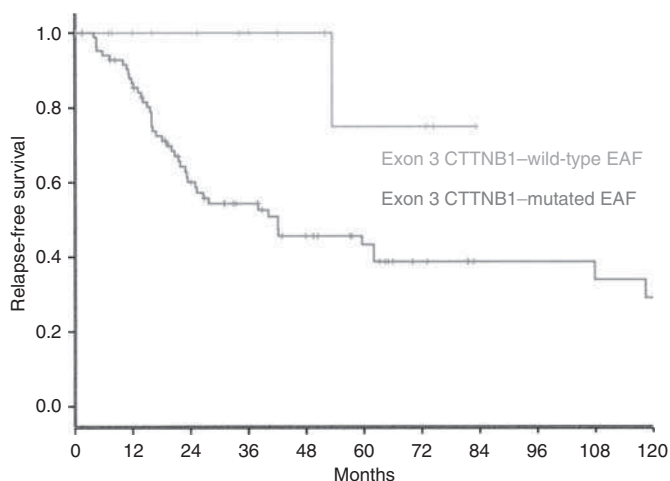
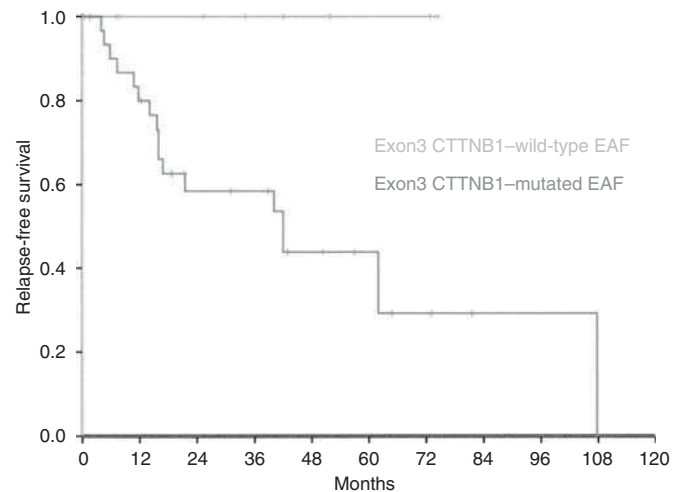
As dysregulation of expression and mutation of β -catenin hallmarks sporadic aggressive fibromatosis (Tejpar *et al*, 1999), we searched for exon 3 β -catenin gene mutations in a large European multicentre series of extra-abdominal fibromatosis tumours. Indeed, mutations of exon 3 of β -catenin, which harbours phosphorylatable serine/threonine residues, induce stabilisation of β -catenin and subsequent biological properties such as proliferation and invasiveness.

Our study revealed a high frequency of β -catenin mutations in fibromatosis tumours ($n=155$), and in extra-abdominal forms in particular ($n=101$), results similar to that reported by another study (Lazar *et al*, 2008) that included a similar-sized series of fibromatosis tumours ($n=138$). Remarkably, all mutations clustered at Threonine 41 (T41A) and Serine 45 (S45F and S45P) in all topographies, suggesting that these residues have crucial functions in the β -catenin/Wnt signalling pathway required for the maintenance of fibroblast/myofibroblast homeostasis (Cheon *et al*, 2002; Clevers, 2006; Polakis, 2007). Irrespective of the molecular mechanism at work behind these two specific residues (Xu *et al*, 2007), a high frequency of mutations (87%) hallmarks

Table 1 Characteristics of patients with extra-abdominal fibromatosis by β -catenin genotype

CTNNB1 characteristics	Total	WT n	Mutated n	41A n	45F n	45P n	del n
N	101	13	88	40	37	9	2
Age							
Median, years	37	39.5	37.5	36.7	37	45.5	43
Range	0.1–77	0.5–66	0.1–77	10–73	0.1–77	14–65	19–68
Sex							
Male	36	4	32	14	15	3	—
Female	65	9	56	26	22	6	2
Presentation							
Primary	57	12	45	16	20	8	1
Relapse	40	1	39	22	15	1	1
NA	4	—	4	2	2	—	—
Tumour site							
Head/Neck	8	1	7	2	5	—	—
Trunk	54	5	49	20	19	8	2
Limb	37	7	30	17	12	1	—
NA	2	—	2	1	1	—	—
Tumour size, mm							
Median, mm	80	40	80	80	85	75	40
Range	10–300	15–120	10–300	21–300	25–200	25–190	10–70
Therapy							
Surgery	101	13	88	40	37	9	2
Radiation therapy	18	1	17	7	8	1	1
Medical therapy	8	1	7	3	4	—	—
Surgical margin							
R0	42	9	33	14	13	5	1
R1	33	3	30	15	12	3	—
R2	8	—	8	1	5	1	1
NA	18	1	17	10	7	—	—
Outcome							
Relapse	51	1	50	22	23	4	1

Patient clinical data and β -catenin genotype tumour data from the series of extra-abdominal fibromatosis tumours. WT, wild β -catenin gene (exon 3) del, deletion in exon 3; 41A, 45F, 45P, mutated residues; n, number of patients; NA, not available; mm, millimeter; R0, R1, and R2, quality of surgical margins according to the UICC-R classification system.

**Figure 2** Kaplan-Meier graph of relapse-free rate-time as a function of a mutation event. Plots of time from time of first surgery to remove tumour (primary or relapse) of extra-abdominal fibromatosis (EAF) to the first recurrence event according to Kaplan-Meier for the entire cohort ($n=101$). Plot of time from tumour surgery (primary or relapse) to recurrence event. Analysis reveals that the mutated genotype, irrespective of the β -catenin mutation (T41A, S45F, or S45P), is a significant predictor of relapse ($P=0.02$).**Figure 3** Kaplan-Meier representation of relapse-free rate-time as a function of a mutation event for patients operated for extra-abdominal fibromatosis (EAF) with R0 resection ($n=42$). Plot of time from tumour surgery (primary or relapse) to recurrence event. Multivariate analysis reveals that the β -catenin-mutated genotype, irrespective of the mutation (T41A, S45F, or S45P), is a significant predictor of relapse ($P=0.02$).

extra-abdominal fibromatosis at a molecular level. On studying a series of 101 such tumours, we found that 5-year recurrence-free survival was significantly worse in all mutated tumours (43%) compared with wild-type tumours (75%) ($P=0.02$). However, no specific mutant genotypes (T41A, S45F, or S45P mutants) were related to prognosis, although we did observe a weak trend for S45F, but it was far from significant. Our results contrast with those of a very recent American study proposing that patients with fibromatosis harbouring an S45F mutation are at particular risk of recurrence (Lazar *et al*, 2008). The discrepancy may reflect differences in the clinical entities studied. Although our study was restricted to extra-abdominal tumours, Lazar *et al* (2008) also included deep abdominal tumours.

Evidence that β -catenin mutations influence the risk of relapse is further strengthened by our analysis of patients with R0 resections, in which relapse-free survival was significantly higher in wild-type than in mutated tumours. Hence, as extra-abdominal fibromatosis relapse is clinically unpredictable, its risk of occurrence could be evaluated using β -catenin mutational status: a wild-type tumour, for example, would predict good outcome, whereas a β -catenin mutation would predict a potential risk of relapse. It is probably not the only factor involved, however, as wild-type tumours represent 16% of cases in our study, whereas indolent extra-abdominal fibromatosis represents roughly 50% of the patients according to a recent multi-institutional European analysis (Fiore *et al*, 2009). Therefore, several mutated tumours harbouring stabilised β -catenin do not relapse. Various mechanisms could explain this paradox. First of all, it is possible that deregulation of additional molecular actors of the canonical Wnt pathway – from the receptor (with agonists and antagonists) to cytoplasmic effectors and finally to the target gene – may contribute to the tumour phenotype. Second, alteration of the non-canonical Wnt pathway and effectors must also be considered. Hence, additional prospective studies are needed to find more discriminant markers.

Finally, from a practical point of view, the feasibility test comparing sequences from frozen and FFPE tumour tissues showed that β -catenin mutational status can be assessed using either fresh or archival extra-abdominal tumour specimens in

accordance with the tumour collection system used in each pathology laboratory. This simple yet efficient molecular test might prove to be a very interesting complementary diagnostic tool to regular histological examination in extra-abdominal fibromatosis. Indeed, in cases in which there is insufficient tumour material for histological analysis, β -catenin sequencing could be performed, as it requires just a few ng of gDNA. The test could also be helpful to resolve puzzling cases in which the histological interpretation of primary tumour tissue obtained by fine-needle aspiration is complicated.

A final application would be to use molecular tumour findings to individualise the choice of management protocols. This application of personalised medicine in patients with extra-abdominal fibromatosis could help to identify the right treatment at the right time for optimal outcome.

REFERENCES

- Alman BA, Li C, Pajerski ME, Diaz-Cano S, Wolfe HJ (1997) Increased β -catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses. *Am J Pathol* 151: 329–334
- Bonvalot S, Eldweny H, Haddad V, Rimareix F, Missenard G, Oberlin O, Vanel D, Terrier P, Blay JY, Le Cesne A, Le Pechoux C (2008) Extra-abdominal primary fibromatosis: aggressive management could be avoided in a subgroup of patients. *Eur J Surg Oncol* 34: 462–468
- Cheon S, Cheah A, Turley S, Nadesan P, Poon R, Clevers H, Alman BA (2002) β -catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *PNAS* 99: 6973–6978
- Clevers H (2006) Wnt/ β -catenin signalling in development and disease. *Cell* 127: 469–480
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, Demirkan N, Bastian BC, Goding CR, Larue L (2007) β -catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 21: 2923–2935
- Domont J, Salas S, Lacroix L, Brouste V, Dufresne A, Terrier P, Blay J-Y, Le Cesne A, Coindre JM, Bénard J, Bonvalot S (2009) High incidence of β -catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a surrogate marker for disease management. *J Clin Oncol* 27: 15s, (suppl; abstr 10501)
- Fiore M, Rimareix F, Mariani L, Domont J, Collini P, Le Pechoux C, Casali PG, Le Cesne A, Gronchi A, Bonvalot S (2009) Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Ann Surg Oncol* 16: 2587–2593
- Lazar AJ, Tuvin D, Hajibashi S, Habeeb S, Bolshakov S, Mayordomo-Aranda E, Warneke C, Lopez-Terrada D, Pollock RE, Lev D (2008) Specific mutations in the β -catenin gene correlate with local recurrence in sporadic desmoid tumors. *Am J Pathol* 173: 1518–1527
- Lev D, Kotilingam D, Wei C, Ballo M, Zagars G, Pisters P, Lazar AA, Patel S, Benjamin R, Pollock R (2007) Optimizing treatment of desmoid tumors. *J Clin Oncol* 25: 1785–1791
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 275(5307): 1787–1790
- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW (1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J Biol Chem* 272(40): 24735–24738
- Polakis P (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 45–51
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P (1997) Loss of β -catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res* 57(20): 4624–4630
- Sobin LH, Wittekind Ch (2002) *TNM classification of malignant tumours UICC*, 6th edn, Tumor of bone and soft tissues p110–p116. Wiley Liss: New York
- Tejpar S, Nallet F, Li C, Wunder JS, Michils G, dal Cin P, Van Cutsem E, Bapat B, van Roy F, Cassiman JJ, Alman BA (1999) Predominance of β -catenin mutations and β -catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis. *Oncogene* 18(47): 6615–6620
- Xu W, Kimelman D (2007) Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 120: 3337–3344

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CONTICANET. The data and materials used in this publication were provided by the Conticanet database (<http://www.conticabase.org>). We are grateful to the SOS Desmoid Association (Marieke Podevin, President) and to the French Desmoid Patients Association (<http://www.sos-desmoide.asso.fr>), in the framework of the PERSEUS Program ('Patients and Oncologists' network facing a fibers' network') launched by the associations in 2008 with the support of the Ligue Nationale contre le Cancer (<http://www.ligue-cancer.net>). We also thank Emilie Chopé for her preliminary indicative experiments, Simon Baconnier (Conticanet manager) for his constant input and support, and David Cappellen and Lionel Larue for stimulating discussions. Edited by EnglishBooster, <http://www.englishbooster.com>

Identification of biological factors predictive of response to imatinib mesylate in aggressive fibromatosis

A Dufresne^{1,2}, F Bertucci³, N Penel⁴, A Le Cesne⁵, B Bui⁶, M Tubiana-Hulin⁷, I Ray-Coquard², D Cupissol⁸, C Chevreau⁹, D Perol², A Goncalves³, M Jimenez¹⁰, PP Bringuier¹ and JY Blay^{*,1,2}

¹Department of Medical Oncology and Department of Pathological Anatomy, Hospital Edouard Herriot, Lyon, France; ²Department of Medical Oncology, Biostatistics Unit, Centre Léon Bérard, INSERM U590, Lyon, France; ³Department of Medical Oncology, Institut Paoli Calmette, INSERM UMR891, Marseille, France; ⁴Centre Oscar Lambret, Lille, France; ⁵Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif Cedex, France; ⁶Institut Bergonié, Bordeaux, France; ⁷Centre René Huguenin, St Cloud, France; ⁸Centre Val d'Aurelle, Montpellier, France; ⁹Centre Claudius Regaud, Toulouse, France; ¹⁰FNCLCC, Paris, France

BACKGROUND: Imatinib induces responses and disease stabilisations in non-resectable patients with aggressive fibromatosis (AF). The precise target of imatinib in AF and predictive factors for response to treatment are unknown.

METHODS: We investigated factors potentially predictive of response to imatinib in a series of 40 patients with progressive AF included in a phase II trial of imatinib: we tested the presence of *KIT* exon 10 variant (M541L), the expression of imatinib-sensitive kinases and cell cycle proteins by immunohistochemistry (IHC), and other clinical and biological factors.

RESULTS: Of 10 patients for whom DNA could be extracted, 3 had a *KIT* exon 10 variant (30%), with no correlation with response or progression-free survival (PFS). The expression of other imatinib targets (PDGFRA/B, macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR)) and of downstream components of the cell cycle, cell proliferation and proliferation pathway (cyclin D1, ERK, MEK 1–2) did not correlate with PFS. Pre-treatment lymphopenia (<1500/μl) and tumour size >120 mm correlated with shorter PFS in univariate and multivariate analyses.

CONCLUSION: Our findings show that a baseline biological characteristic of the patient is the major parameter influencing response to imatinib in aggressive fibromatosis. Tumour characteristics, including the presence of a *KIT* exon 10 M541L variant, may influence tumour control but this needs to be confirmed and better explained.

British Journal of Cancer (2010) 103, 482–485. doi:10.1038/sj.bjc.6605783 www.bjcancer.com

Published online 27 July 2010

© 2010 Cancer Research UK

Keywords: aggressive fibromatosis; imatinib mesylate; predictive factors

Aggressive fibromatosis (AF), also known as desmoid tumour, is a rare neoplasm arising from deep musculo-aponeurotic structures. The disease, which affects 2 to 4 per 100 000 persons annually, may occur sporadically or be associated with familial adenomatous polyposis in Gardner syndrome. This slow-growing fibrous tumour may arise at any site in the body. Desmoid tumours have been classified into three main subsets, according to their location: extra-abdominal (60% of cases), abdominal wall (25%), and intra-abdominal (15%) tumours. They are considered non-malignant, with loco regional aggressiveness and a potential for recurrence but no risk of metastatic spread (Nuytens *et al*, 2000; Enzinger and Weiss, 2001; Janinis *et al*, 2003).

When treatment is decided upon, complete surgical removal remains the best option but may be difficult or mutilating, depending on the tumour location or disease extension. Moreover, a significant proportion of patients relapse locally and/or regionally after initial surgery; in these patients, mutilating surgery and/or radiotherapy are often used, with important functional consequences in case of musculoskeletal or organ resection. When local treatment is not feasible, systemic therapies including

hormonal treatments such as with anti-estrogens, administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs or chemotherapy may induce responses, whereas some authors propose a watch and wait policy (Fiore *et al*, 2009). Imatinib mesylate (Gleevec) is a specific tyrosine-kinase inhibitor targeting *kit*, *bcr-abl*, platelet-derived growth factor receptors and, as more recently reported, M-CSFR or CSF1R. Responses and prolonged disease stabilisations with imatinib have been reported in different series of patients with relapsing AF, with 1-year progression-free survival (PFS) rates close to 60–70% (Mace *et al*, 2002; Gonçalves *et al*, 2006; Heinrich *et al*, 2006). However, the biological mechanisms underlying the cytostatic effect of imatinib in AF remain unclear.

In this work, we analysed potential predictors of response to imatinib in AF using samples from patients included in the phase II study of the French Sarcoma Group, DESMINIB (Fayette *et al*, 2007; Dufresne *et al*, 2009). The presence of the M541L *KIT* variant, the expression of imatinib targets and cell cycle proteins on tissue microarrays (TMAs), as well as more classical clinical and biological factors were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Patients with progressive or recurrent AF not amenable to curative surgery or radiotherapy were included in a phase II multicenter

*Correspondence: JY Blay; E-mail: blay@lyon.fnclcc.fr

Revised 21 May 2010; accepted 15 June 2010; published online 27 July 2010

study evaluating the efficacy and toxicity of imatinib. Patients with adequate end-organ function were treated with a dose of 400 mg imatinib, increasing to 800 mg in case of disease progression. Best clinical response to imatinib (400 or 800 mg daily) was defined according to the RECIST criteria. Evaluation was carried out every 3 months. All on-treatment tumour evaluations but two were reviewed by an independent radiological review committee. Patients whose best response was complete response (CR), partial response (PR) or stable disease (SD) lasting more than 6 months were considered responsive. Patients for whom disease stabilisation lasted less than 6 months or who had disease progression were considered non-responsive. One of the secondary end points of the study was the determination of clinical and biological criteria potentially predictive of response or prolonged disease stabilisation on treatment with imatinib. Informed consent was obtained from all patients before their enrolment in the study and collection of archival pathology specimens.

In all, 40 patients were included in this study. Two patients who participated in the initial clinical study refused consent for use of their tumour samples for biological research. Paraffin-embedded tissue samples from 34 of the 40 patients (85%) were collected from the pathology centres.

Immunohistochemistry (IHC)

A total of 5 of the 34 tissue samples were not suitable for the construction of TMAs. In all, 29 specimens were thus used as donor blocks. Sections from each donor block were stained with haematoxylin, eosin, and saffron. Morphologically representative regions were located and circled on each slide. Finally, three 1 mm cylindrical cores were extracted from the circled areas and precisely arrayed into new recipient paraffin blocks (35 × 22 × 3 mm), with a distance of 1.5 mm between cores. TMA blocks were cut into 4 µm sections with a microtome.

Table 1 presents the different antibodies tested with their dilution, the duration of antigen retrieval and the duration of incubation with primary antibody. All reactions were realised using a BenchMark XT automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ, USA). All slides were deparaffinised by heating at 75°C for 16 min. Antigen retrieval was carried out by treatment with EDTA (pH 8.0) between 30 and 60 min at 95°C. The samples were incubated for 24 or 32 min at 37°C with the primary antibody, and then 8 min at 37°C with the secondary antibody directly combined with horseradish peroxidase. All samples were counterstained with haematoxylin.

Mutation analysis

We analysed the previously reported KIT exon 10 mutation (Gonçalves *et al*, 2006), which corresponds to an A to C point mutation (positions 1621 on mRNA and 69304 on DNA) resulting in the substitution of methionine for leucine (position 541). Genomic

DNA was extracted from slides of 34 paraffin-embedded specimens using the MasterPure complete DNA and RNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA). DNA of suitable quality for mutation analysis was obtained in only 10 cases, mainly because of improper fixation of paraffin-embedded tissues. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify KIT exon 10. The primers used were generated by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA): 5'-GAG TGG CTG TGG TAG AGA TC-3' (sense) and 3'-GAG AAA GGG AAA AAT AGA TCA-5' (antisense). PCR was carried out using Taq DNA polymerase (Transgenomic, Omaha, NE, USA) with the following cycle conditions: denaturation at 95°C, followed by 10 cycles at decreasing temperatures between 66°C and 61°C with a decrement of 0.5°C per cycle, and additional extension at 72°C. The primers used for sequencing were the same as those used for amplification. Before sequencing, PCR products were purified using Centriprep centrifugal filter device (Millipore, Billerica, MA, USA). The purified PCR product was then subjected to automated sequencing using a DNA analyser (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA).

Statistical analysis

The duration of PFS is defined as the time from the beginning of treatment to the date of disease progression or death. PFS is a continuous variable, censored at the date of disease progression or death. PFS rates were estimated using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to identify the factors possibly influencing the duration of PFS. Variables found significant in univariate analysis were used for multivariate analysis.

Together with protein expression and presence of KIT mutations, we assessed the following variables: gender, age, site of primary tumour, tumour size, performance status (PS), number of previous surgeries, PNN count, haemoglobin levels and lymphopenia before imatinib.

RESULTS

Complete clinical results of the desminib phase II study are currently being submitted for publication and will only be briefly described here. Table 2 presents the major clinical data of the study. In all, 40 patients, 12 (30%) males and 28 (70%) females, with a median age of 41 years were included in the desminib phase II trial between August 2004 and November 2005. In six cases (15%), AF was associated with familial adenomatous polyposis. Tumour sites were the limbs ($n=24$, 60%), the abdominal wall ($n=7$, 18%), the mesentery ($n=8$, 20%) and the head and neck ($n=4$, 10%). Previous treatments included surgery ($n=33$, 80%), radiotherapy ($n=9$, 23%), hormonal treatment ($n=18$, 45%), non-steroidal anti-inflammatory drugs ($n=12$, 30%), and chemotherapy ($n=8$, 20%). All patients had recurrent or progressive disease at the time of inclusion. Imatinib was given

Table 1 Antibodies characteristics

Antibody	Reference	Dilution	Ag retrieval (min)	Primary Ab (min)
Anti-c-kit	A4502; Dako, Glostrup, Denmark	1:100	30	24
Anti-PDGFR α	AF 307 NA; R&D, Minneapolis, MN, USA	1:50	30	32
Anti-PDGFR β	sc-339; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA	1:300	30	32
Anti-M-CSFR	49C10; Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:50	30	32
Anti-E cadherin	18-0223; Zymed, Carlsbad, CA, USA	1:70	30	24
Anti- β catenin	M3539; Dako	1:200	30	32
Anti-p42 map Kinase ERK	9108; Cell Signaling	1:100	30	32
Anti-phospho-AKT Ser 473	3787; Cell Signaling	1:50	30	32
Anti-phospho-MEK 1/2	2338; Cell Signaling	1:50	30	32
Anti-cyclin D1	RM-9104-R7; Neomarkers, Fremont, CA, USA	1	30	24

Abbreviations: Ab = antibody; Ag = antigen; ERK = extracellular signal regulated kinase; M-CSFR = macrophage colony-stimulating factor receptor; PDGFR = platelet derived growth factor.

Table 2 Patient and disease characteristics

	N (40)	%
Age (in years) (range)	41 (20–72)	
Sex		
Female	28	70
Male	12	30
PS (available for 37 patients)		
0	27	73
1	9	24
2	1	3
Tumour location (multifocal in four cases)		
Extraabdominal	28	70
Abdominal wall	7	18
Intraabdominal	8	20
Previous treatment before enrolment		
Surgery	34	85
Radiotherapy (median dose 50 Gy)	9	23
Hormonal therapy	18	45
Treatment with NSAID	12	30
Chemotherapy	8	20

Abbreviations: NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drug; PS = performance status.

for 1 year at a dose of 400 mg/day. With a median follow-up of 34 months, PFS at 2 years was 55% (95% CI 39–69), with 4 (10%) patients in PR and 1 (2.5%) in CR (Fayette *et al*, 2007; Dufresne *et al*, 2009). After dose-escalation, 8 out of 10 patients had a second progression after transient stabilisation of their disease for a median of 12 months (range 2–30).

Immunohistochemical analysis of the expression of KIT, PDGFRA and B, M-CSFR, p42 ERK, phospho-Ser 473-Akt, phospho MEK 1–2, and cyclin D1, β catenin and E-Cadherin was performed on TMA. PDGFRB and β catenin were found expressed in all samples, cyclin D1 in 5 samples (17%) and phospho ERK in 17 (57%) without any correlation with PFS. It may be noted that none of the patients with detectable cyclin D1 expression had progressed at 1 year. No expression of M-CSFR, PDGFRA, E-Cadherin, phospho MEK 1–2, or phospho Akt on ser 473 was observed.

Among the ten patients for whom DNA was available, we observed one CR and one PR (response rate 2 out of 10, 20%) on imatinib and 8 (80%) disease stabilisations. Three (30%) tumours were found to harbour the KIT exon 10 mutation, including the patient with CR (13 months +) and two patients with SD. One PR and six disease stabilisations were observed in the other seven patients. PFS was not significantly different in patients with and without KIT mutations, nor between patients with and without DNA available for sequencing.

Other clinical and biological factors were also tested for correlation with imatinib response in this series. Tumour size over 120 mm was associated with a worse PFS (median PFS, 5 months vs 15 months, $P=0.007$). None of the other clinical characteristics tested (gender, age, site of primary tumour, PS, number of previous surgeries), nor PNN (neutrophil) count or haemoglobin levels before imatinib were found correlated with PFS. Conversely, lymphopenia ($<1500/\mu\text{l}$) before initiation of imatinib was found to be highly correlated with a poorer PFS in this series (Figure 1B). Lymphopenia and tumour size above 120 mm were the only two parameters found significantly predictive of adverse outcome using the Cox model (lymphopenia HR = 38, $P=0.002$; size >120 mm HR = 19, $P=0.008$).

DISCUSSION

Several studies have failed to explain the biological mechanisms underlying the cytostatic effect of imatinib in AF. Heinrich *et al*

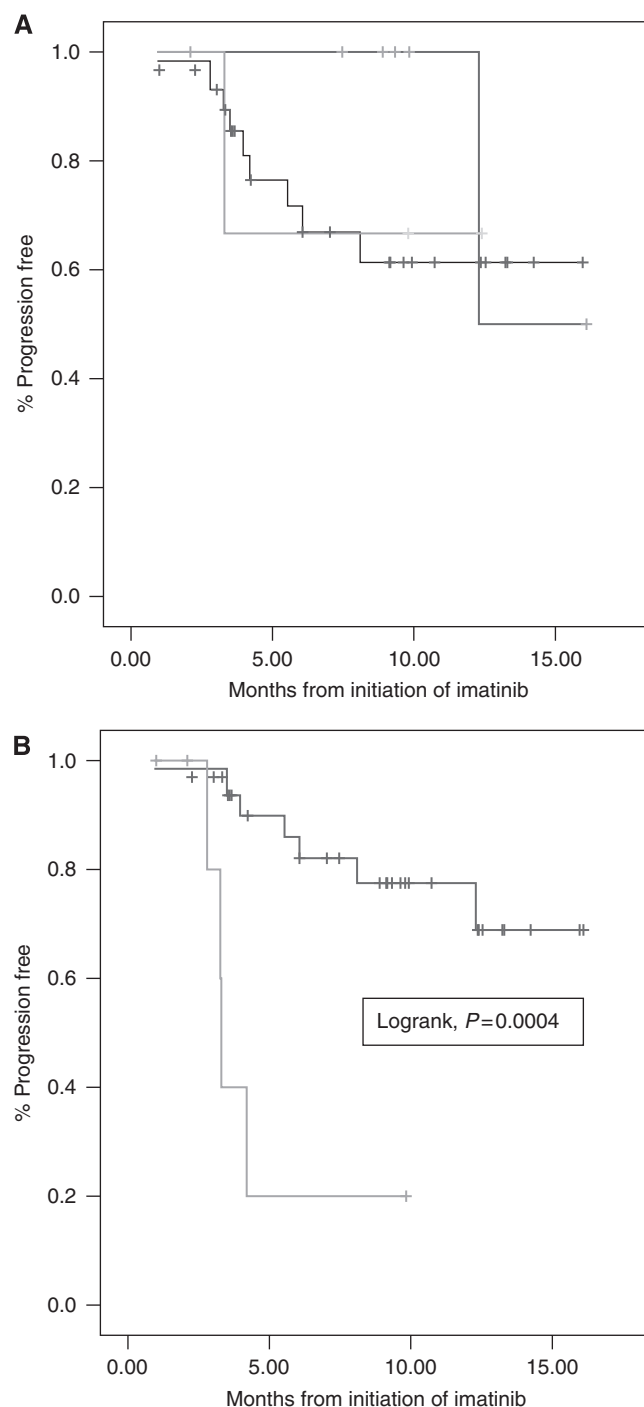


Figure 1 (A) Progression-free survival of patients with (green), without (blue) and with undetermined (black) KIT exon 10 mutation. (B) Progression-free survival of lymphopenic (green) and non-lymphopenic (blue) patients. (See online version for color information.)

(2006) have investigated a series of 19 patients with AF treated with imatinib and tested them for expression of several proteins (total and activated KIT, PDGFRA and B, activated PI3K Akt, MAPK and STAT3) and CTNNB1 mutations. However, they have failed to identify factors predictive of response and outcome after imatinib treatment, and no KIT expression by IHC or KIT mutation (exon 9, 11–13, 17 but not exon 10 were sequenced) has been detected. Seinfeld *et al* (2006) have reported the detection of a KIT exon 10 germline variant resulting in M541L substitution in two of four

extraabdominal AF samples. Some of us have later reported on a patient with AF who responded to imatinib treatment and presented with the same KIT exon 10 variant (Gonçalves *et al*, 2006). This is the reason why we searched for M541L exon 10 variant in our series of patients treated with imatinib.

To our knowledge, this is the largest series investigating pre-imatinib tumour- and host-related molecular and clinical factors, including KIT exon 10 mutations. Even though only a limited number of cases could be investigated, response rates and PFS were not found significantly different in patients with and without the M541L KIT allele. It may be noted though, all three patients with M541L allele achieved tumour control with imatinib, including one patient with a CR. Even if not statistically confirmed, the results of the present study strongly support the clinical impression that AF patients harbouring the M541L variant are more sensitive to imatinib. The lack of statistical correlation between the presence of the M541L variant and response rate or survival is probably because of the low number of patients tested. This observation is of major interest and should be confirmed in a larger series. Moreover, the biological rationale for such a mechanism remains to be explored.

By examining cell models transfected with the exon 10 M541L variant, Tamborini *et al* (2006) and Bertucci *et al* (2007) have failed to show that the substitution could result in KIT activation or inactivation and actually corresponded to a KIT polymorphism. Both groups have concluded that the sensitivity of AF to imatinib requires an alternative explanation and possibly involves an autocrine mechanism, possibly associated with a hypersensitivity to SCF, related to the induction of a ligand-independent dimerisation induced by the exon 10 variant. The lack of correlation between expression on IHC and outcome is fully consistent with the previous report by Heinrich *et al*. Interestingly, Tabone-Eglinger *et al* (2008) have shown that GIST-type KIT

mutations induce an activation-dependent alteration of normal maturation and trafficking, resulting in the intracellular retention of the activated kinase within the cell. Imatinib-induced inhibition of the phosphorylation of immature and mature mutant KIT proteins has resulted in the restoration of KIT expression at the cell surface. They conclude that these observations likely account for the absence of correlation between response to imatinib and KIT expression using IHC and may deserve to be investigated in other tyrosine kinase-activated tumours. More recently, another KIT exon 10 mutation possibly linked to imatinib response in AF has been identified, V530I (Kurtz *et al*, 2010).

The only biological parameter correlated with PFS in our patients was pre-treatment lymphopenia, whereas anaemia and PNN count had no predictive value (Figure 1A). Of note, lymphopenia was not found correlated to PS in this series. Imatinib has been previously reported to exert an anti-tumour activity in animal models through the modulation of immune response (Borg *et al*, 2004).

The present observation shows that a baseline biological characteristic of the host, not of the tumour, is the major parameter influencing response to imatinib in aggressive fibromatosis. Tumour characteristics, including the presence of the KIT exon 10 M541L variant, may have influenced tumour control in this small series but this needs to be confirmed and better explained.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from the INCa, the Comités du Rhône et de l'Ain de la Ligue contre le Cancer, and the Conticanet Network of Excellence (FP6-018806).

REFERENCES

- Bertucci F, Gonçalves A, Viens P, Monges G, Dubreuil P (2007) Desmoid-type fibromatosis. *J Neurosurg* **107**: 473–475
- Borg C, Terme M, Taieb J, Menard C, Flament C, Robert C, Maruyama K, Wakasugi H, Angevin E, Thielemans K, Le Cesne A, Chung-Scott V, Lazar V, Tchou I, Crépineau F, Lemoine F, Bernard J, Fletcher JA, Turhan A, Blay JY, Spatz A, Emile JF, Heinrich MC, Mecheri S, Tursz T, Zitvogel L (2004) Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* **114**(3): 379–388
- Dufresne A, Penel N, Salas S, Le Cesne A, Perol D, Bui B, Brain E, Ray-Coquard I, Jimenez M, Blay JY (2009) Updated outcome with long-term follow-up of imatinib for the treatment of progressive or recurrent aggressive fibromatosis: a FNCLCC/French Sarcoma Group phase II trial. ASCO Abstract #10518
- Enzinger FM, Weiss SW (2001) Fibromatosis. In *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors* Sharon Weiss, John R. Goldblum (eds). 4th edn, Mosby: St-Louis, MO
- Fayette J, Dufresne A, Penel N, Le Cesne A, Bui B, Tubiana-Hulin M, Guillemet C, Chabaud S, Jimenez M, Blay JY (2007) Imatinib for the treatment of aggressive fibromatosis/desmoid tumors (AF/DT) failing local treatment: updated outcome and predictive factors for progression free survival. A FNCLCC French Sarcoma Group-GETO study. ASCO Abstract # 10062
- Fiore M, Rimareix F, Mariani L, Domont J, Collini P, Le Pechoux C, Casali PG, Le Cesne A, Gronchi A, Bonvalot S (2009) Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Ann Surg Oncol* **16**: 2587–2593
- Gonçalves A, Monges G, Yang Y, Palmerini F, Dubreuil P, Noguchi T, Jacquemier J, Di Stefano D, Delpero JR, Sobol H, Bertucci F (2006) Response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis. *J Nat Cancer Inst* **98**: 562–563
- Heinrich MC, McArthur GA, Demetri GD, Joensuu H, Bono P, Herrmann R, Hirte H, Cresta S, Koslin DB, Corless CL, Dirnhofer S, Van Oosterom AT, Nikolova Z, Dimitrijevic S, Fletcher JA (2006) Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *J Clin Oncol* **24**: 1195–1203
- Janinis J, Patriki M, Vini L, Aravantinos G, Whelan JS (2003) The pharmacological treatment of aggressive fibromatosis: a systematic review. *Ann Oncol* **14**: 181–190
- Kurtz JE, Asmane I, Voegeli AC, Neuville A, Dufresne A, Litique V, Chevreau C, Bergerat JP (2010) A V530I Mutation in c-KIT Exon 10 Is Associated to Imatinib Response in Extraabdominal Aggressive Fibromatosis. *Sarcoma* **2010**: 458156
- Mace J, Sybil Biermann J, Sondak V, McGinn C, Hayes C, Thomas D, Baker L (2002) Response of extra-abdominal desmoid tumors to therapy with imatinib mesylate. *Cancer* **95**: 2373–2379
- Nuytens JJ, Ryst PF, Thomas CR, Turrisi AT (2000) Surgery vs radiotherapy for patients with aggressive fibromatosis or desmoid tumors. A comparative review of 22 articles. *Cancer* **88**: 1517–1523
- Seinfeld J, Kleinschmidt-Demasters BK, Tayal S, Lillehei KO (2006) Desmoid-type fibromatoses involving the plexus brachial: treatment options and assessment of c-kit mutational status. *J Neurosurg* **104**(5): 749–756
- Tabone-Eglinger S, Subra F, El Sayadi H, Alberti L, Tabone E, Michot JP, Théou-Anton N, Lemoine A, Blay JY, Emile JF (2008) KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* **14**(8): 2285–2294
- Tamborini E, Negri T, Miselli F, Lagonigro MS, Pricl S, Pilotti S (2006) Re: response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis. *J Natl Cancer Inst* **98**: 1583–1584

Case Report

A V530I Mutation in c-KIT Exon 10 Is Associated to Imatinib Response in Extraabdominal Aggressive Fibromatosis

Jean-Emmanuel Kurtz,¹ Irène Asmane,¹ Anne-Claire Voegeli,² Agnès Neuville,³ Armelle Dufresne,⁴ Valère Litique,¹ Christine Chevreau,⁵ and Jean-Pierre Bergerat¹

¹ Pôle d'Hématologie et d'Oncologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67098 Strasbourg, France

² Pôle de Biologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67098 Strasbourg, France

³ Service d'Anatomie pathologique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67098 Strasbourg, France

⁴ Service d'Oncologie Médicale, Centre Hospitalier de Chambéry, 73011, France

⁵ Service d'Oncologie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire, 31052 Toulouse, France

Correspondence should be addressed to Jean-Emmanuel Kurtz, j-emmanuel.kurtz@chru-strasbourg.fr

Received 5 October 2009; Revised 4 January 2010; Accepted 25 January 2010

Academic Editor: Irene Andrulis

Copyright © 2010 Jean-Emmanuel Kurtz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aggressive fibromatosis (AF) or desmoid tumor is a rare condition, characterized by deep tissue invasion by a monoclonal fibroblastic neoplasm, developed from musculoaponeurotic structures. Surgery is the treatment of choice, but negative margins can hardly be achieved in large tumors, and can lead to major functional disability. AF medical therapy includes nonsteroids anti-inflammatory drugs, tamoxifen, with inconsistent results. Several reports of imatinib efficacy in AF appear in the literature. Here, we describe for the first time a V530I *KIT* exon 10 mutant that was associated to a dramatic imatinib response in an extraabdominal aggressive fibromatosis. The previously discovered V530I substitution was characterized in the core binding factor AML, but had never been reported in any other condition, so far. In this paper, we discuss the *KIT* exon 10 mutations or polymorphisms that have been described in a variety of *KIT*-related conditions, including acute myelogenous leukemia, mastocytosis, and aggressive fibromatosis.

1. Case Report

A 22-year-old Caucasian female without any particular medical history suffered from a traumatic fracture of the left humerus great tuberosity in 2002. She underwent a non-operative treatment with a Mayo-Clinic splint and was discharged from the hospital. Radiologic outcome was unremarkable, though she complained with persistent shoulder pain. Three years later, a painful mass of the shoulder rapidly appeared, impairing shoulder mobility. She was referred to our institution. Clinical examination revealed a hard, bulky mass of the shoulder, with collateral circulation. The tumor involved the whole curving contour of the shoulder, and reached the axilla at its posterior limit. Mobilization of the arm was almost impossible due to both pain and stiffness (Figure 1(a)). A shoulder MRI revealed a 12 × 6 cm irregular, heterogeneous mass of the posterior part of the shoulder

(Figure 1(b)). The tumor invaded subcutaneous tissue as well as the deltoid and infraspinatus muscles. Necrotic areas diagnosed as T1-hyposignal were found, as well as other tumor areas that were strongly enhanced by contrast injection. There was no apparent bone destruction. A surgical biopsy was performed, diagnosing aggressive fibromatosis (extraabdominal desmoids tumor).

Due to the tumor burden, curative surgery could not be performed, and a medical therapy consisting in imatinib mesylate (Glivec) was started at a daily dose of 400 mg. After 4 weeks of treatment, the patient noticed an improvement in the abduction of the arm as well as a slight tumor size decrease. The treatment was continued at the same dosing, with consistent improvement in mobility, tumor measurements and analgesics consumption. There was no significant side-effects. The treatment was finally stopped at month 34, in the setting of tumor regression, complete recovery

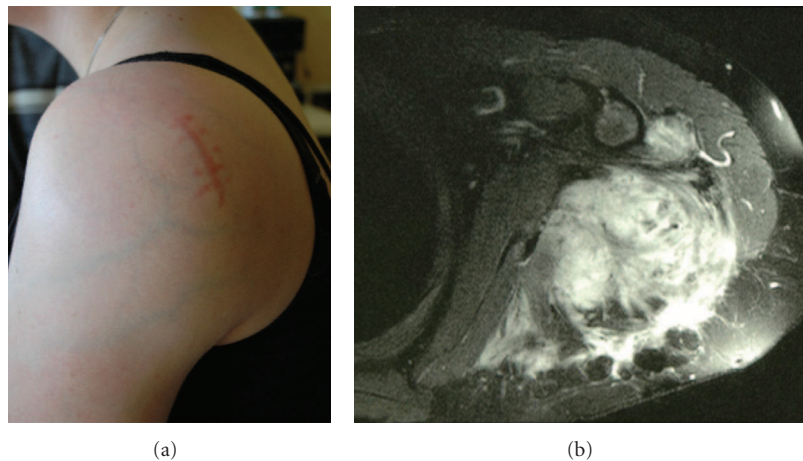


FIGURE 1: Clinical findings at diagnosis. Note the bulky mass of the shoulder with collateral circulation (a). MRI (T1 gadolinium sequences) shows a heterogeneous tumor infiltrating muscles and subcutaneous tissue (b).

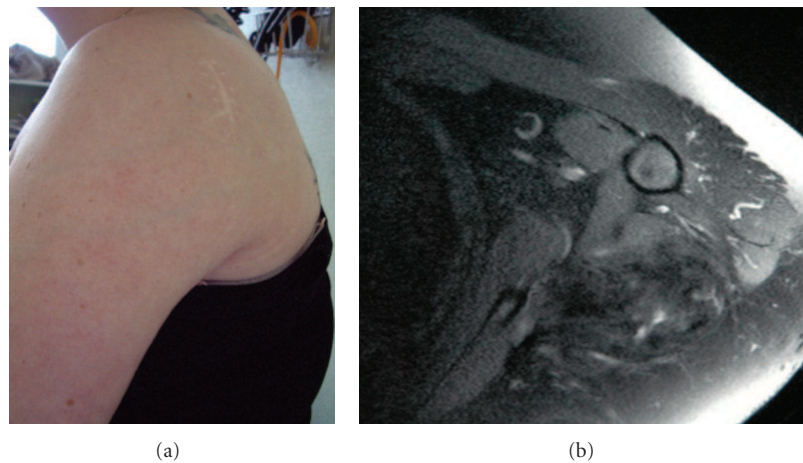


FIGURE 2: Clinical response after Imatinib therapy: Recovery of the whole curving contour of the shoulder, with decrease of collateral circulation (a). MRI findings: T1 gadolinium sequences confirming the tumor very good partial response with disappearance of tumor-related hypersignal (b).

of arm mobility and function and complete discontinuation of analgesics (Figure 2(a)). Control MRI of the shoulder confirmed the very good partial response (Figure 2(b)). At a follow-up of 42 months (1 year off-therapy), the patient remains tumor and symptoms-free, without any tumor regrowth.

In the light of such a dramatic response to imatinib, c-kit exon 10 was fully sequenced from the tumor frozen samples. 50 ng of genomic DNA was amplified by PCR in 50 μ l reaction volume containing 2,5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Forster city, CA), 0,2 mM dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, and 0,2 μ M of the forward and reverse primers 5'-ATCCCATCCTGCCAAAGTT-3' and 5'-CTGTGGGGAGAAAGGGAAA-3', respectively, flanking exon 10. PCR products were verified by electrophoresis, showing a 246 bp amplified fragment, purified by using Microcon-PCR Filter Unit (Millipore, Paris, France) and directly sequenced with the Big Dye Terminator v1.1

Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Forster city, CA). finally the PCR product was analyzed on ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Forster city, CA). The sequences were aligned with the GB sequence of human CKIT (locus HSU63834) using the software Seqscape v2.5 (Applied Biosystems, Forster city, CA). All sequencing reactions were performed in both forward and reverse directions, and the mutation was confirmed by a second sequencing on an independent PCR, revealing a V530I mutation in the transmembrane domain of c-kit (Figure 3).

2. Discussion

Aggressive fibromatosis (AF) is a monoclonal disease, arising from deep musculoaponeurotic structures [1]. In spite of being nonmalignant, the outcome of AF is characterized by local aggressiveness, making curative surgery a difficult

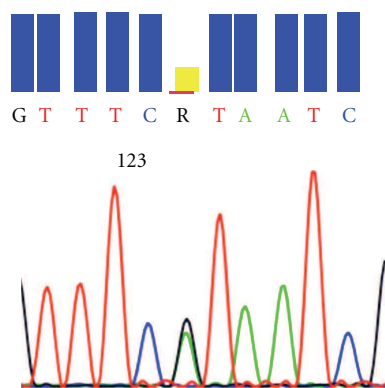


FIGURE 3: *KIT* exon 10 point mutation 1609 G → A (resulting in the amino-acid substitution V530I).

challenge, as patients are exposed to local recurrence. The clinical outcome of AF is unpredictable, and many treatment options have been considered, including surgery, radiation therapy and medical therapy. Systemic medical therapy has focused on NSAIDs such as Sulindac and anti-Cox2 as well as hormonal therapy (tamoxifen) although AF inconsistently express estrogen receptors [2].

The *KIT* gene encodes the stem cell growth factor receptor, a type III transmembrane receptor tyrosine kinase that has been involved in the pathogenesis of various conditions, including gastro-intestinal stromal tumors (GISTs), mastocytosis, acute myelogenous leukemia (AML) as well as piebaldism, a rare autosomal inherited skin disorder. The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec) has become a cornerstone of advanced GIST, in which *KIT* exon 11 mutations are associated with imatinib efficacy, as opposed to these that are present in exon 9 [3]. However, *KIT* exon 10 mutations have not been reported so far in GISTs, as opposed to deletions at the intron10-exon11 boundary that may impact response to imatinib [4].

Imatinib has been incorporated in the therapeutic armamentarium of AF, in the light of several case reports of long-lasting responses [5–8]. However, all AF do not respond to imatinib treatment, as shown in a retrospective analysis of 19 cases of heavily pretreated patients in whom the response rate was only 15.7% (3/19 PR) [8]. Interestingly, it is unlikely that positive *KIT* staining would predict imatinib sensitivity as in this series, most of the cases were *KIT* negative. Molecular determinants of tumor response to tyrosine kinase inhibitors are well known in gastro-intestinal stromal tumors, where *KIT* mutations are predictive for imatinib efficacy [3]. In the retrospective series reported by Heinrich et al., no *KIT* mutation was however found, even in the three responders to imatinib [8]. This data contrasts with previous reports of *KIT* exon 10 point mutation 1621 A → C (resulting in the amino-acid substitution M541L) that could predict imatinib sensitivity [6]. Similar findings were reported in a French Sarcoma Group study, where 3 out of 10 patients experiencing tumor control with imatinib actually had an M541L mutation [9]. Moreover, Seinfeld et al. reported the occurrence of a limited clinical response, again in a M541L

patient [10]. However, contradictory data also appear in the literature. In the light of experiments conducted by Tamborini et al., as well as Bertucci et al., it was hypothesized that the exon 10 M541L variant is not activating neither inactivating and is actually a *KIT* polymorphism [11, 12]. Consistent findings were reported by Krüger et al., who found that the allele frequency of the *KIT* variant M541L was as high as 8.1% in the healthy population, not differing from chronic myelogenous patients (8.3%) [13]. The V530I variant has to our knowledge, never been described so far, in either AF or other *KIT*-related diseases such as mastocytosis, GISTs or piebaldism, [14, 15]. The exon 10 V530I substitution alters the transmembrane domain of *KIT* (contained between amino acids 521–543), and was described in acute myelogenous leukemia [16, 17]. Similar and rare (<5%) exon 10 *KIT*-activating transmembrane mutations such as A533D or F522C have been reported in mastocytosis [15]. *KIT* deletions or insertions appear in 7 to 17% of AML cases (raising to 33% in the setting of chromosome 16 inversion), affecting members of the core binding factor (CBF) gene family [16–18]. In a series of 103 AML patients, those harboring a *KIT* mutation had a shorter event-free and relapse-free survival [18]. There is little data with regard to imatinib therapy in AML patients with CBF *KIT* mutations. In a series of 3 patients, imatinib had transient activity in a patient with exon 8 in-frame deletion, but none in the 2 patients carrying D816Y and D816V mutations [19]. In a series of published by Cortes et al., 18 patients with recurrent or refractory AML or myelodysplastic syndrome were challenged with imatinib, with very transient results [20]. Unfortunately, no *KIT* analysis was performed in this study. A trial investigating dasatinib, another tyrosine kinase inhibitor is currently recruiting AML patients harboring CBF mutations in France. Interestingly, V530I variants were associated, in this condition with a greater imatinib sensitivity, as the IC_{50} was lower than the wild-type *KIT* by a 5-fold factor. Moreover, inhibition of V530I variants resulted in both proliferation abrogation and increased apoptosis in vitro [16]. We have not investigated whether our patient exhibited a germline or a somatic mutation as tissue sampling consisted in tumor biopsy only, and no consent was obtained to test for any germline mutation in our patient who lacked significant familial history of cancer. There is, moreover, no data in the literature supporting the hypothesis that the V530I *KIT* (as opposed to the aforementioned M541L) mutation could be a polymorphism rather than a rare, highly penetrating alteration.

Our patient exhibited a typical medical history of trauma, preceding the onset of AF by an interval of three years, a delay consistent with literature data [2]. There is little data in the literature regarding imatinib treatment duration in AF. Of note, in our case, evidence for treatment efficacy was present as soon as 4 weeks after treatment started. Moreover, imatinib was administered for 3 years as the tumor size constantly decreased during this period. However, and as opposed to the report by Wcislo et al., imatinib was then stopped without subsequent local relapse [7]. In other reports, the duration of imatinib therapy varied between 34 weeks and 16 months [5, 6, 10].

Based on the literature data, as well as this report, it appears mandatory that AF patients be screened not only for M541L substitution, which physiopathology remains at the least, controversial, but should undergo systematic exon 10 sequencing to detect transmembrane variants, such as V530I. Hence, the presence of such a mutation could support front-line imatinib therapy, rather than more classic strategies, including tamoxifen or NSAIDs. Dramatic response to imatinib is clearly associated with this substitution, and provided such a mutation has been detected, not only imatinib can be considered, but also other TK inhibitors, such as sunitinib or others [21]. Whether the V530I variant might successfully be challenged with tyrosine kinase inhibitors other than imatinib is unknown. Growney et al. tried to assess the efficacy of PKC412, a novel tyrosine kinase inhibitor in a variety of *KIT* mutants, including V530I, but this variant could not transform the Ba/F3 cells in their experiment [21]. Interestingly, reports of sunitinib efficacy in imatinib-resistant AF patients appear in the literature, suggesting that as in GISTs, treatment strategies with “rescue” alternate TK inhibitors can be considered in selected patients [22].

References

- [1] B. A. Alman, M. E. Pajerski, S. Diaz-Cano, K. Corboy, and H. J. Wolfe, “Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is a monoclonal disorder,” *Diagnostic Molecular Pathology*, vol. 6, no. 2, pp. 98–101, 1997.
- [2] E. Stoeckle, J. M. Coindre, M. Longy, et al., “A critical analysis of treatment strategies in desmoid tumours: a review of a series of 106 cases,” *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 35, no. 2, pp. 129–134, 2009.
- [3] F. Duffaud and A. Le Cesne, “Imatinib in the treatment of solid tumours,” *Targeted Oncology*, vol. 4, no. 1, pp. 45–56, 2009.
- [4] C. L. Corless, L. McGreevey, A. Town, et al., “KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors,” *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 6, no. 4, pp. 366–370, 2004.
- [5] J. Mace, J. Sybil Biermann, V. Sondak, et al., “Response of extraabdominal desmoid tumors to therapy with imatinib mesylate,” *Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 2373–2379, 2002.
- [6] A. Gonçalves, G. Monges, Y. Yang, et al., “Response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 8, pp. 562–563, 2006.
- [7] G. Wcislo, K. Szarlej-Wcislo, and C. Szczylik, “Control of aggressive fibromatosis by treatment with imatinib mesylate. A case report and review of the literature,” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 133, no. 8, pp. 533–538, 2007.
- [8] M. C. Heinrich, G. A. McArthur, G. D. Demetri, et al., “Clinical and molecular studies of the effect of imatinib on advanced aggressive fibromatosis (desmoid tumor),” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 7, pp. 1195–1203, 2006.
- [9] J. Fayette, A. Dufresne, N. Penel, et al., “Imatinib for the treatment of aggressive fibromatosis/desmoid tumors (AF/DT) failing local treatment: updated outcome and predictive factors for progression free survival. A FNCLCC French Sarcoma Group-GETO study,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 18, supplement, 2007, abstract no. 10062.
- [10] J. Seinfeld, B. K. Kleinschmidt-Demasters, S. Tayal, and K. O. Lillehei, “Desmoid-type fibromatoses involving the brachial plexus: treatment options and assessment of c-KIT mutational status,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 104, no. 5, pp. 749–756, 2006.
- [11] E. Tamborini, T. Negri, F. Miselli, M. S. Lagonigro, S. Pricl, and S. Pilotti, “Re: response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 21, pp. 1583–1584, 2006.
- [12] F. Bertucci, A. Gonçalves, P. Viens, G. Monges, and P. Dubreuil, “Desmoid-type fibromatosis,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 107, no. 2, pp. 473–475; author reply 475, 2007.
- [13] S. Krüger, M. Emig, P. Lohse, G. Ehninger, A. Hochhaus, and H. K. Schackert, “The c-kit (CD117) sequence variation M541L, but not N564K, is frequent in the general population, and is not associated with CML in Caucasians,” *Leukemia*, vol. 20, no. 2, pp. 354–355, 2006.
- [14] X.-Y. Yin, Y.-Q. Ren, S. Yang, et al., “A novel KIT missense mutation in one Chinese family with piebaldism,” *Archives of Dermatological Research*, vol. 301, no. 5, pp. 387–389, 2009.
- [15] A. Orfao, A. C. Garcia-Montero, L. Sanchez, and L. Escribano, “Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations,” *British Journal of Haematology*, vol. 138, no. 1, pp. 12–30, 2007.
- [16] J. Cammenga, S. Horn, U. Bergholz, et al., “Extracellular KIT receptor mutants, commonly found in core binding factor AML, are constitutively active and respond to imatinib mesylate,” *Blood*, vol. 106, no. 12, pp. 3958–3961, 2005.
- [17] M. Gari, A. Goodeve, G. Wilson, et al., “c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia,” *British Journal of Haematology*, vol. 105, no. 4, pp. 894–900, 1999.
- [18] N. Boissel, H. Leroy, B. Brethon, et al., “Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML),” *Leukemia*, vol. 20, no. 6, pp. 965–970, 2006.
- [19] R. Cairoli, A. Beghini, E. Morello, et al., “Imatinib mesylate in the treatment of Core Binding Factor leukemia’s with KIT mutations: a report of three cases,” *Leukemia Research*, vol. 29, no. 4, pp. 397–400, 2005.
- [20] J. Cortes, F. Giles, S. O’Brien, et al., “Results of imatinib mesylate therapy in patients with refractory or recurrent acute myeloid leukemia, high-risk myelodysplastic syndrome, and myeloproliferative disorders,” *Cancer*, vol. 97, no. 11, pp. 2760–2766, 2003.
- [21] J. D. Growney, J. J. Clark, J. Adelsperger, et al., “Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412,” *Blood*, vol. 106, no. 2, pp. 721–724, 2005.
- [22] K. M. Skubitz, J. C. Manivel, D. R. Clohisey, and J. W. Frolich, “Response of imatinib-resistant extra-abdominal aggressive fibromatosis to sunitinib: case report and review of the literature on response to tyrosine kinase inhibitors,” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 64, no. 3, pp. 635–640, 2009.

Impact of *KIT* exon 10 M541L allelic variant on the response to imatinib in aggressive fibromatosis: analysis of the desminib series by competitive allele specific Taqman PCR technology

Armelle Dufresne^{1,2}, Laurent Alberti¹, Mehdi Brahmi¹, Héloïse Philippon¹, David Pérol³, Jean Yves Blay^{1,2}

1. Cancer Research Center of Lyon, INSERM UMR 1052, CNRS UMR 5286; 2. Medical Oncology Department; 3. Biostatistics unit
Anticancer Center Leon Berard, Lyon, France

This study was funded by grant from the Institut National du Cancer (INCa)

Corresponding author:

Dr Armelle Dufresne, MD, Cancer Research Center of Lyon, INSERM UMR 1052, CNRS UMR 5286; Centre Leon Berard, 28 rue Laënnec, Lyon, France; e-mail: a.dufresne@hotmail.com; phone: + 33 4 78 78 28 28, fax: + 33 4 78 78 27 20

Abstract

Aggressive fibromatosis (AF) is a rare fibroblastic proliferative disease with a locally aggressive behaviour and no distant metastasis, characterized by driver mutations in *CTNNB1* or in *APC* gene. When progressive and/or symptomatic AF is not amenable to local management, a variety of medical treatments may be efficient, including imatinib mesylate. The phase II “Desminib trial” included 40 patients with AF to evaluate the toxicity and efficacy of imatinib and conclude to a 65% tumor control rate at 1 year. We investigated a potential predictive value of *KIT* exon 10 M541L variant (*KIT*^{L541}) on this prospective series. DNA was extracted in sufficient quantity for 33 patients included in the Desminib trial. The detection of *KIT*^{L541} was performed by Competitive Allele-Specific Taqman® PCR technology. *KIT* allele status was analyzed regarding clinical presentation and patient outcome. In 6 of 33 cases (18%), the technique failed to conclude to the mutational status; 5 patients (19%) harboured *KIT*^{L541} and 22 patients (81%) were classified as *KIT* wild type. Compared with total cohort, *KIT*^{L541} was observed at similar frequencies according to clinical characteristics. In the *KIT*^{L541} and the *KIT*^{WT} subgroups, the tumor control rate at 1 year was 100% and 68%, respectively ($p = 0,316$). The median PFS of patients harbouring *KIT*^{L541} or not is 29,9 and 24,5 months, respectively ($p = 0,616$), and the median overall survival is not reached, in any of the groups. Our results do not support a predictive effect of *KIT*^{L541} in the efficacy of imatinib for patients with AF.

Introduction

Aggressive fibromatosis (AF) is a rare fibroblastic proliferative disease characterized by driver mutations in *CTNNB1*, at specific sites of the exon 3, or in the *APC* gene (in the context of Gardner syndrome). The management of aggressive fibromatosis has substantially evolved in the last 10 years [1]. AF are characterized by an aggressive local behaviour, yet unpredictable, with a risk of relapse after surgical excision but a lack of distant metastasis. These tumors are characterized by heterogeneity in their clinical presentation with an unpredictable clinical course. The classical strategy of aggressive front-line therapy with surgery and radiotherapy is now debated and a wait-and-see policy at initial presentation is now often proposed (NCCN 2012 Guidelines) [2]. Systemic treatments such as non steroid anti inflammatory drugs (NSAIDs), hormonal treatment, cytotoxic chemotherapy, imatinib, or sorafenib are often used to control tumor growth and/or to relieve symptomatic AF, all with moderate and variable efficacy [3-8]. This observation raises the need to identify biomarkers, to effectively select patients who benefit from a treatment.

In 2 prospective series of patients treated with imatinib, progression free survival (PFS) was 66% and 67% at 1 year [7, 8]. The phase II “Desminib trial” included 40 patients to evaluate the toxicity and efficacy of imatinib mesylate administered to patients with AF not amenable to radiotherapy or non-mutilating surgery. The results showed a disease control by imatinib in a large proportion of patients with 4 (10%) complete or partial confirmed responses and 28 (70%) stable disease as best response, leading to a 1 year PFS of 67% [7].

KIT is one of the major target of imatinib; mutations of *KIT* predicts for the efficacy of the drug in GIST [9], but also in melanoma and thymic carcinoma [10, 11]. Several cases reports have suggested a potential role of the *KIT* exon 10 M541L variant (*KIT*^{L541}) in sensitivity of AF to imatinib [12, 13]. The present study was conducted on Desminib series to search for a potential predictive value of *KIT*^{L541}.

Material and methods

Patients

This study was performed as a retrospective translational research program on tumor samples of patients included in Desminib trial [7]. Forty patients with progressive or recurrent AF that could not be treated with curative surgery or radiotherapy were included in Desminib phase I/II trial to evaluate the efficacy and toxicity of imatinib. Patients with adequate end organ function were treated with 400mg of imatinib daily, increasing to 800mg in case of progressive disease. Best clinical response to imatinib was defined according to RECIST criteria. Evaluations were performed every 3 months. All evaluations of tumor responses to imatinib were reviewed by a radiological independent validation committee. Informed consent was obtained from each patient to enroll them in the study and collect archival pathology specimens.

Tissue samples

The analysis of present study was performed on the initial tumor of patients, obtained by biopsy or surgical excision to establish the diagnosis of the disease. Paraffin-embedded tissues samples of patients included in the study were obtained from pathology centers, all from tumors at initial diagnosis.

DNA extraction

Total DNA was extracted from tumor using QIAamp DNA kit N° 56404 (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions and quantified by spectrophotometry (NanoDrop ND-100 instrument, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Briefly, FFPE tumours were lysed for 24h in ATL buffer supplemented with proteinase K at 60°C in rotative agitation

after different washes with toluene and ethanol, in this order. Genomic DNA was isolated with a QIAamp MiniElute column.

Competitive Allele-Specific Taqman[®] PCR (CAST-PCR)

The detection of *KIT*⁵⁴¹ status was performed by Competitive Allele-Specific Taqman[®] PCR technology provided by Applied Biosystems[®] (Fig. 1). Each mutant allele assay detects specific mutant alleles. Each assay contains: an allele-specific primer that detects the mutant allele, a MGB oligonucleotide blocker that suppresses the wild type allele, a locus specific primer and a locus specific TaqMan[®] FAM[™] dye-labeled MGB probe. Gene reference assays detect the genes that the target mutations reside in. They are designed to amplify a mutation-free and polymorphism-free region of the target gene. Each assay contains: a locus-specific pair of forward and reverse primers and a locus specific TaqMan[®] FAM[™] dye-labeled MGB probe.

In a mutation detection experiment, a sample of unknown mutation status is run in individual real-time PCRs with one assay that target mutant alleles within a gene and the corresponding gene reference assay. After amplification, the Ct (Cycle threshold) values are determined by the Applied Biosystems[®] real-time PCR instrument software, the Ct value of each mutant allele assay and the Ct value of the gene reference assay.

A mutation is detected in the DNA sample if $Ct_{mut} < 38$ AND $Ct_{rf} < 35$. If $Ct_{mut} > 38$ and/or $Ct_{rf} > 35$, the software classifies the gDNA sample as mutation not detected; the sample is either mutation negative, or below the limit of detection for the TaqMan[®] Mutation Detection Assays. Ct was also determined for exogenous IPC (Internal Passive Control) reagents added to each reaction to evaluate PCR failure or inhibition in a reaction.

qPCR conditions

qPCR run were performed in 96-well plate, in a final volume of 20µl in each well containing 10µL of 2X Taqman Genotyping Mastermix (Applied Biosystems), 0.4µL of 500X Exogenous IPC template DNA, 2µL of 10X Exogenous IPC mix, 2µL of each primer (*KIT*^{L541} and Reference), 1.6µL of deionized water and 20 ng of DNA (in 4µL). Runs were performed on the ViiA™ 7 Real-Time PCR System using the following set of reaction conditions: 95°C 10:00 [92°C 00:15; 58°C 01:00] 5 [92°C 00:15; 60°C 01:00] 40.

***KIT*⁵⁴¹ validation**

For 10 patients among the 33 patients tested by CAST PCR, the determination of *KIT* exon 10 status was also determined by sequencing. Sequencing method has been completely described in previous publication [14].

Statistical analysis

Statistics were performed by using R software. Chi-2 analyses were performed in order to search for a correlation between *KIT* status and tumor response. Progression free and overall survival of patients harboring or not *KIT*^{L541} variant were compared by log-rank test after Kaplan-Meier analysis.

Results

DNA was obtained in sufficient quantity for 33 of the 40 patients included in the Desminib trial. Characteristics of these patients and their tumor sample are presented in the table 1. The clinical characteristics of patients are similar to those describe in the literature, with a majority of female patients, a median age at diagnosis in the 5th decade, and patients presenting mainly large tumors. The FFPE blocks had been made from 7 to 15 years.

Among the 33 samples tested, 6 had $Ct_{rf} > 35$ were considered non-informative (4 among these 6 patients had tissue sample fixed in Bouin). The values of Ct_{mut} and Ct_{rf} are presented in the chart (Fig. 2) for the 27 evaluable patients. Five patients (19%) had $Ct_{mut} < 38$ AND $Ct_{rf} < 35$ and were considered to harbour KIT^{L541} ; 22 patients (81%) $Ct_{mut} > 38$ AND $Ct_{rf} < 35$ were classified as KIT wild type (KIT^{WT}) status.

Ten patients of the cohort had double determination of KIT status by sequencing and CAST-PCR. Figure 3 presents the determination of KIT status by the 2 methods for 1 case harbouring KIT^{L541} and 1 case harbouring KIT^{WT} .

The distribution of clinical characteristics among the 5 patients harbouring KIT^{L541} is not different of that of the entire cohort. In this subgroup, there is 3 female and 2 male, with a median age at diagnosis of 48 years. The tumor is extra abdominal in 3 cases and located in the abdominal wall in 2 cases with median tumor size of 70 mm [60-189].

The table 2 presents the distribution of objective response according to KIT status. Among the 22 patients harbouring KIT^{WT} status, 4 patients and 7 patients presented progressive disease at 6 months and 1 year, respectively, compared to no progressive disease at 1 year among the 5 patients harbouring KIT^{L541} . By Chi-2 analysis, the presence of KIT^{L541} was not statistically associated with objective response observed at 6 months or at 1 year.

The median progression-free survival (PFS) of patients harbouring KIT^{L541} and KIT^{WT} is 29,9 and 24,5 months ($p = 0,616$), respectively and the median overall survival (OS) is not reached, for both group (Fig. 4).

Discussion

The identification of a reliable biomarker to predict for treatment efficacy would be useful for the management of AF patients. Whether *KIT*⁵⁴¹ status predicts for response to imatinib in AF had been suggested by previous single case studies. In 2010, we failed to precisely determine the biological mechanisms involved in this efficacy but suggest, as others, a possible role of KIT exon 10 M541L variant in the sensitivity of AF to imatinib mesylate [14]. Our conclusions were limited by the small cohort analysed (10 patients), mainly due to the difficulty to extract sufficient quality and quantity DNA material from FFPE samples to perform sequencing. Taking advantage of the technological improvement, this biomarker could be tested in 2012 in the Desminib phase II trial designed to evaluate the activity of imatinib mesylate for patients with AF not amenable to local treatment.

Quantitative PCR (Q-PCR) technologies are quickly and largely developing, sustained by their simplicity to generate robust data. It has already been established that Q-PCR methods present several advantages, compared with classical sequencing [15]. The use of Taqman-minor-groove-binder (Taqman-MGB) technology is more efficient and more accurate than sequencing. Its selectivity ranges from 1 to 10% according to the level of fragmentation of DNA (25-30% for sequencing). It is an easy one-step method, fast, requiring only basic expertise and less than 2 fold more expensive than sequencing.

Because of these numerous advantages, publications using this method have increasingly increased. The “MIQE précis” (minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments) were applied to the present study to ensure its quality [16]. The superiority of Q-PCR methods on classical sequencing has been especially established in case of unfavorable FFPE-DNA. Fixation, embedding and extraction methods may lead to the degradation and fragmentation of nucleic acid, but remains the most frequent storage condition of tissue samples. Q-PCR methods use small amplicon size allowing to

partially by-pass this problem of fragmented DNA. This is why Q-PCR method was chosen in our study based on FFPE sample embedded from 7 to 15 years earlier.

It has already been demonstrated that Competitive Allele Specific Taqman (CAST) PCR allows efficient amplification of nucleic acids from FFPE samples [17]. It was adapted to analyze FFPE samples of Desminib trial since AF have a low cellular density, and with DNA quality deteriorated by FFPE conditions of preservation. Moreover, AF tissues are characterized by extracellular fibrous matrix known to inhibit PCR reactions. Indeed, the efficiency of the CAST PCR method was confirmed in our context of FFPE of AF with the validation of CAST PCR results by classical sequencing on 10 cases and allows us to determine the KIT exon 10 mutational status in 33 cases.

Statistical analyses failed to demonstrate any correlation between KIT^{541} status and objective response at 6 and 12 months or survival while treatment with imatinib mesylate. However, it seems important to note that no patient with tumor harbouring KIT^{L541} presented progressive disease at 6 or 12 months, as compared to 4 and 7 patients presenting progressive disease at 6 and 12 months, respectively, in the KIT^{WT} cohort. Based on these results, KIT^{L541} was not found to be a predictive biomarker for the efficacy of imatinib mesylate, but it must be noted that the power of the study remained limited by the small size of the cohort; similar study is ongoing in the lab on gastro intestinal stromal tumors.

Multiple activating *KIT* mutations have been described in the extra and intra cellular domain of the receptor. Few mutations have been described in the transmembrane domain encoded by exon 10, and one recently reported was associated with response to imatinib [18]. The predictive value of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) has not been reported, even though several reports show that the KIT^{L541} variant may provide a positive signal in different diseases. Foster and Rocha reported the presence of KIT^{L541} in 5 patients with mastocytosis, in 2 pairs of twins (children) and in 1 adult, respectively [19, 20]. Foster combined this clinical

observation to *in vitro* analysis demonstrating that FDC-P1 cells transfected with KIT^{L541} showed an enhanced proliferative response, only to low levels of stem cell factor (SCF) ($\leq 6,25$ ng/ml), but did not confer factor independence. KIT^{L541} cells were also around 2-fold more sensitive to imatinib than those expressing KIT^{WT} . Inokuchi et al. explored the role of KIT^{L541} in chronic myelogenous leukemia (CML) patients [21]. They first observed a statistically significant higher frequency of the variant in patients (6/80, 7.5%) than in healthy control (1/68, 1.5%; $p < 0.05$, Fisher's exact test), partly due to newly occurring mutation at blastic crises. They also performed *in vitro* experiments on KIT^{L541} Ba/F3 cells showing that tyrosine kinase activation and proliferative response of KIT^{L541} cells was slightly higher than KIT^{WT} in medium containing 0,1 ng/ml of SCF. Krüger et al. were not able to confirm these results screening 102 CML patients and 166 healthy controls in Caucasian population [22]. They found no differences in the allele frequencies for KIT^{L541} variant among patients (16/102, 15.7%) and controls (26/166, 15.7%). Grabellus et al. also detect no difference in genotype frequency of KIT^{L541} in cases of AF (7/42, 16.7%) compared with healthy population (26/166, 15.7%) [23]. As expected for a SNP, they also detected KIT^{L541} variant in adjacent non-neoplastic tissue (muscle) in 4 of 4 KIT^{L541} positive cases with normal tissue available. The authors concluded to the characterization of KIT^{L541} as a SNP devoided of functional importance or role in tumorigenesis in AF.

Conclusion

Our results confirm the efficiency of CAST-PCR as a reliable Q-PCR method to determine mutational status. Our analyses do not support a predictive value of KIT^{L541} in efficacy of imatinib for patients with AF. The significance of KIT^{L541} variant remains unclear.

References

- 1- Bonvalot S, Desai A, Coppola S, Le Péchoux C, Terrier P, Dômont J, et al. The treatment of desmoid tumors: a stepwise clinical approach. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 10:x158-66.
- 2- von Mehren M, Benjamin RS, Bui MM, Casper ES, Conrad EU 3rd, DeLaney TF, et al. Soft tissue sarcoma, version 2.2012: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw.* 2012;10:951-60.
- 3- Garbay D, Le Cesne A, Penel N, Chevreau C, Marec-Berard P, Blay JY, et al. Chemotherapy in patients with desmoid tumors: a study from the French Sarcoma Group (FSG). *Ann Oncol.* 2012;23:182-6.
- 4- Gega M, Yanagi H, Yoshikawa R, Noda M, Ikeuchi H, Tsukamoto K, et al. Successful chemotherapeutic modality of doxorubicin plus dacarbazine for the treatment of desmoid tumors in association with familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol.* 2006;24:102-5.
- 5- Hansmann A, Adolph C, Vogel T, Unger A, Moeslein G. High-dose tamoxifen and sulindac as first-line treatment for desmoid tumors. *Cancer* 2004;100:612-20.
- 6- Gounder MM, Lefkowitz RA, Keohan ML, D'Adamo DR, Hameed M, Antonescu CR, et al. Activity of Sorafenib against desmoid tumor/deep fibromatosis. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4082-90.
- 7- Penel N, Le Cesne A, Bui BN, Perol D, Brain EG, Ray-Coquard I et al. Imatinib for progressive and recurrent aggressive fibromatosis (desmoid tumors): an FNCLCC/French Sarcoma Group phase II trial with a long-term follow-up. *Ann Oncol* 2011;22:452-457.
- 8- Chugh R, Wathen JK, Patel SR, Maki RG, Meyers PA, Schuetze SM, et al.; Sarcoma Alliance for Research through Collaboration (SARC). Efficacy of imatinib in aggressive fibromatosis: Results of a phase II multicenter Sarcoma Alliance for Research through Collaboration (SARC) trial. *Clin Cancer Res* 2010 ;16:4884-4891.

- 9- Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 2003;21:4342-9.
- 10- Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol.* 2011;29:2904-9.
- 11- Schirosi L, Nannini N, Nicoli D, Cavazza A, Valli R, Buti S, et al. Activating c-KIT mutations in a subset of thymic carcinoma and response to different c-KIT inhibitors. *Ann Oncol.* 2012;23:2409-14.
- 12- Gonçalves A, Monges G, Yang Y, Palmerini F, Dubreuil P, Noguchi T et al. Response of a KIT-positive extra-abdominal fibromatosis to imatinib mesylate and KIT genetic analysis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:562-563.
- 13- Seinfeld J, Kleinschmidt-Demasters BK, Tayal S, Lillehei KO. Desmoid-type fibromatoses involving the brachial plexus: treatment options and assessment of c-KIT mutational status. *J Neurosurg* 104:749-756, 2006
- 14- Dufresne A, Bertucci F, Penel N, Le Cesne A, Bui BN, Tubiana-Hulin M et al. Identification of biological factors predictive of response to imatinib mesylate in aggressive fibromatosis. *Br J Cancer* 2010;103:482-5.
- 15- Kotoula V, Charalambous E, Biesmans B, Malousi A, Vrettou E, Fountzilas G, et al. Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics. *PLoS One* 2009;4:e7746.
- 16- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol.* 2010;11:74.

- 17- Didelot A, Le Corre D, Luscan A, Cazes A, Pallier K, Emile JF, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol*. 2012;92:275-80.
- 18- Kurtz JE, Asmane I, Voegeli AC, Neuville A, Dufresne A, Litique V, et al. A V530I Mutation in c-KIT Exon 10 Is Associated to Imatinib Response in Extraabdominal Aggressive Fibromatosis. *Sarcoma* 2010;458156
- 19- Foster R, Byrnes E, Meldrum C, Griffith R, Ross G, Upjohn E, et al. Association of paediatric mastocytosis with a polymorphism resulting in an amino acid substitution (M541L) in the transmembrane domain of c-KIT. *Br J Dermatol*. 2008;159:1160-9.
- 20- Rocha J, Luz Duarte M, Marques H, Torres F, Tavares P, Silva A, et al. Association of adult mastocytosis with M541L in the transmembrane domain of KIT. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010;24:1118-9.
- 21- Inokuchi K, Yamaguchi H, Tarusawa M, Futaki M, Hanawa H, Tanosaki S et al. Abnormality of c-kit oncoprotein in certain patients with chronic myelogenous leukemia--potential clinical significance. *Leukemia* 2002;16:170-7.
- 22- Krüger S, Emig M, Lohse P, Ehninger G, Hochhaus A, Schackert HK. The c-kit (CD117) sequence variation M541L, but not N564K, is frequent in the general population, and is not associated with CML in Caucasians. *Leukemia*. 2006;20:354-5.
- 23- Grabellus F, Worm K, Sheu SY, Siffert W, Schmid KW, Bachmann HS. The prevalence of the c-kit exon 10 variant, M541L, in aggressive fibromatosis does not differ from the general population. *J Clin Pathol* 2011;64:1021-24.

Tables and figures

Table 1 Characteristics of the 33 patients and their FFPE sample analysed (%)

Patients		n = 33
Gender	Male	11 (33)
	Female	22 (67)
Median age at diagnosis [range], years		40 [20-72]
Tumor location	Intra abdo	6 (18)
	Abdo wall	3 (9)
	Extra abdo	24 (73)
Median tumor size [range], mm		100 [25-220]
Familial Adenomatous Polyposis	yes	5 (15)
	no	28 (85)
Performans status	0	22 (67)
	1	8 (24)
	2	1 (3)
	Unknown	2 (6)
Median TTP [range], months		24.6 [2.8-42.3]
FFPE sample		
Block age	1997-1999	11 (33%)
	2000-2005	22 (66%)
Mean DNA quantity [range], ng/μl		782,14 [106,42-1748,86]
Mean A260/280 ratio [range]		1,98 [1,76-2,05]

Table 2 Distribution of objective response observed at 6 months and 1 year according to *KIT* status.

	<i>KIT</i> ^{WT} (n=22)	<i>KIT</i> ^{L541} (n=5)	Chi 2
Response at 6 months			
CR/PR	3	1	
SD	15	4	
PD	4	0	
			p = 0,57683407
Response at 1 year			
CR/PR	2	1	
SD	13	4	
PD	7	0	
			p = 0,31614938

Figure 1 In Competitive Allele-Specific Taqman® PCR technology, each mutant allele assay detects specific mutant alleles and a blocker suppresses the wild type allele

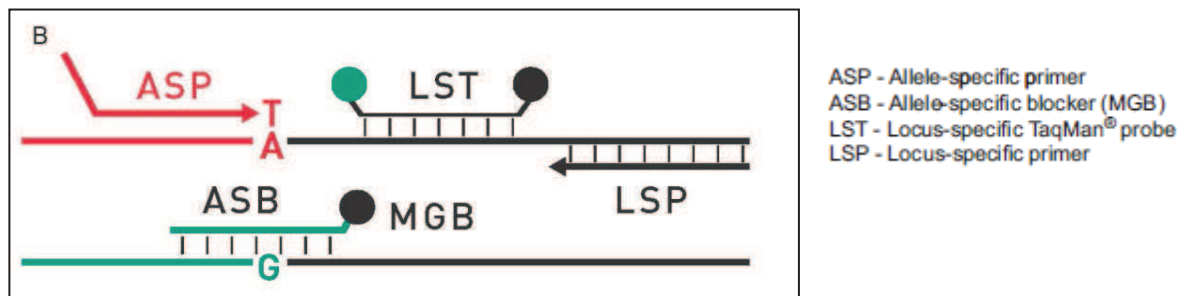


Figure 2 For each evaluable patient, the cross represents Ct_{rf} and the point represents Ct_{mut} . Bars correspond to ΔCt . Surrounded bars correspond to cases KIT^{L541} . Others bars correspond to cases KIT^{WT} .

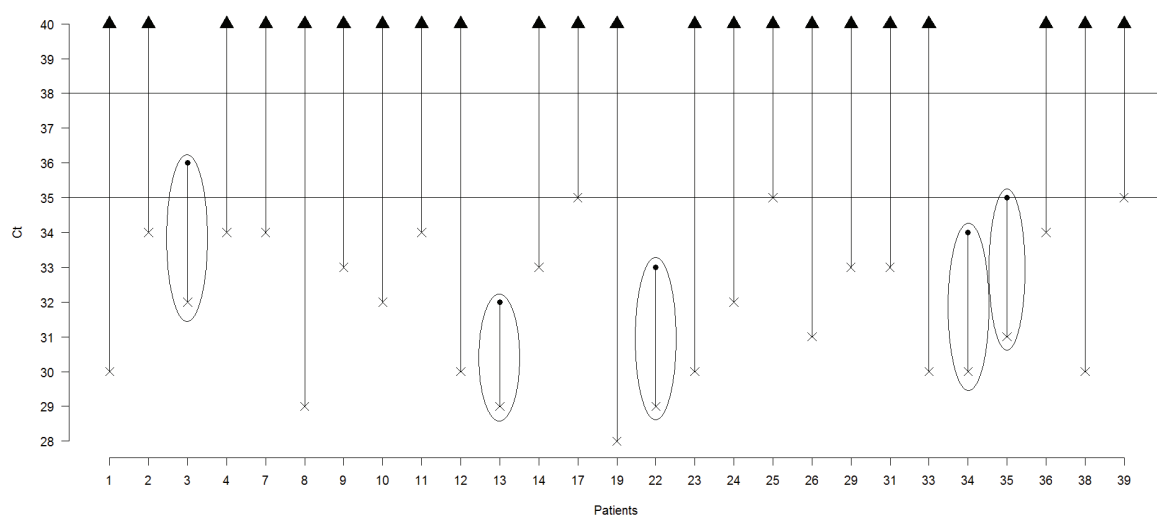
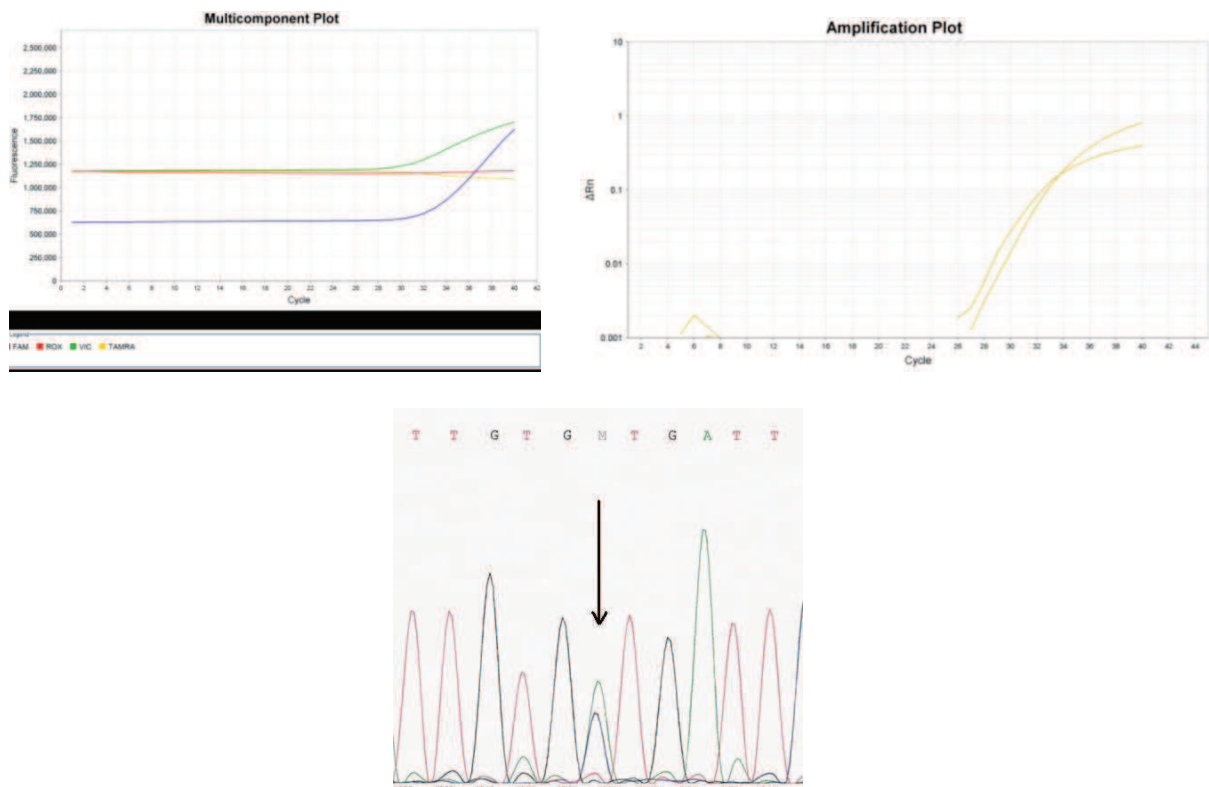
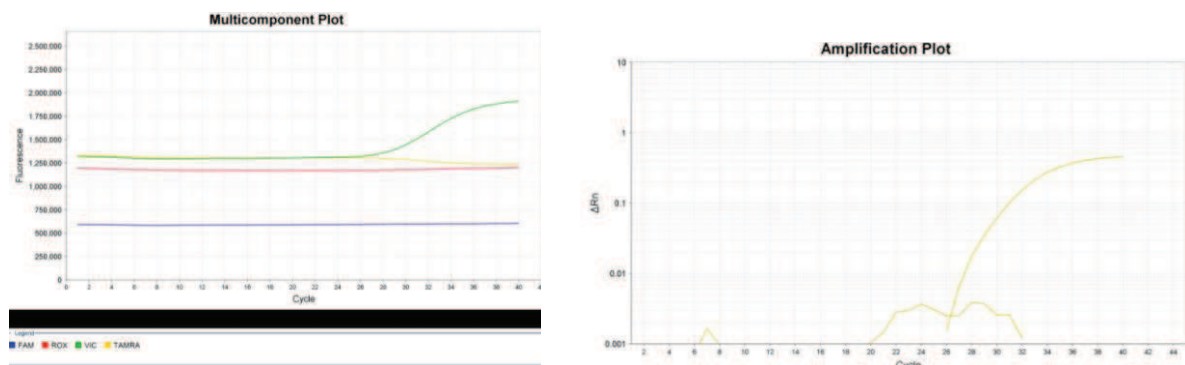


Figure 3 Determination of *KIT* status by the 2 methods (sequencing and CAST PCR) for 1 case harbouring *KIT*^{L541} and 1 case harbouring *KIT*^{WT}. (A) Representative multicomponent and amplification plots and sequencing of *KIT*^{L541} (B) Representative multicomponent and amplification plots and sequencing of *KIT*^{WT}

A



B



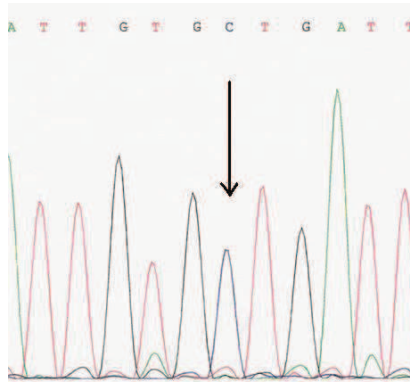
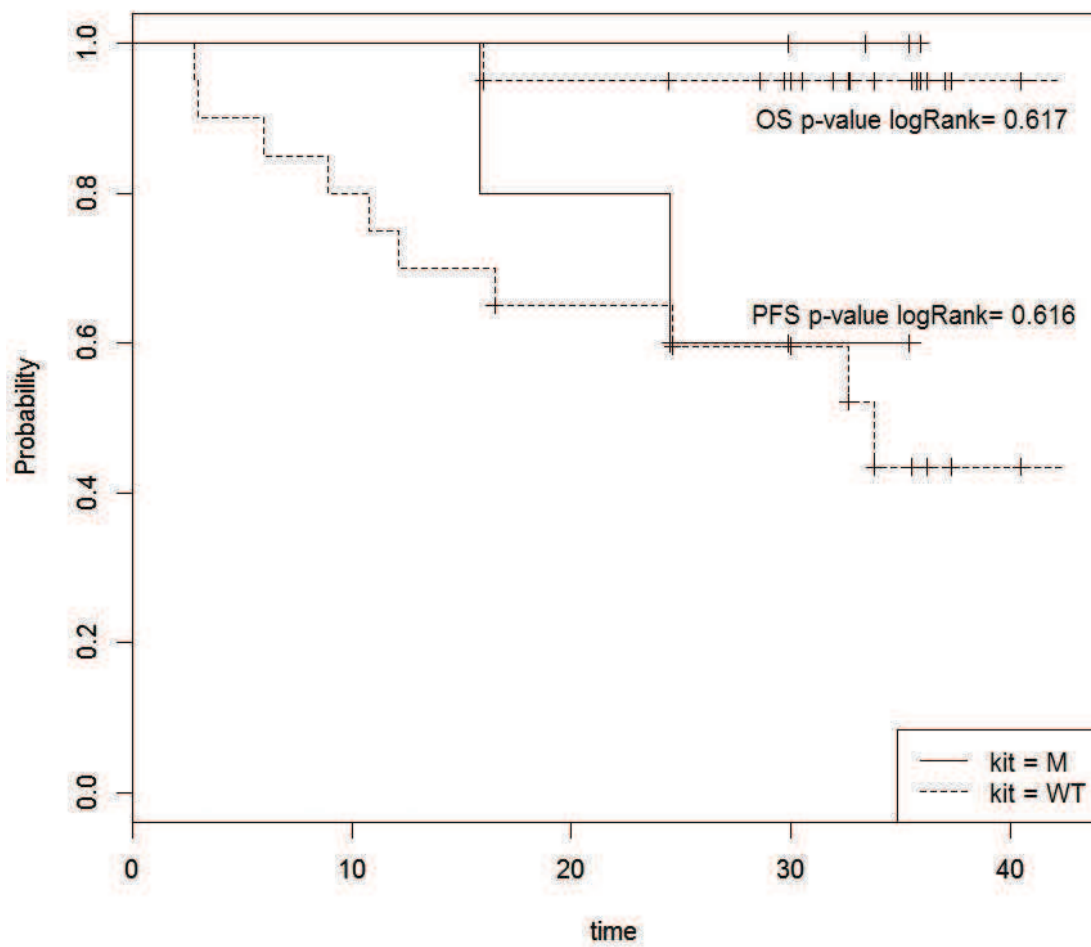


Figure 4 Log-rank analysis of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) for patients with (M) and without (WT) *KIT*^{L541} variant in phase II Desminib trial



Prediction of desmoid tumor progression using miRNA expression profiling

A. Dufresne, M. Paturel, L. Alberti, H. Philippon, A. Duc, AV Decouvelaere, P. Cassier, JY Blay

Abstract

Rationale Desmoid tumor (DT) is a rare connective tissue tumor with locoregional aggressiveness but unpredictable behaviour. MicroRNAs are noncoding small RNA controlling the expression of a variety of genes and whose expression is deregulated in many cancers. This study was conducted to define the predictive and/or prognostic value of miRNA expression profile in DT.

Material and methods RNA was extracted from paraffin-embedded tissues sections of DT of 41 patients included in two distinct cohorts: a cohort of 26 patients included in the Desminib phase II trial and an independent validation cohort of 15 patients with DT diagnosed in Leon Berard Cancer Center. The miRNA profile was determined by Taqman Low Density Array from 500 nanograms of total RNA. Supervised and unsupervised analyses were performed on the 2 cohorts.

Results Predictive and prognostic supervised analysis on the Desminib cohort failed to identify miRNAs differentially expressed between progressive and non-progressive patients under imatinib treatment and between progressive and non-progressive patients after discontinuation of imatinib, respectively. An unsupervised hierarchical clustering of Desminib cohort identified however 2 groups (A and B) of 13 patients each. Only the number of previous lines of treatment before inclusion in the study was significantly different between the 2 groups ($p = 0.0387$). Time to progression after discontinuation of imatinib is longer in group B than in group A ($p = 0.05$). Fifteen miRNAs were highly statistically differentially expressed between groups A and B, targeting more than 3000 genes (whose *AGO1*, *BCL2*, *CDK6*, *SMAD4*, *PTEN*, *CCND1*, *VEGFA*, *RBI* targeted by at least 3 miRs). These results were confirmed on the independent validation cohort: hierarchical clustering of these 15 miRs identified 2 groups, whose time to recurrence is statistically different (28.8 months vs 68.8 months; $p = 0.0213$).

Conclusion These results bring the first demonstration of the prognostic value of miRNA expression profile with a possible direct impact on the management of patients. The next objective is to validate a precise miRNA signature in a prospective cohort to select patients that do not benefit at all from surgical resection of their tumor and should be simply monitored.

Introduction

Desmoid tumor (DT), also known as “aggressive fibromatosis”, is a rare fibroblastic proliferative disease affecting about 2 to 4 persons per million per year [1]. Majority of DT arise in a sporadic form related to *CTNNB1* (β catenin gene) mutation [2]. DT may also occur in the context of predisposing genetic condition called Gardner’s syndrome, characterized by germline mutations of the *APC* gene and associated with familial adenomatous polyposis (FAP) or also as rare forms of familial FAP [3]. Approximately 50% of DT occurs in the extremities, other main locations being the trunk wall and mesentery [4]. These tumors never metastasize and are considered as locally malignant tumors, with unpredictable behavior; while it remains indolent in some patients, it also may involve nervous, vascular or muscular structures leading to serious symptoms or even causing patient death in some cases (especially with intra abdominal location).

Surgical resection of the tumor has been the mainstay treatment when planned surgery does not imply serious functional and/or aesthetical sequelae. Nevertheless, spontaneous stabilizations or regressions are regularly seen. Furthermore, despite initial surgical excision of quality (R0 or R1 resection), recurrences are common (> 40%). A current debate calls into question the utility of surgery as a treatment of these tumors. A retrospective study evaluating a front-line conservative approach (no surgery and no radiotherapy) by watch-and-wait policy or use of systemic treatment has resulted in prolonged progression-free survival in a substantial proportion of patients ($\approx$ 50%) [5]. The authors failed to determine prognostic factors to select patients who benefit from this strategy. Recently, NCCN updated its guidelines on Soft Tissue Sarcoma including “observation as an option for patients with resectable desmoid tumors that are small and asymptomatic, not causing morbidity, pain, or functional limitation”. [6]

Micro-RNAs (miRNAs) are noncoding small RNA molecules synthesized from intronic regions with a size range from 16 to 35 nucleotides. They are processed by specific complexes of proteins containing Drosha and Dicer to be matured and finally integrated in RISC complexes. Mature miRNAs match with complementary sequences in messenger RNAs resulting in translation inhibition and accelerated mRNA degradation [7]. miRNA expression is deregulated in many cancers, resulting in a tumor miRNA signature, which could be useful for their classification in line with their tissue origin and molecular alterations. Thus, they currently constitute potent diagnosis and/or prognosis biomarkers with their tissue specificities and their involvement in oncogenic process.

This study was conducted to define the potential predictive and/or prognostic value of miRNA expression profile of DT to identify rapidly progressing and non progressing patients.

Material and methods

Patients

This study was performed as a retrospective translational research program on tumor samples of patients included in Desminib trial [8]. Forty patients with progressive or recurrent DT that could not be treated with curative surgery or radiotherapy were included in Desminib phase I/II trial to evaluate the efficacy and toxicity of imatinib. Patients with adequate end organ function were treated with 400mg of imatinib daily, increasing to 800mg in case of progressive disease. Best clinical response to imatinib was defined according to RECIST criteria. Evaluation was performed every 3 months. All the tumoral evaluations under treatment but two have been reviewed by a radiological independent validation committee.

Informed consent was obtained from each patient to enroll them in the study and collect archival pathology specimens.

A second cohort, completely independent from the first one, was established from 15 patients with relapsing and non-relapsing DT treated at Center Leon Berard between 1990 and 2005.

Tissue samples

The analysis of present study was performed on the initial tumor of patients, sampled by biopsy or surgical excision to establish the diagnosis of the disease. Paraffin-embedded tissues sections of patients included in the study were obtained from pathology centers, all from tumors at initial diagnosis. It has been already established that FFPE samples are good quality material for the miRNA profile study [9, 10].

RNA extraction and quantitative real-time PCR

FFPE tumours were lysed for 24h in ATL buffer (Qiagen, France) supplemented with proteinase K (Qiagen) at 60°C in rotative agitation after different washes with toluene, ethanol, and tris/EDTA in this order. Total RNA was extracted from tumour using a single phenol/chloroform extraction protocol with Trizol, according to the manufacturer's instructions (Life Technologies, Saint Aubin, France). Five hundred nanograms of total RNA were subjected to the microfluidic PCR technology performed by Applied Biosystems (Life Technologies, Saint Aubin, France). In brief, RNA was reversed transcribed, using multiplexed specific looped miRNA primers from the Taqman MicroRNA Reverse Transcription kit. The second step consists in a real-time quantitative PCR on Taqman Low Density Array (TLDA) card A second version: RT products are introduced through microchannels into miniature wells that are preloaded with dehydrated specific primers and probes. Analyses were performed for 384 miRNAs.

Statistical analysis

For each miRNA, the threshold cycle (Ct) was calculated by the ABI 7900 Sequence Detection System software. A cut-off of 37 was applied to discard the late Ct values according to the manufacturer's instructions [11]. Median method was applied as normalization [12, 13] and each miRNA was expressed by relative quantification ($Rq = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Supervised and unsupervised hierarchical clusterings were performed using TIBCO Spotfire Decision Site software. Supervised analysis was performed on several groups of patients:

- responsive versus stable and progressive disease during the 1-year treatment by imatinib to search for a predictive value
- progressive versus non progressive disease after the end of treatment by imatinib to search for a prognostic value

Univariate logistic regression analysis was performed on groups of patients identified by unsupervised hierarchical clustering with the following variables : sex (male vs female), age at diagnosis (continuous variable), tumor size (at inclusion in Desminib trial, continuous variable), tumor location (mesenteric vs abdominal wall vs extra-abdominal), context of FAP (yes vs no), number of previous lines of treatment before inclusion in the study (patients treated by radiotherapy (RT) and/or chemotherapy (CT) and/or hormone therapy and/or non steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as an ordinal variable with 4 categories), lymphocytes count (at inclusion in the trial, continuous variable), presence of the KIT M541L exon 10 variant (yes vs no), level of immunohistochemical expression of β catenin, cyclin D1, and PDGFR β (0 vs 1 vs 2 vs 3).

Times to progression were compared by log-rank test after Kaplan-Meier analysis.

To detect differential expression of miRNAs between different groups of interest, we used a one-way analysis of variance (ANOVA) with a p-value threshold of 5%.

To identify genes targeted by miRNAs of interest, we considered only the validated target in our homemade database combining the 2 validated databases (TarBase v.6.0; last release on Aug. 1 2012 [14] and miRTarbase; last release on Nov. 1 2013 [15]).

Results

Patients

Forty patients were included in Desminib phase II trial. Detailed results of the study were published in 2010 [8]. Two patients included in the clinical study refused to sign consent for biological research on their tumor sample. Paraffin-embedded tissues samples of 34 patients were obtained from pathology centers. They all were taken from specimen of initial diagnosis. Six tissue samples were excluded from the study because of their fixation in Bouin. RNA was extracted from 28 paraffin-embedded tissues and obtained in sufficient quantity (at least 500ng in 3µl) for 26 patients.

The 15 patients included in the validation cohort presented DT treated at Center Leon Berard. All of them benefited from surgical resection of their initial tumor.

The tumor tissue sample analysed for each patient comes from the surgical excision of the initial tumor, before the patient receive any medical treatment.

Table 1 presents the characteristics of the 41 patients analysed (26 patients in the desminib cohort and 15 patients in the validation cohort).

The characteristics of the patients correspond to those describe in the literature. Among the 41 patients analysed, there is a majority of women with a median age at diagnosis around the 40 years old. The tumors mainly occur in an extra-abdominal location (the majority in the trunk and few cases in upper and lower limbs or in head and neck). Median tumor size is around 9 cm at the inclusion in the Desminib study and a little smaller in the validation cohort. This is the only criteria different between the 2 cohorts. More than half of patients received no medical treatment or only one line of treatment and 37% of them received two, three or four lines.

In the Desminib cohort, after a median follow-up of 68 months, median TTP was 2 years and median OS is not reached. Majority of patients had stable (19 patients) or responsive (3 patients) disease under imatinib. After discontinuation of imatinib, 10 patients were progressive within 23.5 months of follow-up and 14 were never progressive.

In the validation cohort, after a median follow-up of 56,8 months, 6 patients had recurrence and 9 did not present any recurrence.

Supervised analysis

Predictive and prognostic supervised analysis on the desminib cohort failed to identify miRNA differentially expressed between responsive versus non responsive patients to imatinib and between progressive versus non progressive patients after discontinuation of imatinib, respectively. Any miR reached the statistical significance after Bonferroni correction to discriminate studied groups.

Unsupervised analysis

The unsupervised hierarchical clustering of the Desminib cohort identified 2 groups of 13 patients each, called group A and group B. To identify clinical and/or biological factors that

could explain the partition of patients in the 2 clusters, univariate analysis by logistic regression was performed.

Only the number of previous lines of treatment before inclusion in the Desminib trial was found significantly associated with the belonging to one group of the clustering or another, with an Odd Ratio of 2.44 [1.17-6.78] and a p-value of 0.0387. Patients of group B have been treated with significantly less lines of treatment before inclusion in the Desminib trial.

Time to progression (TTP) after interruption of treatment by imatinib was compared between the groups A and B by log rank analysis. Three patients were excluded of the study because of lack of follow-up.

The median follow-up after interruption of imatinib was 23.6 months [12.4-39.0]. Six patients among 11 in group A and 3 patients among 12 in group B relapsed.

Even not statistically significant, median TTP in group B is longer than median TTP in group A.

By Anova test, 15 miRNA were found differentially expressed with statistical significance between the 2 groups A and B. The table 2 presents the list of these 15 miRs and their p-value.

All these miRNA are under-expressed in the group A that is associated with poor prognosis.

After interrogation of database, more than 3000 genes are targeted these 15 miRNAs. Among them, 50 genes are targeted by at least 3 miRNAs, whose: *AGO1*, *BCL2*, *CDK6*, *SMAD4*, *PTEN*, *CCND1*, *VEGFA*, *RBI*.

To validate these results, these 15 miRNAs were used to perform a hierarchical clustering of the validation cohort. Two groups of 6 and 9 patients were identified, called group A' and group B', respectively.

Univariate analysis by logistic regression failed to find any significant clinical parameters to explain the distribution of patients in the 2 groups. Parameters tested were age and sex of the patient, location of the tumor, number of recurrence and number of treatment lines.

After a median follow-up of 53 months [3-230], 4 patients among 6 in group B' and 5 patients among 9 in group A' recurred. Time to recurrence (TTR) after initial surgery was compared by log-rank analysis between the groups A' and B'.

Time to recurrence is significantly longer in group B' identified by the 15 miRNA profile expression than in group A'.

Discussion

This study presents, to date, the first results of the analysis of miRNA profile expression in desmoid tumor (DT). Although retrospective, it is based on a cohort of patients included in a clinical phase II trial (Desminib trial) that ensures a good quality follow-up and exhaustiveness of the data recorded. The main limitation of our study is linked to the small size of its cohorts, but DTs are very rare mesenchymal tumors.

The characteristics of patients in the studied cohorts (Desminib and validation cohorts) are similar to those described in the largest retrospective issue [4].

As miRNAs have never been studied in DT yet, we performed an explanatory approach of the analysis with no assumption. First, predictive and prognostic supervised analyses were conducted. The choice of groups to compare in the predictive analysis was difficult to establish because the response evaluation to medical treatment of DT is not clearly established: RECIST criteria are certainly not adapted to these slow growing tumors. Predictive analysis failed to identify specific imatinib targets that could explain the sensitivity of DT to this drug, but propose new targets to further explore (*PARP*, *IGF1R*, *HSP90B*). Prognosis supervised analysis was difficult to interpret for the Desminib cohort as far as majority of patients had recurrent and/or progressive disease at inclusion in the trial.

As more and more used with the emergence of “omics”, analysis that concern “high-dimensional data”, we then chose to realize a clustering. A study upstream on the robustness of clustering has shown the Euclidean distance and Ward's method gave the best results for small cohorts of sarcoma tumors [Pissaloux in press]. It also presents the strong advantage not to require any a priori on the groups to obtain. This analysis on Desminib cohort leads to individualize 2 groups of patients.

The results of logistic regression showed a significantly association between the belonging to group B and a lower number of lines of treatment administered before inclusion in the Desminib trial, that may reflect the aggressiveness of the tumor. In clinical practice, it is known that systemic treatments (radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy, NSAID) are little effective and not devoid of side effects. When several lines are administered, it usually reflects an aggressive tumor, uncontrolled and/or symptomatic, for which the physician tests successively all available treatments to relieve patient symptoms. This criterion of number of treatment lines is used in clinical trials that evaluate other low grade tumor such as T-cell lymphomas [16]. This data suggested a prognostic value of miRNA profile represented by the tumor aggressiveness. It was confirmed by the comparison of TTP after discontinuation of imatinib in the 2 groups: even not statistically significant ($p = 0.0596$), the TTP curves of the 2 groups were clearly distinct. The lack of statistical significance may be due to the limited size of the cohort and to the fact that all patients included in Desminib trial had a recurrent so aggressive tumor.

These results had to be validated in an independent cohort that included patients with recurrent and not recurrent tumors after surgical excision. This cohort was more adapted than the Desminib one to search for a prognostic value. Unsupervised clustering indeed led to 2 groups of patients that present statistically different time to recurrence, confirming the prognostic value of miRNA profile expression.

Dozens of studies already demonstrated a prognostic value of miRNA in many different types of malignancy [17-20].

The next step of this analysis was logically aimed to identify discriminating miRNAs between the clusters in order to 1) define a prognosis signature and 2) determine genes whose transcription is impacted by these miRNAs. By Anova test and Bonferroni correction, 15 miRNAs were found to be significant in the unsupervised analysis of Desminib cohort. These 15 miRs target more than 3000 genes. Then it was essential to select several genes known to be involved in signalling pathways in cancer and that could represent interesting new targets to study to explore biological mechanisms of DT and the development of new therapeutics. To that, we decided to focus on genes targeted by several miRNAs, to increase their biological relevance.

PTEN is a key regulator of cell cycle and a tumor suppressor gene. Genetic inactivations or reduced expression of PTEN are frequently associated with cancers. It has been already established that mutations in SMAD4 and in PTEN are involved in the development of familial juvenile polyposis [21]. Angiogenesis is also directly impacted by VEGFA. Rb is also considered as a tumor suppressor by inhibiting cell cycle progression. CDK6 and Cyclin D1 phosphorylate Rb, inhibiting its activity. It has been demonstrated a lack of nuclear staining by immunohistochemistry in 13 cases of DT (interestingly, the staining was present in palmar fibromatosis as long as in the vascular tissue adjacent to the fibroproliferative lesion) [22]. In a previous study looking for predictive factors of response to imatinib in Desminib trial, we found by immunohistochemistry analysis on tissue micro array, inconsistent expression of Cyclin D1. It's interesting to see that the 5 patients (among 31 tested) with histological staining for Cyclin D1 are classified in the group A of the present study. Bcl2 is classified as an oncogene as long as it acts as an anti-apoptotic.

Even if interesting, these 15 miRNAs can be used as a prognostic signature only after their validation in a larger and prospective cohort of DT.

Conclusion

These results bring the first demonstration of the prognostic value of miRNA expression profile in DT. The impact of such a discovery is essential in the management of patients with these tumors that are particularly over-treated. It is now evident that a substantial proportion of patients ($\approx 50\%$) do not benefit at all from surgical resection of their tumor, such a resection leading to functional and/or esthetical sequels for tumor that frequently never progress. This is now so well established, that a prospective phase II clinical trial is ongoing to systematically propose to patients with DT an active surveillance, and surgical management only in case of progressive disease. There's a deep need of clinical and/or biological surrogate markers of aggressiveness of these tumor to select patients who may benefit of such a wait-and-see policy. The results of our study need to be confirmed and we plan to analyse tumor sample of patients including in this ongoing phase II trial and to prospectively establish their miRNA profile.

The ultimate goal will be to define a robust prognostic signature based on few miRNAs to predict the behaviour of the tumor newly diagnosed and adapt the management of the tumor. To go further, we also consider to evaluate miRNA profile in the serum of patients to develop a non-invasive diagnostic tool.

References

- 1/ Biermann JS. Desmoid tumours. *Curr Treat Options Oncol* 2000; 1: 262–266.
- 2/ Dômont J, Salas S, Lacroix L, Brouste V, Saulnier P, Terrier P, Ranchère D, Neuville A, Leroux A, Guillou L, Sciot R, Collin F, Dufresne A, Blay JY, Le Cesne A, Coindre JM, Bonvalot S, Bénard J. High frequency of beta-catenin heterozygous mutations in extra-abdominal fibromatosis: a potential molecular tool for disease management. *Br J Cancer*. 2010 Mar 16;102(6):1032-6
- 3/ Schiessling S, Kihm M, Ganschow P, Kadmon G, Büchler MW, Kadmon M. Desmoid tumour biology in patients with familial adenomatous polyposis coli. *Br J Surg*. 2013 Apr;100(5):694-703
- 4/ Salas S, Dufresne A, Bui B, Blay JY, Terrier P, Ranchere-Vince D, Bonvalot S, Stoeckle E, Guillou L, Le Cesne A, Oberlin O, Brouste V, Coindre JM. Prognostic factors influencing progression-free survival determined from a series of sporadic desmoid tumors: a wait-and-see policy according to tumor presentation. *J Clin Oncol*. 2011 Sep 10;29(26):3553-8.
- 5/ Fiore M, Rimareix F, Mariani L, Domont J, Collini P, Le Péchoux C, Casali PG, Le Cesne A, Gronchi A, Bonvalot S. Desmoid-type fibromatosis: a front-line conservative approach to select patients for surgical treatment. *Ann Surg Oncol*. 2009 Sep;16(9):2587-93
- 6/ von Mehren M, Benjamin RS, Bui MM, Casper ES, Conrad EU 3rd, Delaney TF, Ganjoo KN, George S, Gonzalez R, Heslin MJ, Kane JM 3rd, Mayerson J, McGarry SV, Meyer C, O'Donnell RJ, Paz B, Pfeifer JD, Pollock RE, Randall RL, Riedel RF, Schuetze S, Schupak KD, Schwartz HS, Shankar S, Van Tine BA, Wayne J, Sundar H, McMillian NR. Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2012: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Aug 1;10(8):951-960.
- 7/ Amaia Lujambio & Scott W. Lowe The microcosmos of cancer *Nature* 482, 347-355
- 8/ Penel N, Le Cesne A, Bui BN, Perol D, Brain EG, Ray-Coquard I, Guillemet C, Chevreau C, Cupissol D, Chabaud S, Jimenez M, Duffaud F, Piperno-Neumann S, Mignot L, Blay JY. Imatinib for progressive and recurrent aggressive fibromatosis (desmoid tumors): an FNCLCC/French Sarcoma Group phase II trial with a long-term follow-up. *Ann Oncol*. 2011 Feb;22(2):452-7.
- 9/ Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007 Oct;13(10):1668-74.
- 10/ Liu A, Tetzlaff MT, Vanbelle P, Elder D, Feldman M, Tobias JW, Sepulveda AR, Xu X. MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009 Mar 20;2(6):519-27.
- 11/ Witwer KW, Sarbanes SL, Liu J, Clements JE. A plasma microRNA signature of acute lentiviral infection: biomarkers of central nervous system disease. *AIDS*. 2011 Nov 13;25(17):2057-67 (choix du ct à 37)
- 12/ Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034

13/ Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5245-50.

14/ Vergoulis, T. I. Vlachos, P. Alexiou, G. Georgakilas, M. Maragkakis, M. Reczko, S. Gerangelos, N. Koziris, T. Dalamagas, AG Hatzigeorgiou; Tarbase 6.0: Capturing the Exponential Growth of miRNA Targets with Experimental Support. *Nucl. Acids Res.* (2012) 40 (D1): D222-D229.

15/ Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, Tsai WT, Chen GZ, Lee CJ, Chiu CM, Chien CH, Wu MC, Huang CY, Tsou AP, Huang HD. (2011) *Nucleic acids research*

16/ Damaj G, Gressin R, Bouabdallah K, Cartron G, Choufi B, Gyan E, Banos A, Jaccard A, Park S, Tournilhac O, Schiano-de Colla JM, Voillat L, Joly B, Le Gouill S, Saad A, Cony-Makhoul P, Vilque JP, Sanhes L, Schmidt-Tanguy A, Bubenheim M, Houot R, Diouf M, Marolleau JP, Béné MC, Martin A, Lamy T. Results From a Prospective, Open-Label, Phase II Trial of Bendamustine in Refractory or Relapsed T-Cell Lymphomas: The BENTLY Trial. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 1;31(1):104-10.

17/ Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):189-98.

18/ Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005 Oct 27;353(17):1793-801.

19/ Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Apr 4;104(7):528-40.

20/ Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.

21/ Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G, Vogelstein B. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis [PTEN SMAD4]. *Nat Genet.* 2001 Jun;28(2):184-7.

22/ Muller E, Castagnaro M, Yandel DW, Wolfe HJ, Alman BA. Molecular genetic and immunohistochemical analysis of the tumor suppressor genes Rb and p53 in palmar and aggressive fibromatosis. *Diagn Mol Pathol.* 1996 Sep;5(3):194-200.

Table 1 Characteristics of the 41 patients analysed

Characteristic		Desminib cohort n = 26 (%)	Validation cohort n = 15 (%)
Gender	Male	8 (31)	6 (40)
	Female	18 (69)	9 (60)
Median age at diagnosis [range], years		40 [20-72]	35.4 [0.4-71.3]
Location	Intra abdominal	4 (15)	1 (7)
	Abdominal wall	3 (12)	1 (7)
	Extra abdominal	19 (73)	13 (86)
Median tumor size [range], mm		88 [25-220]	67.5 [35-150]
FAP	yes	3 (12)	1 (7)
	no	23 (88)	14 (93)
Performans status	0	18 (69)	-
	1	6 (23)	-
	Unknown	2 (8)	-
Number of treatment lines (RT/CT/hormone/NSAID)	0	10 (38)	5 (33)
	1	8 (30)	6 (40)
	2	3 (12)	1 (7)
	3	3 (12)	2 (13)
	4	2 (8)	1 (7)
Median lymphocytes count [range] G/l		2.2 [0.7-3.2]	-
Median TTP [range], months		24.6 [0.9-42.3]	24.7 [5.6-82.1]
Response under imatinib	CR, PR	3 (12)	NA
	SD, PD	23 (88)	NA
Median follow-up [range], months		68 [31-210]	56.8 [7.1-233.6]

Table 2: miRs differentially expressed between the 2 groups identified by the unsupervised hierarchical clustering of the Desminib cohort

Detector Anova	p-value	Detector Anova	p-value
hsa-miR-26a	6,51259E-08	hsa-miR-410	4,77677E-05
hsa-miR-199a-3p	8,93264E-07	hsa-miR-93	8,39891E-05
hsa-miR-374b	1,83335E-06	hsa-miR-19b	8,7169E-05
hsa-let-7g	2,46322E-06	hsa-miR-100	0,000105825
hsa-miR-374a	2,52505E-06	hsa-miR-411	0,000107016
hsa-miR-708	1,9259E-05	hsa-miR-31	0,000114059
hsa-miR-103	3,07889E-05	hsa-miR-26b	0,000121591
hsa-miR-195	3,65417E-05		

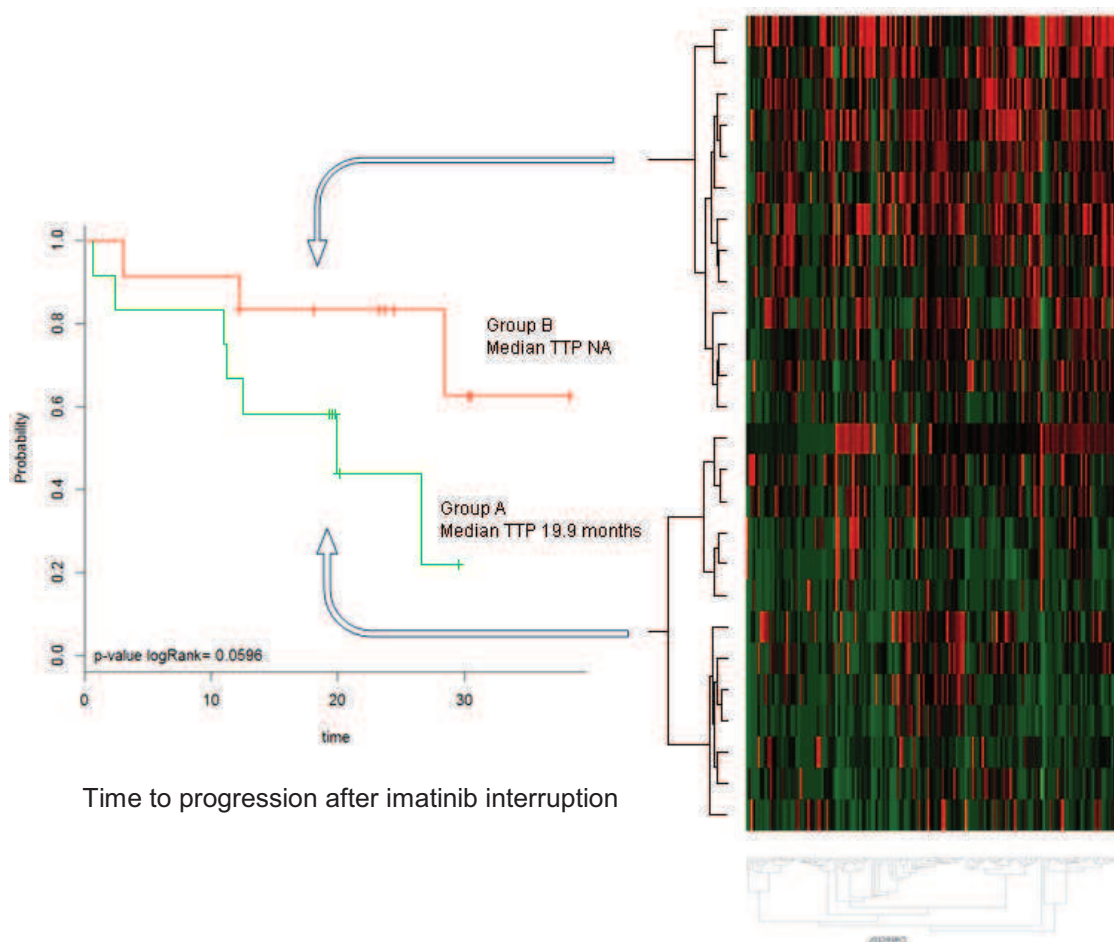


Figure 1 Right figure represents the heat map clustering of miRNA expression in desmoid tumors of the desminib cohort (26 samples). Each row represents the relative levels of expression for each miRNA and each column shows the expression levels for each patient sample. The red or green color indicates relatively high or low expression, respectively, while grey squares indicate absent data points. Left figure represents the comparison by log-rank analysis, of time-to-progression after discontinuation of imatinib of groups identified by unsupervised analysis in the Desminib cohort.

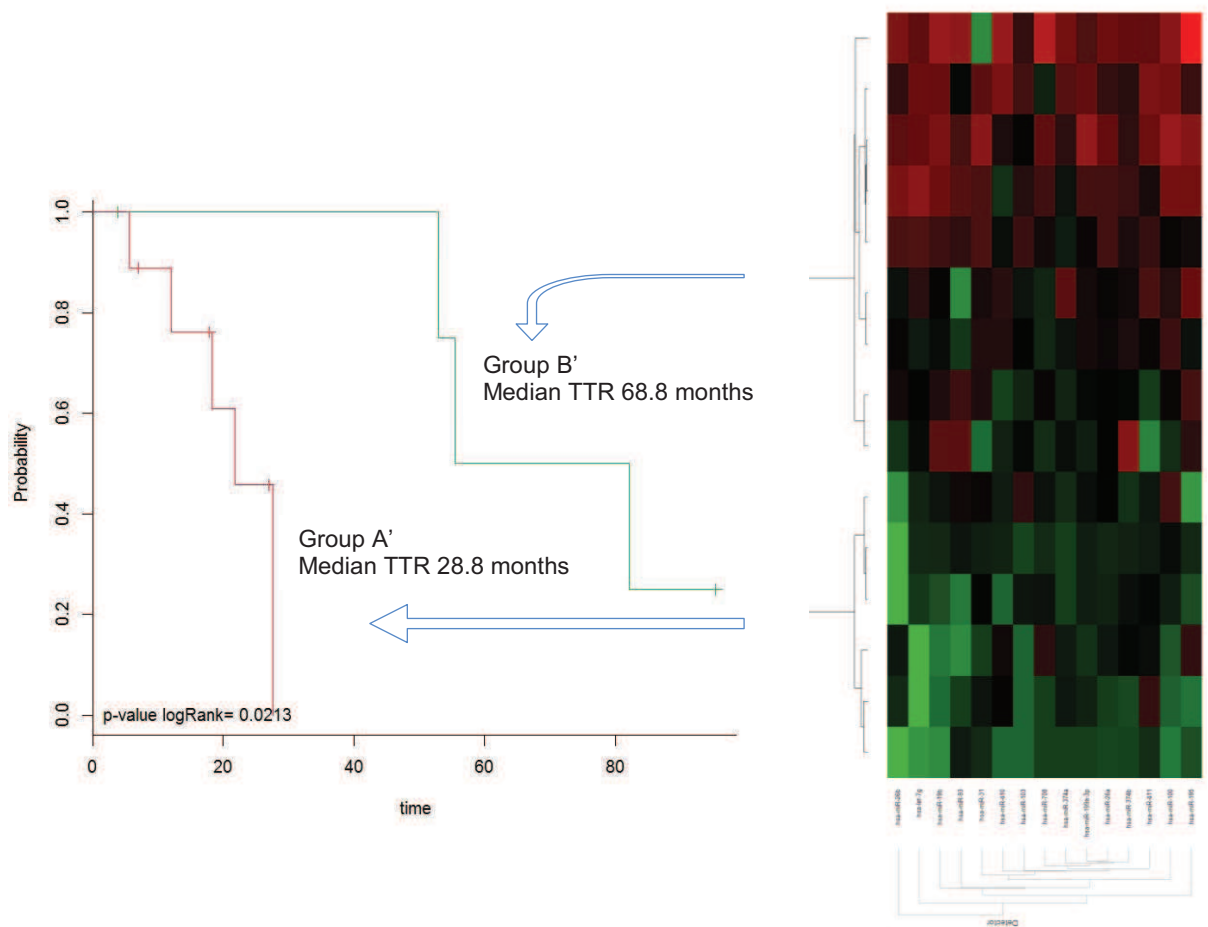


Figure 2 Right figure represents the heat map clustering of miRNA expression in desmoid tumors of the validation cohort (15 samples) for the 15 miRs found significant in the Desminib analysis. Left figure represents the comparison by log-rank analysis, of time-to-recurrence.

Résumé

Les fibromatoses agressives sont des tumeurs conjonctives rares, pouvant envahir les structures adjacentes parfois de manière très agressive et responsables de fréquentes récurrences loco-régionales après exérèse mais dépourvues de potentiel métastatique. Elles peuvent également se stabiliser voire régresser spontanément. Leur évolution est imprévisible. Actuellement, la stratégie de leur prise en charge est remise en cause et ces tumeurs sont de plus en plus souvent surveillées à leur diagnostic. En cas de tumeur évolutive, les traitements systémiques disponibles sont multiples mais d'efficacité très variable. Biologiquement, ces tumeurs sont issues de cellules souches mésenchymateuses dont la voie Wnt/ β -caténine est dérégulée. Cette dérégulation est liée à une mutation du gène *APC* quand la tumeur survient dans un contexte de syndrome de Gardner et à une mutation du gène *CTNNB1* quand elle survient de manière sporadique. Aucun facteur pronostique de récurrence ou d'évolutivité spontanée et aucun facteur prédictif d'efficacité des traitements médicaux n'a aujourd'hui été identifié.

Les travaux de deux premières publications présentés le manuscrit, ont étudié les facteurs cliniques de récurrence après exérèse chirurgicale sur de larges séries rétrospectives, française et américaine, et ont retenu le jeune âge du patient, la grande taille tumorale et sa localisation extra-abdominale comme étant de mauvais pronostic. Dans une troisième publication, nous nous sommes appliqués à rechercher si le sous-type moléculaire de mutation de *CTNNB1* observé dans les fibromatoses sporadiques pouvait influencer la récurrence: les résultats concluent que la mutation S45F est de moins bon pronostic que les autres, ce qui se retrouve dans la littérature, sans que l'explication biologique en soit définie. Un autre article soumis à publication rapporte les résultats de l'analyse des profils d'expression des miRNAs des fibromatoses qui semblent se corrélérer à leur pronostic mais cela doit être confirmé. Les 3 articles suivants présentés, dont 2 sont publiés, présentent des travaux recherchant des facteurs prédictifs de réponse des fibromatoses à l'imatinib : l'expression d'aucune des cibles connues de l'imatinib n'a été retrouvée comme influençant significativement la réponse au traitement. Le rôle des variants M541L et V530I de l'exon 10 de *KIT* reste à déterminer.

L'exploration des mécanismes biologiques sous-tendant les différences cliniques observées tant au niveau du pronostic des fibromatoses que de leur réponse aux thérapies (ciblées ou non) doit se poursuivre. Les axes de recherches doivent être développés en tenant compte des nouveaux standards de stratégie de prise en charge, moins interventionnistes. C'est en ciblant précisément les nouveaux défis de traitement de ces tumeurs que cette recherche pourra être efficace.