



**HAL**  
open science

# La voie de signalisation FGF/FGFR : nouvelle cible thérapeutique dans les liposarcomes

Bérengère Dadone-Montaudié

► **To cite this version:**

Bérengère Dadone-Montaudié. La voie de signalisation FGF/FGFR : nouvelle cible thérapeutique dans les liposarcomes. Cancer. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6024 . tel-03153663

**HAL Id: tel-03153663**

**<https://theses.hal.science/tel-03153663>**

Submitted on 26 Feb 2021

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT

**La voie de signalisation FGF/FGFR :  
Nouvelle cible thérapeutique dans les liposarcomes**

**Bérengère DADONE**

Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement, Nice (IRCAN)

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en Sciences  
de la Vie et de la Santé (SVS)**

d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par** : Laurence Bianchini

**Soutenue le** : 16 octobre 2020

**Devant le jury, composé de :**

Corinne Bouvier-Labit, MCU-PH, HDR, Université d'Aix Marseille

Fanny Burel-Vandenbos, PU-PH, Université Côte d'Azur

Max Chaffanet, PhD, HDR, Université d'Aix Marseille

Antoine Italiano, PU-PH, Université de Bordeaux

Florence Pedeutour, PU-PH, Université Côte d'Azur





# La voie de signalisation FGF/FGFR :

## Nouvelle cible thérapeutique dans les liposarcomes

### **Jury :**

#### **Présidente de jury :**

Florence Pedeutour, PU-PH, Université côte d'Azur

#### **Rapporteurs :**

Corinne Bouvier-Labit, MCU-PH, HDR, Université d'Aix Marseille

Max Chaffanet, PhD, HDR, Université d'Aix Marseille

#### **Examineurs :**

Fanny Burel-Vandenbos, PU-PH, Université Côte d'Azur

Antoine Italiano, PU-PH, Université de Bordeaux

### Résumé

Les sarcomes, tumeurs conjonctives malignes, constituent un groupe hétérogène de tumeurs en fonction de la ligne de différenciation. Les liposarcomes (LPS), de différenciation adipocytaire, représentent une classe de sarcomes de tissus mous fréquente chez l'adulte. Parmi les LPS, on distingue deux types histologiques majoritaires : les tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) ou liposarcomes bien différenciés (LBD) et les liposarcomes dédifférenciés (LDD). Alors que les TLA/LBD sont de malignité intermédiaire c'est-à-dire d'agressivité essentiellement locale, les LDD ont un potentiel métastatique et leur taux de mortalité à 5 ans est de l'ordre de 30%. Les chimiothérapies standard ou les nouveaux agents cytotoxiques demeurent peu efficaces. Les TLA/LBD et LDD sont caractérisés par une amplification de la région 12q incluant notamment les gènes *MDM2*, *HMGA2*, *CDK4* et *FRS2*. Cette amplification récurrente des oncogènes *MDM2* et *CDK4* a conduit au développement de nouvelles thérapies anti-MDM2 ou anti-CDK4.

Par ailleurs en oncologie, la dérégulation fréquente de la voie du *Fibroblast Growth Factor* (FGF)/ *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) constitue une cible d'intérêt dans la prise en charge thérapeutique de nombreux cancers. Or, le gène *FRS2* qui se trouve amplifié dans les TLA/LBD code pour une protéine adaptatrice cruciale de la voie de signalisation FGF/FGFR. Peu d'études ont exploré l'implication de cette voie de signalisation dans la tumorigenèse des TLA/ LBD et LDD.

Nos objectifs étaient d'évaluer l'implication de la voie FGF/FGFR dans la liposarcomagenèse et d'étudier les effets d'un inhibiteur pan-FGFRs très spécifique, le JNJ42756493 (erdafitinib) seul ou en association avec d'autres molécules sur la tumorigénicité des cellules de LPS *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons démontré qu'un sous-groupe de LBD et LDD présentait une surexpression de FGFR1 et/ou FGFR4 et que cette surexpression était corrélée à un mauvais pronostic, sur une série de 694 cas de LBD/LDD. Nous avons mis en évidence les effets anti-tumorigéniques du JNJ42756493 ainsi que la synergie de la combinaison JNJ42756493 + RG7388 (un antagoniste de MDM2 de la classe des nutlines) sur la viabilité cellulaire, l'apoptose, le cycle cellulaire, la survie à long terme et l'activation des voies de signalisation en aval des FGFRs. Ces effets synergiques *in vitro* étaient confirmés *in vivo*, sur un modèle de xénogreffe de souris. De plus, l'efficacité du JNJ42756493 (erdafitinib) a été testée chez un patient atteint d'un LDD métastatique, réfractaire à plusieurs lignes de chimiothérapie et a permis une stabilisation de la maladie pendant 12 semaines.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la voie de signalisation FGF/FGFR était impliquée dans la liposarcomagenèse avec un potentiel thérapeutique pour un sous-groupe de LBD/LDD et que l'expression de FGFR1 et/ou FGFR4 pouvait constituer un puissant biomarqueur pour sélectionner les patients à inclure dans des essais cliniques.

**Mots-clés** : Liposarcomes ; FGFR ; MDM2 ; JNJ42756493 ; RG7388

### Abstract

Liposarcoma is the most common soft tissue sarcoma in adults. Effective treatments for metastatic dedifferentiated liposarcoma (DDLPS) patients are lacking. We aimed to evaluate the therapeutic potential of the pan-FGFR inhibitor erdafitinib for these patients.

We assessed FGFRs expression and their prognostic value in a series of 694 samples of well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma (WDLPS/DDLPS). We investigated the effect of erdafitinib -alone or in combination with other antagonists- on tumorigenicity was evaluated in vitro and in vivo.

We detected overexpression of FGFR1 and/or FGFR4 in a subset of WDLPS/DDLPS and demonstrated correlation of this expression with poor prognosis. Erdafitinib treatment induced a decrease in cell viability, cell cycle arrest in G1, apoptosis and strong inhibition of the ERK1/2 pathway. The association of erdafitinib with the PI3K/mTOR antagonist BEZ235 was not synergistic. Combining erdafitinib with the MDM2 antagonist RG7388 exerted a synergistic effect on viability, apoptosis and clonogenicity in three WDLPS/DDLPS cell lines. Efficacy of this combination was confirmed in vivo on DDLPS xenograft. Importantly, we report the efficacy of erdafitinib in one patient with metastatic DDLPS refractory to four prior lines of treatment showing disease stabilization for 12 weeks.

In conclusions, we provided evidence that the FGFR pathway had therapeutic potential for a subset of DDLPS and that FGFR1 and FGFR4 expression might constitute a powerful biomarker to select patients for FGFR inhibitor clinical trials. In addition, we showed that combining erdafitinib with RG7388 is a promising strategy for patients with DDLPS that deserves further investigation in the clinical setting.

**Keywords** : Liposarcoma ; FGFR ; MDM2 ; JNJ42756493 ; RG7388

# REMERCIEMENTS

## **A ma directrice de thèse, Madame Laurence BIANCHINI,**

Je ne sais par où commencer mes remerciements ! Je t'adresse mille mercis... Tout d'abord pour avoir accepté de diriger mon travail de thèse et pour l'avoir rendu si intéressant, motivant et gratifiant. Je te remercie également pour m'avoir enseigné ta rigueur scientifique et communiqué ton enthousiasme. Ton encadrement toujours bienveillant et ta confiance m'auront accompagnée tout au long de ce projet. Je souhaite vivement poursuivre notre fructueuse collaboration scientifique...

## **A Madame Corinne BOUVIER-LABIT,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je suis très heureuse de vous exposer mes travaux et de pouvoir bénéficier de votre expertise dans le domaine des sarcomes et de leur caractérisation anatomopathologique et moléculaire.

## **A Monsieur Max CHAFFANET,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je suis très heureuse de vous exposer mes travaux et de pouvoir bénéficier de votre expertise dans la caractérisation génomique des cancers et dans la médecine de précision.

## **A Madame Fanny BUREL-VANDEBOS,**

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse de sciences. Tu es présente à chacune des grandes étapes de mon parcours professionnel et j'en suis ravie. Au quotidien, tes conseils avisés et la confiance que tu me portes me sont très précieux. Je suis enchantée de construire mon avenir professionnel à tes côtés.

## **A Monsieur Antoine ITALIANO,**

Je te remercie de me faire l'immense honneur de juger mon travail et de me permettre de bénéficier de l'étendue de ton expertise dans le domaine des sarcomes. Je te suis très reconnaissante de l'intérêt que tu as porté à mes travaux et d'être à l'initiative de collaborations passées et je l'espère, futures.

## **A Madame Florence PEDEUTOUR,**

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Au-delà de ce travail, je souhaite vous renouveler mes remerciements et ma gratitude pour m'avoir accueillie et fait une place dans votre laboratoire, pour me transmettre quotidiennement vos connaissances sur la génomique des tumeurs et pour m'apporter votre soutien dans mes projets professionnels.

Un très grand merci à toutes les personnes engagées dans ce projet qui est le fruit de plusieurs collaborations,

**Aline**, un très grand merci pour ton aide très précieuse dans toutes ces manip, merci également à **Charles-Maxime, Saloua, Imène, Maha** et **Gilbert**.

Je remercie très sincèrement **l'équipe INSERM dirigée par le Professeur A. ITALIANO** à l'Institut Bergonié à Bordeaux et particulièrement **Audrey, Vanessa** et **Stéphanie** pour leur expertise et leur accueil.

Je remercie **François Bertucci** et **Pascal Finetti** pour leur expertise et leur conseils avisés.

Je remercie **Emmanuel Chamorey, Renaud Schiappa** et **l'équipe du département de Biostatistiques** du Centre Antoine Lacassagne pour leur expertise et leur disponibilité.

Je remercie également **l'équipe du Département de Pathologie de l'Institut Bergonié** et tout particulièrement Monsieur le Professeur J.-M. COINDRE.

Je remercie **toute l'équipe du LCAP** et plus particulièrement celles et ceux qui ont participé à mon projet. Merci à **Fatiha, Sandrine** et **Arnaud** pour votre confiance et votre aide dans mes manip d'IHC.

Je remercie **toute l'équipe du LGTS. Ilaria** pour ton aide précieuse et souriante dans mon projet, **Annie, Audrey, Fred, Julie, Mika, Nath, Roger, Sophie, Tibo, Valérie** et **Valérie, Isabelle, Claudine** pour votre expertise, votre motivation, votre bonne humeur, votre confiance, bref pour l'ensemble de votre œuvre ! Au risque de me répéter, c'est une chance de travailler avec vous !

Je remercie vivement **Monsieur le Professeur J.-F. MICHIELS**. Monsieur, je vous suis infiniment reconnaissante pour votre soutien et votre confiance délivrés au quotidien, et pour votre engagement sans cesse renouvelé dans l'avancement de mes projets professionnels. Je vous dois beaucoup...

Je tiens également à remercier **mes collègues et amis médecins** pour leur soutien qui m'a permis de mener à bien ces travaux.

**A Toi**, mon âme-sœur,

**A mes enfants chéris, Diane et Victor,**

**A ma mère,**

A ma chère famille et ma si belle-famille,

A mes amis,

**A Toi,**

*« L'absence est le plus grand des maux »*

*Jean de la Fontaine*



## Liste des abréviations

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CDK4 : *Cyclin dependent kinase 4*

CGH-array : Hybridation génomique comparative sur puce à ADN

CNA : Variations de nombre de copies (*Copy number alterations*)

CPM : Carboxypeptidase M

DAG : Diacylglycérol

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ERK1/ERK2 : *extracellular signal-regulated kinases 1/2*

FDA : Food and drug administration

FGFBP1 : *Fibroblast growth factors binding protein 1*

FGFs : *Fibroblast growth factors*

FGFRs : *Fibroblast growth factor receptors*

FGFRL1 : *Fibroblast growth factor receptor like 1*

FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence

FNCLCC : Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer

FRS2 : *Fibroblast growth factor receptor substrate 2*

GRB2 : *Growth Factor Receptor Bound Protein 2*

HMGA2 : *High mobility group AT-hook 2*

HR : *Hazard ratio*

HSPG : Protéoglycanes de type sulfate d'héparane

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

Ig : Immunoglobuline

IP3 : Inositol triphosphate

IHC : immunohistochimie

ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

KO : Knockout

LBD : liposarcomes bien différenciés

LDD : liposarcomes dédifférenciés

LMS : Léiomyosarcomes

LPS : liposarcomes

MAP3K5 : *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5*

MAP Kinases : *Mitogen-activated protein kinases*

MDM2 : *Mouse double minute 2*

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PIP2 : Phosphatidyl inositol biphosphate

PDGFRs : *Platelet-derived growth factor receptors*

PDX : *Patient-derived xenograft*

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PTB : Phosphotyrosine binding

PTEN : Phosphatase en tensin homolog

RTKs : Récepteurs à activité tyrosine kinase

SH2 : *Src homology 2*

SHP2 : *SH2-containing tyrosine phosphatase*

SPRY : Sprouty

STS : sarcomes des tissus mous ou *soft tissue sarcomas*

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TERT : *Telomerase reverse transcriptase*

TLA : Tumeurs lipomateuses atypiques

Tyr : Résidu tyrosine

UPS : Sarcomes pléomorphes indifférenciés

VEGFRs : *Vascular growth factor receptors*

WB : Western blot

NB. Toutes les coordonnées génomiques sont mentionnées selon la référence du génome hg19 (GRCh37).

## Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION - PARTIE I .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Aspects cliniques et anatomopathologiques .....</b>	<b>17</b>
a. Distinction entre tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) et liposarcomes bien différenciés (LBD)....	17
b. Caractéristiques cliniques et localisations anatomiques .....	17
c. Caractéristiques anatomopathologiques.....	19
<b>2. Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Prise en charge thérapeutique des liposarcomes .....</b>	<b>30</b>
<b>INTRODUCTION PARTIE II .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Les Fibroblast Growth Factors (FGFs) .....</b>	<b>35</b>
a. Les familles et sous-familles de FGFs sécrétés.....	36
b. La structure des FGFs sécrétés (paracrines et endocrines).....	37
c. Le rôle des FGFs sécrétés (paracrines et endocrines) .....	37
<b>2. Les récepteurs au Fibroblast Growth Factor (FGFRs) .....</b>	<b>41</b>
a. Structure des FGFRs .....	42
b. Spécificité de l'interaction FGFs-FGFRs .....	43
<b>3. Les cofacteurs extracellulaires associés aux FGFs .....</b>	<b>44</b>
a. Les protéoglycanes de type sulfate d'héparane (HSPG).....	44
b. Les protéines Klotho.....	45
c. Les autres protéines extracellulaires associées .....	46
<b>4. Les voies de signalisation en aval des FGFRs .....</b>	<b>46</b>
a. La protéine adaptatrice FRS2 $\alpha$ .....	50
b. La voie de la phospholipase C $\gamma$ (PLC $\gamma$ ) .....	51
c. La voie des MAP Kinases ERK1/ERK2.....	52
d. La voie PI3K-AKT.....	53
e. La voie JAK/STAT .....	53
f. Modulateurs intracellulaires de la voie de signalisation FGF/FGFR .....	53
<b>5. La dérégulation de la voie FGF/FGFR et pathologies non cancéreuses .....</b>	<b>54</b>
<b>6. La dérégulation de la voie FGF/FGFR et cancers .....</b>	<b>55</b>
a. Répartition par types d'altérations génétiques .....	55
b. Répartition par sous-types histologiques de cancers.....	60
c. Répartition par mécanismes biologiques .....	63
<b>7. Les stratégies thérapeutiques ciblant la voie FGF/FGFR en cancérologie .....</b>	<b>65</b>
a. Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) anti-FGFR .....	65
b. Anticorps monoclonaux et « pièges » à FGFs .....	69

<b>INTRODUCTION – PARTIE III .....</b>	<b>72</b>
1. Amplification et surexpression du gène <i>FRS2</i> dans les LBD/LDD .....	72
2. Niveau d'expression et activation de la protéine <i>FRS2</i> dans les LBD/LDD .....	73
3. En amont de <i>FRS2</i> , les <i>FGFRs</i> sont-ils exprimés et activés dans les LBD/LDD ? .....	76
<b>PRINCIPAUX RESULTATS.....</b>	<b>80</b>
<b>I. Analyses de l'expression des 4 <i>FGFRs</i> sur des tumeurs primaires.....</b>	<b>82</b>
1. Identification d'un sous-groupe de tumeurs primaires (LBD ou LDD) surexprimant la protéine <i>FGFR1</i> et /ou <i>FGFR4</i> (analyse IHC) et corrélation pronostique.....	82
2. Confirmation de nos résultats sur une cohorte de validation (analyse de l'ARNm) et corrélation pronostique .....	86
<b>II. Implication de la voie <i>FGF/FGFR</i> dans la liposarcomagenèse .....</b>	<b>87</b>
1. Analyse d'expression des <i>FGFRs</i> dans un panel de lignées cellulaires issues de LBD et LDD.	87
2. Effets de l'inhibiteur pan <i>FGFR</i> , <i>JNJ42756493</i> , sur nos lignées issues de LBD et LDD .....	89
<b>III. Effets de la combinaison <i>JNJ42756493</i> + <i>RG7388</i> .....</b>	<b>90</b>
1. <i>In vitro</i> , sur nos lignées issues de LBD et LDD .....	90
2. <i>In vivo</i> .....	94
<b>IV. Effets du traitement anti-<i>FGFR</i>, <i>JNJ42756493</i> (<i>erdafitinib</i>) chez un patient atteint de LDD métastatique, réfractaire.....</b>	<b>95</b>
<b>RESULTATS NON INCLUS DANS LE MANUSCRIT SOUMIS.....</b>	<b>136</b>
<b>I. Effets d'un autre inhibiteur sélectif pan <i>FGFRs</i> : le <i>LY2874455</i> .....</b>	<b>137</b>
1. Effets du <i>LY2874455</i> sur la viabilité cellulaire.....	137
2. Effets du <i>LY2874455</i> sur la phosphorylation des <i>FGFRs</i> et de <i>FRS2</i> et sur l'activation des voies en aval .....	138
3. Effets du <i>LY2874455</i> sur la survie à long terme .....	139
<b>II. Recherche des mécanismes à l'origine de la synergie entre le <i>JNJ42756493</i> et le <i>RG7388</i> sur l'apoptose.....</b>	<b>144</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>155</b>
<b>I. Principaux résultats de l'étude d'expression .....</b>	<b>156</b>
1. Expression de <i>FGFR1</i> et/ou <i>FGFR4</i> dans un sous-groupe de LBD/LDD .....	156
2. Identification de biomarqueurs dans les LBD/LDD .....	158

<b>II. Principaux résultats de l'étude fonctionnelle .....</b>	<b>159</b>
1. Implication de la voie de signalisation FGF/FGFR dans la tumorigenèse des LBD/LDD.....	159
2. Synergie de la combinaison associant un antagoniste de MDM2 et un inhibiteur pan-FGFR	
161	
<b>III. Perspectives.....</b>	<b>162</b>
<b>IV. Conclusions .....</b>	<b>164</b>
<b>Références.....</b>	<b>165</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX EN INTRODUCTION

- Figure 1. Aspects microscopiques et immunohistochimiques des TLA/LBD et LDD.
- Tableau 1. Grade histopronostique de la FNCLCC.
- Figure 2. Analyses cytogénétiques et moléculaires pour la détection de l'amplification du gène *MDM2*.
- Figure 3. Altérations moléculaires dans les LDD d'après les données du TCGA.
- Figure 4. Aspects fonctionnels de la voie p53.
- Figure 5. Les différentes familles et sous-familles de FGFs.
- Tableau 2. Liste des FGFs et FGFRs et localisation chromosomique.
- Tableau 3. Spécificités et rôles physiologiques des FGFs.
- Figure 6. La superfamille des RTKs : Arbre phylogénétique de 54 RTK humains.
- Figure 7. Structure des FGFRs.
- Figure 8. Formation des complexes FGF-HSPG-FGFR.
- Figure 9. Sites de phosphorylation de FGFR1 et activation des voies en aval.
- Figure 10. Activation des voies de signalisation en aval des FGFRs.
- Figure 11. Structure de la protéine FRS2.
- Figure 12. Mécanismes de dérégulation de la voie FGF/FGFR.
- Figure 13. Répartition des altérations de FGFRs : a. par FGFRs et b. par types d'altérations génétiques.
- Figure 14. Répartition des mutations sur les FGFRs.
- Figure 15. Fréquence et distribution des altérations des FGFRs.
- Tableau 4. Liste non exhaustive des ITKs anti-FGFRs non sélectifs.
- Tableau 5. Liste non exhaustive des ITKs anti-FGFRs sélectifs.
- Figure 16. Niveau d'expression et de phosphorylation de la protéine FRS2 (selon Wang et al. 2011).
- Figure 17. Niveau d'expression et de phosphorylation de FRS2 (selon Zhang et al. 2013).
- Figure 18. Effets du BGJ398 sur la phosphorylation de FRS2 et sur les voies de signalisation en aval (selon Zhang et al. 2013).
- Figure 19. Effets du LY2874455 et du BGJ398 sur la phosphorylation de FRS2, ERK, AKT et PLC $\gamma$  (selon Hanes et al. 2019).

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX DES RESULTATS

Tableau 6. Expression de FGFR1 et FGFR4 dans notre série de 418 cas de LBD (WDLPS)/LDD (DDLPS).

Figure 20. Analyse IHC de la série de 418 cas d'TLA/LBD et LDD.

Figure 21. Valeur pronostique de l'expression IHC de FGFR1, FGFR4 ou de la co-expression FGFR1+FGFR4, en termes de survie sans progression (DFS).

Figure 22. Valeur pronostique de l'expression IHC de FGFR1, FGFR4 ou de la co-expression FGFR1+FGFR4, en termes de survie globale (OS).

Figure 23. Valeur pronostique de l'expression en ARNm de *FGFR1* (A), *FGFR4* (B) ou de la co-expression *FGFR1+FGFR4* (C), en termes de survie sans progression (DFS).

Figure 24. Expression des FGFRs et de FRS2 au niveau ARNm et protéique dans nos lignées, à l'état basal.

Figure 25. Analyse de la voie FGFR/FRS2 après stimulation par FGF1 et/ou inhibition par le JNJ42756493 dans nos trois lignées issues de LBD/LDD.

Figure 26. Isobogrammes montrant l'effet synergique de la combinaison JNJ42756483 + RG7388.

Figure 27. Effets sur la distribution des cellules au cours du cycle après 48h de traitement.

Figure 28. Effets sur l'induction de l'apoptose après 72h de traitement.

Figure 29. Effets sur les protéines cibles de p53 après 15min et 24h de traitement.

Figure 30. Effets sur la survie à long terme après 21 jours de traitement.

Figure 31. Effets in vivo, sur la croissance tumorale et la survie des souris.

Figure 32. Effets du JNJ42756493 (erdafitinib) chez un patient.

Tableau 7. Comparaison des valeurs d'IC50 obtenues pour le LY2874455 et pour le JNJ42756493.

Figure 33. Détermination des valeurs d'IC50 par technique de MTT.

Figure 34. Analyse de la voie FGFR/FRS2 après stimulation par FGF1 et/ou inhibition par le LY2874455 dans nos trois lignées issues de LBD/LDD.

Figure 35. Effets sur la survie à long terme, déterminés par test de clonogénicité, expérimentation de type dose-réponse.

Tableau 8. Comparaison des concentrations utilisées pour le LY2874455, le RG7388 et le JNJ42756493 pour les tests de clonogénicité.

Figure 36. Effets sur la survie à long terme après 21 jours de traitement.

Figure 37. Représentation des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.

Figure 38. Liste et positionnement des 43 protéines de l'apoptose sur les « Human apoptosis antibody arrays », RayBiotech).

Figure 39A. Variations d'expression des gènes pro-apoptotiques après traitement.

Figure 39B. Variations d'expression des protéines pro-apoptotiques après traitement.

Figure 40A. Variations d'expression des gènes anti-apoptotiques après traitement.

Figure 40B. Variations d'expression des protéines anti-apoptotiques après traitement.

Figure 41A. Variations d'expression d'autres gènes d'intérêt dans nos lignées après traitement.

Figure 41B. Variations d'expression des protéines d'intérêt après traitement.

# INTRODUCTION

---



## INTRODUCTION - PARTIE I

### Les Tumeurs Lipomateuses Atypiques (TLA) / Liposarcomes Bien Différenciés (LBD) Et Les Liposarcomes Dédifférenciés (LDD)

---

Les sarcomes sont des tumeurs conjonctives malignes rares, représentant environ 1% seulement des tumeurs solides malignes de l'adulte. On dénombre plus de 50 sous-types histologiques de tumeurs conjonctives, développés au sein des tissus mous ou des os. Cette grande variété rend les sarcomes difficiles à diagnostiquer et à traiter, malgré leur pronostic très souvent défavorable.

Les sarcomes des tissus mous (STS) sont regroupés en fonction de leur ligne de différenciation. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue onze types de différenciation parmi lesquelles les tumeurs de différenciation adipocytaire. Au sein de ce groupe, il existe des tumeurs bénignes très fréquentes, majoritairement représentées par les lipomes et des tumeurs malignes, appelées liposarcomes (LPS).

Dans le groupe des liposarcomes, la classification de l'OMS distingue cinq sous-types :

- Les tumeurs lipomateuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés
- Les liposarcomes dédifférenciés
- Les liposarcomes myxoïdes
- Les liposarcomes pléomorphes
- Les liposarcomes myxoïdes pléomorphes.

Parmi ces sous-types histologiques, nous nous intéresserons aux sous-types les plus fréquents : Tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) et Liposarcomes bien différenciés (LBD), constitués majoritairement d'adipocytes matures et les Liposarcomes dédifférenciés (LDD), caractérisés par une composante non lipogénique de haut grade de malignité.

## 1. Aspects cliniques et anatomopathologiques

### a. Distinction entre tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) et liposarcomes bien différenciés (LBD)

Regroupés dans le même sous-type car présentant le même aspect histologique, on distingue les tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) et les liposarcomes bien différenciés (LBD) en fonction de leur localisation anatomique.

Les TLA sont des tumeurs présentant seulement une agressivité locale, sans risque métastatique. Ce sont des tumeurs qui surviennent essentiellement au niveau des membres ou de la paroi du tronc. Ce type de tumeur est donc accessible à une exérèse chirurgicale complète, carcinologique. Par conséquent le terme de « tumeur lipomateuse atypique » est préférable à celui de « sarcome » pour ne pas entraîner un traitement disproportionné (radiothérapie, chirurgie mutilante telle qu'une amputation de membre).

Proposé pour la première fois en 1979, ce terme de TLA ne figurera officiellement qu'en 2013 dans la classification de l'OMS (Dei Tos AP and Pedetour F).

En résumé, les TLA correspondent à des LBD dont l'exérèse chirurgicale complète en monobloc a été réalisée.

### b. Caractéristiques cliniques et localisations anatomiques

Les TLA/LBD représentent 40 à 45% des LPS et sont donc le sous-type de LPS le plus fréquent (Sbaraglia M et al.) alors que les LDD sont plus rares. Dans 90% des cas, les LDD surviennent *de novo* alors que dans les 10% restants, ce sont des LBD récidivants ayant présenté une dédifférenciation secondaire (Dei Tos AP et al.).

Classiquement les TLA/LBD et LDD surviennent chez l'adulte et présentent un pic d'incidence au cours de la 6<sup>ème</sup> décennie, sans distinction de genre (sex ratio 1:1) (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.). D'exceptionnels cas pédiatriques ont toutefois été rapportés (Dadone et al., 2015)(Dadone-Montaudié et al., 2019).

Les TLA/LBD et LDD se développent le plus souvent dans les tissus mous dans une topographie profonde (classiquement sous-aponévrotique). Les sites préférentiels sont les suivants : la région

proximale des membres (fesses et cuisses), le rétropéritoine, le tronc et la région inguinale ou paratesticulaire (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.). La localisation rétropéritonéale est même très évocatrice de LBD ou LDD. D'autres sites sont également possibles, comme la région de la tête et du cou, le médiastin, les extrémités distales des membres ou encore la peau (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).

Ce sont des tumeurs indolores, de croissance lente et progressive (excepté en cas de dédifférenciation) pouvant devenir volumineuses tout en restant asymptomatiques (en particulier au niveau du rétropéritoine) (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).

Si les TLA/LBD et les LDD partagent des caractéristiques cliniques communes, leur évolution est en revanche différente.

En théorie, les TLA qui par définition sont des tumeurs dont la topographie permet une exérèse chirurgicale monobloc complète et donc curative, ne récidivent pas (Sbaraglia M et al.). En revanche, les LBD qui surviennent dans une localisation plus profonde notamment au niveau du rétropéritoine ou dans la région paratesticulaire présentent un risque de récurrence dans la mesure où leur exérèse complète est souvent difficile.

Avec les récurrences itératives, le risque de dédifférenciation augmente. Ce risque de dédifférenciation est estimé moins de 2% lorsque la tumeur est située au niveau des membres alors qu'il est estimé à plus de 20% lorsque la tumeur se trouve au niveau du rétropéritoine (Sbaraglia M et al.). Le taux de mortalité à 10 et 20 ans pour les TLA des membres est de 0% alors que celui des LBD du rétropéritoine est supérieur à 80% (Sbaraglia M et al.).

Pour les LDD, la fréquence des récurrences locales est supérieure à 40%, toutes localisations confondues (Dei Tos AP et al.). A noter que pour ce sous-type histologique, la localisation tumorale conditionne là encore le risque de récurrence et on estime qu'un LDD du rétropéritoine récidivera si le patient est suivi pendant suffisamment longtemps (10 à 20 ans) (Dei Tos AP et al.).

Dès lors qu'un contingent dédifférencié est identifié, le risque de métastase est présent. Toutefois, l'importance de ce contingent dédifférencié ne semble pas être prédictif de l'évolution (Dei Tos AP et al.).

Des métastases sont observées dans 15 à 20% des cas de LDD (Dei Tos AP et al.). Le taux de mortalité à 5 ans des LDD localement avancés ou métastatiques est de 28 à 30% (Dei Tos AP et al.).

***In fine*, pour les TLA/LBD et les LDD, le facteur pronostique majeur est donc la localisation tumorale (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).**

**Les LDD, malgré la présence d'un contingent dédifférencié de haut grade présentent une évolution clinique moins agressive que d'autres sarcomes de haut grade (Dei Tos AP et al.).**

### c. Caractéristiques anatomopathologiques

Macroscopiquement, les LBD et LDD correspondent le plus souvent à de volumineuses tumeurs, multinodulaires, de couleur jaunâtre dans les territoires bien différenciés et blanchâtre dans les territoires dédifférenciés. Certaines sont bien limitées et circonscrites par une fine capsule. Des remaniements nécrotiques peuvent être observés, notamment dans les tumeurs de localisation rétro-péritonéale (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).

Microscopiquement, les TLA/LBD et LDD se distinguent par l'absence (TLA/LBD) ou la présence (LDD) de territoires de dédifférenciation. On observe une grande variété d'aspects morphologiques entre les tumeurs de type TLA/LBD ou entre les tumeurs de type LDD ; de même, au sein d'une même tumeur, différents contingents morphologiques peuvent coexister.

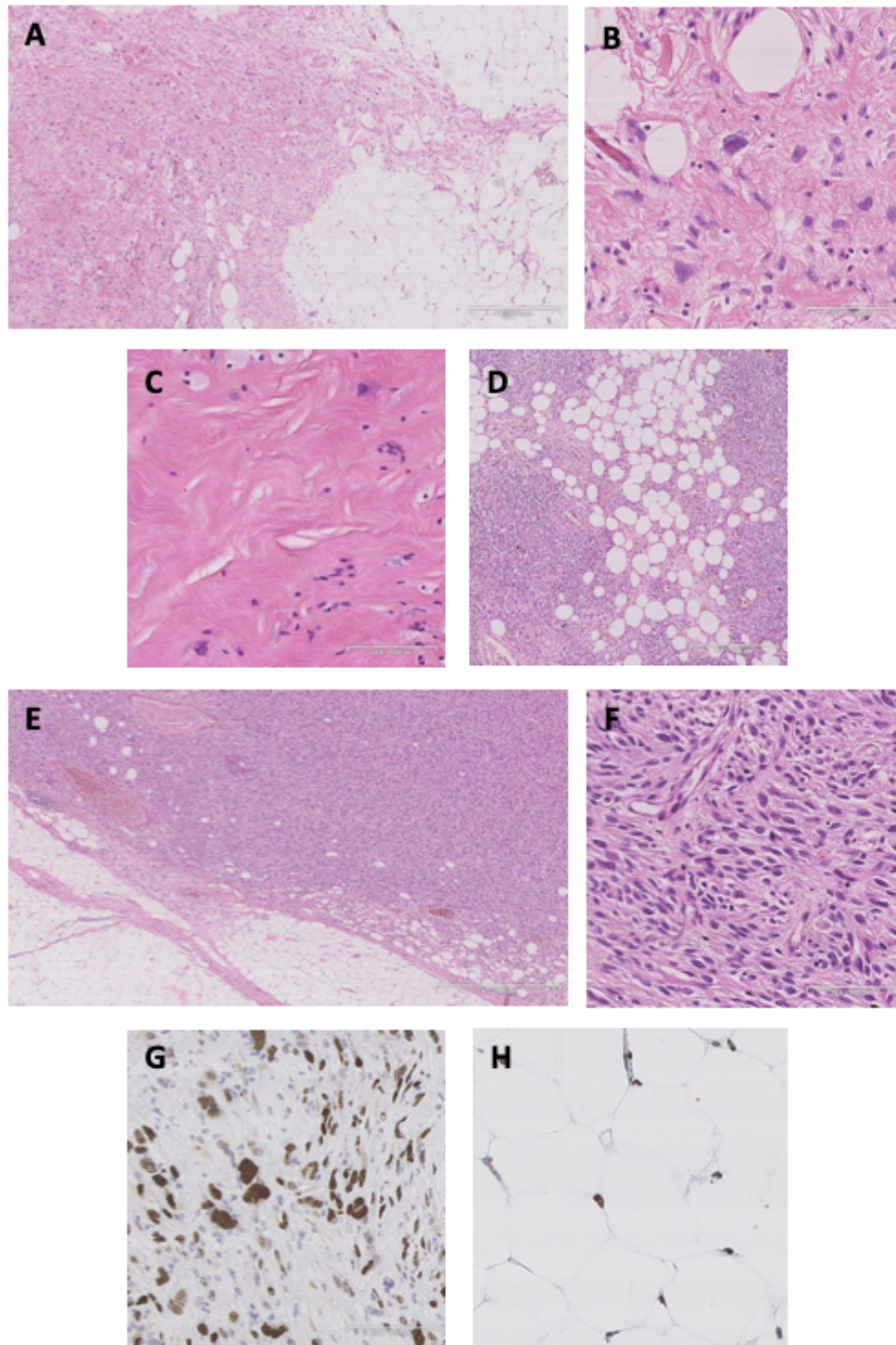
Les TLA/LBD sont constitués par une prolifération d'adipocytes matures caractérisés par une volumineuse vacuole intracytoplasmique refoulant le noyau en périphérie. Ces adipocytes présentent un certain degré de variabilité dans leur taille et leur forme. La présence d'atypies cytonucléaires avec des noyaux hyperchromatiques, à contours irréguliers est plus facile à mettre en évidence dans les cellules stromales des *septa* fibreux qu'au sein des territoires adipocytaires (Sbaraglia M et al.). Dans les territoires adipocytaires, la présence de lipoblastes avec des noyaux hyperchromatiques encochés par des vacuoles lipidiques est évocatrice du diagnostic de TLA/LBD. En revanche la présence de lipoblastes n'est ni requise au diagnostic de LPS, ni synonyme de LPS car ces lipoblastes peuvent être observés dans des tumeurs adipocytaires bénignes (Sbaraglia M et al.). Ces aspects adipocytaires bien différenciés et matures, lorsqu'ils sont majoritaires correspondent au sous-type de LBD « adipocytique ou *lipoma-like* », sous-type le plus fréquent (Sbaraglia M et al.) (**Figure 1**). Deux autres sous-types, moins fréquents sont également décrits : les LBD « sclérosants » et les LBD « inflammatoires ». Le sous-type « sclérosant » est caractérisé par une prolifération paucicellulaire de cellules stromales atypiques et hyperchromatiques associées à quelques adipocytes matures, répartis au sein d'une abondante

matrice fibreuse et collagénique (**Figure 1**). Ces LBD sclérosants sont essentiellement observés au niveau du rétropéritoine ou de la région paratesticulaire (Sbaraglia M et al.). Le sous-type « inflammatoire », le plus rare, survient le plus souvent au niveau du rétropéritoine. Il est caractérisé par un abondant stroma inflammatoire chronique, associant des lymphocytes, des plasmocytes, des histiocytes et des polynucléaires, le tout pouvant masquer le contingent de cellules tumorales (Sbaraglia M et al.) (**Figure 1**).

Les LDD sont caractérisés sur le plan morphologique par une transition entre des aspects morphologiques de TLA/LBD et des aspects sarcomateux (de haut grade le plus souvent), non adipocytaire ou lipogénique (Dei Tos AP et al.). Classiquement, les territoires sarcomateux de haut grade ont un aspect de sarcome pléomorphe indifférencié associant des cellules fusiformes ou pléomorphes de densité cellulaire élevée ou un aspect de myxofibrosarcome de grade intermédiaire ou de haut grade (Dei Tos AP et al.) (**Figure 1**). Certains LDD sont constitués non pas par des territoires sarcomateux de haut grade, mais par des territoires dédifférenciés de bas grade caractérisés par des faisceaux de cellules fusiformes modérément atypiques de densité cellulaire intermédiaire (Dei Tos AP et al.).

Les LDD peuvent présenter des territoires de différenciation hétérologue (myogénique, ostéosarcomateuse, chondrosarcomateuse, etc.) dans 5 à 10% des cas (Dei Tos AP et al.).

**Figure 1. Aspects microscopiques et immunohistochimiques des TLA/LBD et LDD.**



**Figure 1. Aspects microscopiques et immunohistochimiques des TLA/LBD et LDD.** A. Aspect d'un TLA/LBD de sous-type adipocytaire ou *lipoma-like*. B. Zoom sur la présence de cellules stromales atypiques dans les *septa* fibreux des TLA/LBD. C. LBD de sous-type sclérosant. D. LBD de sous-type inflammatoire. E. LDD avec transition abrupte entre le contingent bien différencié (en bas, à gauche) et le contingent dédifférencié (en haut, à droite). F. Zoom sur les cellules indifférenciées d'un LDD. G. Expression nucléaire de la protéine MDM2 (révélée par l'anticorps anti-MDM2 dans un LDD. H. Expression nucléaire de la protéine HMGA2 (révélée par l'anticorps anti-HMGA2 dans un LBD).

Même si corrélé au type histologique de LPS, un autre élément est à prendre en compte pour établir l'histopronostic de ces tumeurs et prédire leur évolution. En effet, l'anatomopathologiste établit un grade histopronostique à partir des aspects anatomopathologiques. Le système le plus reproductible, reconnu internationalement est celui proposé par le **Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer : le grade histopronostique de la FNCLCC**. Celui-ci repose sur la somme de trois critères : le degré de différenciation (de 1 à 3), l'index mitotique (de 1 à 3) et le pourcentage de nécrose (de 0 à 2)(**Tableau 1**).

En règle générale, les LBD sont de bas risque avec les critères suivants : différenciation, 1 ; index mitotique faible, 1 ; absence de nécrose, 0. En revanche, les LDD sont de risque intermédiaire ou élevé avec les critères suivants : différenciation, 3 ; index mitotique variable, de 1 à 3 ; remaniements nécrotiques variables, de 0 à 2.

**Tableau 1. Grade histopronostique de la FNCLCC.**

Critères	Description	
<b>Différenciation tumorale</b>	Score 1 : sarcomes ressemblant à un tissu adulte normal (ex. TLA/LBD)	
	Score 2 : sarcomes pour lesquels le diagnostic de type histologique est certain (ex. LPS myxoïde)	
	Score 3 : sarcomes embryonnaires, épithélioïdes, à cellules claires, indifférenciés, pour lesquels le type histologique est incertain	
<b>Index mitotique</b>	Score 1 : 0 à 9 mitoses pour 10 champs *	
	Score 2 : 10 à 19 mitoses	
	Score 3 : > 19 mitoses	
<b>Nécrose tumorale</b>	Score 1 : absence de nécrose	
	Score 2 : moins de 50% de nécrose	
	Score 2 : plus de 50% de nécrose	
<b>Grade 1 : scores 2-3</b>	<b>Grade 2 : scores 4-5</b>	<b>Grade 3 : scores 6-7-8</b>

\*1 champ mesure 0,1735mm<sup>2</sup>

Enfin sur le plan immunohistochimique (IHC), les **TLA/LBD et LDD présentent une positivité pour les marqueurs MDM2 et HMGA2 (Figure 1)** ; l'expression nucléaire des protéines MDM2 et HMGA2 étant la conséquence de l'amplification des gènes *MDM2* et *HMGA2* respectivement. En effet, dans l'immense majorité de cas, les TLA/LBD et LDD sont caractérisés par ces amplifications (Cf.§ Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires). Il est cependant important de noter que l'expression



nucléaire de la protéine HMGA2 en IHC peut également être induite par le réarrangement de ce gène, observé dans plus de la moitié des cas de lipomes.

**Une étude IHC avec l'anticorps anti-MDM2** est utile devant une tumeur sarcomateuse d'aspect indifférencié, à cellules fusiformes ou pléomorphes. **En cas de positivité nucléaire, intense et diffuse, il s'agit d'un élément fort d'orientation vers un diagnostic de LDD invitant à poursuivre les investigations avec des analyses cytogénétiques et moléculaires.** En revanche, ce marqueur est peu recommandé devant une tumeur adipocytaire mature, bien différenciée pour faire la distinction entre tumeur bénigne (lipome notamment) et tumeur maligne (TLA/LBD). En effet, l'anticorps anti-MDM2 est souvent d'interprétation délicate, avec une expression nucléaire hétérogène, absente de certaines cellules tumorales mais présente dans des cellules non tumorales comme les histiocytes des territoires cytotéatonécrotiques (Sbaraglia M et al.).

**Une étude IHC avec l'anticorps anti-HMGA2** est quant à elle utile devant une lésion adipocytaire bien différenciée et mature pour faire la **distinction entre une lésion tumorale sans préjuger du caractère bénin ou malin** (expression nucléaire dans les lipomes et dans les TLA/LBD) **et un tissu adipeux physiologique non tumoral.** Un autre intérêt à l'utilisation de cet anticorps est de **d'évaluer la qualité des marges d'exérèse chirurgicale** sur une résection de TLA/LBD. L'expression de ce marqueur sur une limite d'exérèse permet de classer la résection comme incomplète (de type R1) alors que l'absence d'expression sur une des limites permet de préciser que la limite d'exérèse est saine mais passant en territoire adipeux (viscéral, hypodermique...).

## 2. Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires

**TLA/LBD et LDD partagent une caractéristique cytogénétique et moléculaire commune qui est l'amplification du gène *MDM2*** (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).

Dans un contexte de tumeur adipocytaire bien différenciée et mature, cette amplification permet d'affirmer le diagnostic de TLA/LBD. Devant un sarcome des tissus mous d'aspect indifférencié à cellules fusiformes et pléomorphes, cette amplification permet d'affirmer le diagnostic de LDD. Il est important de noter que, d'après la dernière édition de la classification de l'OMS des tumeurs des tissus mous, cette amplification est mentionnée comme étant seulement un critère souhaitable mais non essentiel (Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.).

Cette anomalie génomique quantitative est facilement détectable par des techniques de routine telles que l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) ou encore l'Hybridation Génomique Comparative sur puce à ADN (CGH-array) (**Figure 2**). La technique de caryotype permet de détecter cette anomalie mais n'est plus réalisée en pratique courante car elle nécessite une mise en culture des cellules tumorales et donc des fragments de tumeur fraîche (**Figure 2**).

Figure 2. Analyses cytogénétiques et moléculaires pour la détection de l'amplification du gène *MDM2*.

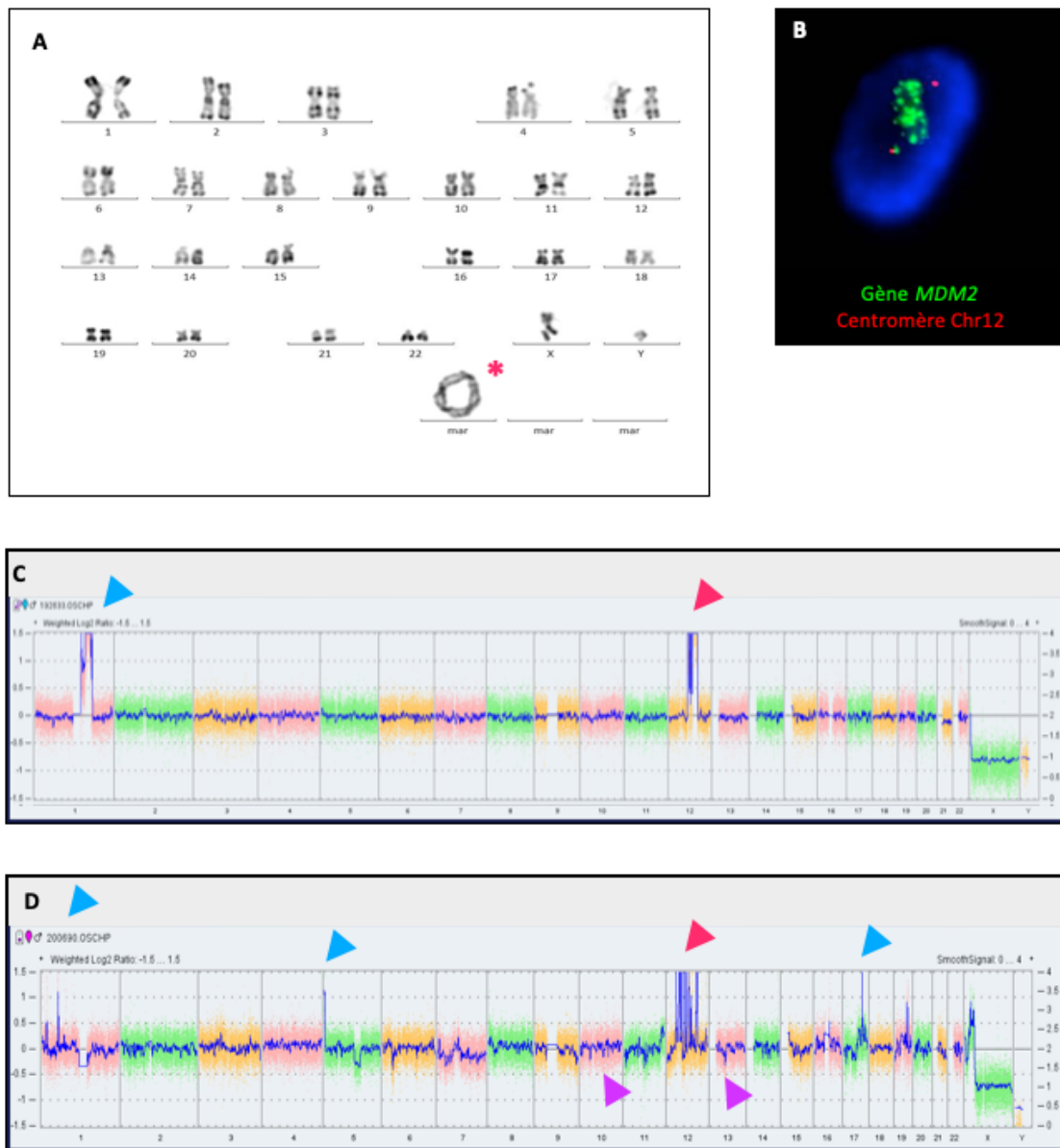


Figure 2. Analyses cytogénétiques et moléculaires pour la détection de l'amplification du gène *MDM2*. **A.** Caryotype d'un LBD de formule chromosomique : 47, XY, +r. Le chromosome surnuméraire en anneau (\*) comporte des séquences 12q. **B.** Technique d'Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH) montrant une amplification du gène *MDM2* (de plus de 20 copies, signal vert) en « cluster » avec deux copies du centromère du Chr12 (signal rouge). **C-D. Technique d'hybridation génomique comparative avec analyses des polymorphismes de séquences (CGH/SNP-array) :** **C.** LBD présentant un profil génomique quantitatif avec une amplification 12q incluant les gènes *MDM2*, *FRS2* et *HMGA2* (tête de flèche rouge), ainsi qu'une amplification 1q21 (tête de flèche bleue). **D.** LDD présentant un profil génomique quantitatif avec une amplification 12q incluant les gènes *CDK4*, *MDM2*, *FRS2* et *HMGA2* (tête de flèche rouge), ainsi que des amplifications 1p31-32, 5p15 incluant le gène *TERT* et 17q (têtes de flèches bleues). A noter également une perte des régions 10q incluant le gène *PTEN* et 13q incluant le gène *RB1* (têtes de flèches violettes). Ce profil présente davantage d'anomalies quantitatives que celui du LBD.

**Le support chromosomique de cette amplification du gène *MDM2* est dans l'immense majorité des cas un chromosome surnuméraire (néochromosome) pourvu d'un néocentromère soit un chromosome circulaire, en anneau soit un chromosome géant linéaire** (Pedeutour et al., 1993)(Pedeutour et al., 1994)(Sbaraglia M et al.)(Dei Tos AP et al.)(Italiano et al., 2009). Ce chromosome surnuméraire peut représenter la seule anomalie chromosomique identifiable sur un caryotype tumoral ou bien être associée à quelques rares autres anomalies de nombre et de structure, en particulier pour les LDD (Sandberg, 2004).

L'évènement cellulaire qui participerait à la tumorigenèse des LBD/LDD (100% des cas) et qui expliquerait en partie la présence de ces néochromosomes, est le **phénomène de chromothripsis** (Garsed et al., 2014)(Cortés-Ciriano et al., 2020). Ce terme désigne une « crise chromosomique massive » issue d'un évènement catastrophique dans la cellule. Ce chromothripsis se caractérise par des réarrangements génomiques complexes et massifs suite au réassemblage aléatoire de segments chromosomiques « pulvérisés ». Ce phénomène est généralement limité à un seul (ou quelques) chromosome(s). Il peut expliquer le nombre important de réarrangements chromosomiques en seulement quelques divisions cellulaires. Il est admis que ce phénomène contribue à l'amplification d'oncogènes (Garsed et al., 2014)(Cortés-Ciriano et al., 2020).

L'analyse de lignées cellulaires issues de LBD/LDD suggère que la formation de néochromosomes avec néocentromère, phénomène très rare dans les cellules tumorales, est un processus dynamique qui permet de mettre fin à cette « crise chromosomique » en stabilisant le chromosome dérivé, formé par plusieurs centaines de cycles de « *breakage-fusion-bridge* » de segments chromosomiques, suivi d'amplification d'oncogènes sous la pression sélective (notamment l'amplification du gène *MDM2*)(Garsed et al., 2014).

Ces chromosomes surnuméraires sont constitués de plusieurs séquences co-amplifiées issues du bras long du chromosome 12, à savoir la région 12q14-q15 incluant notamment le gène *MDM2*. Par conséquent, de nombreux gènes sont fréquemment co-amplifiés avec le gène *MDM2* (Italiano et al., 2008). C'est le cas des gènes *HMG2* (12q14.3), *CDK4* (12q14.1), *CPM* (12q15), *YEATS4* (12q15) et *FRS2* (12q15). D'autres régions chromosomiques sont également co-amplifiées et présentes sur ce chromosome surnuméraire, notamment les régions 1q21-q25 (Sbaraglia M et al.) dans les TLA/LBD et les régions 1p32.1 (incluant le gène *JUN*), 5p15.33 (incluant le gène *TERT*) ou encore 6q21-q24 (incluant le gène *MAP3K5*), dans les LDD mais non exclusivement (Dei Tos AP et al.) (**Figure 3**). De plus, les caryotypes et profils génomiques quantitatifs des LDD sont généralement plus complexes que ceux des TLA/LBD (Dei Tos AP et al.).

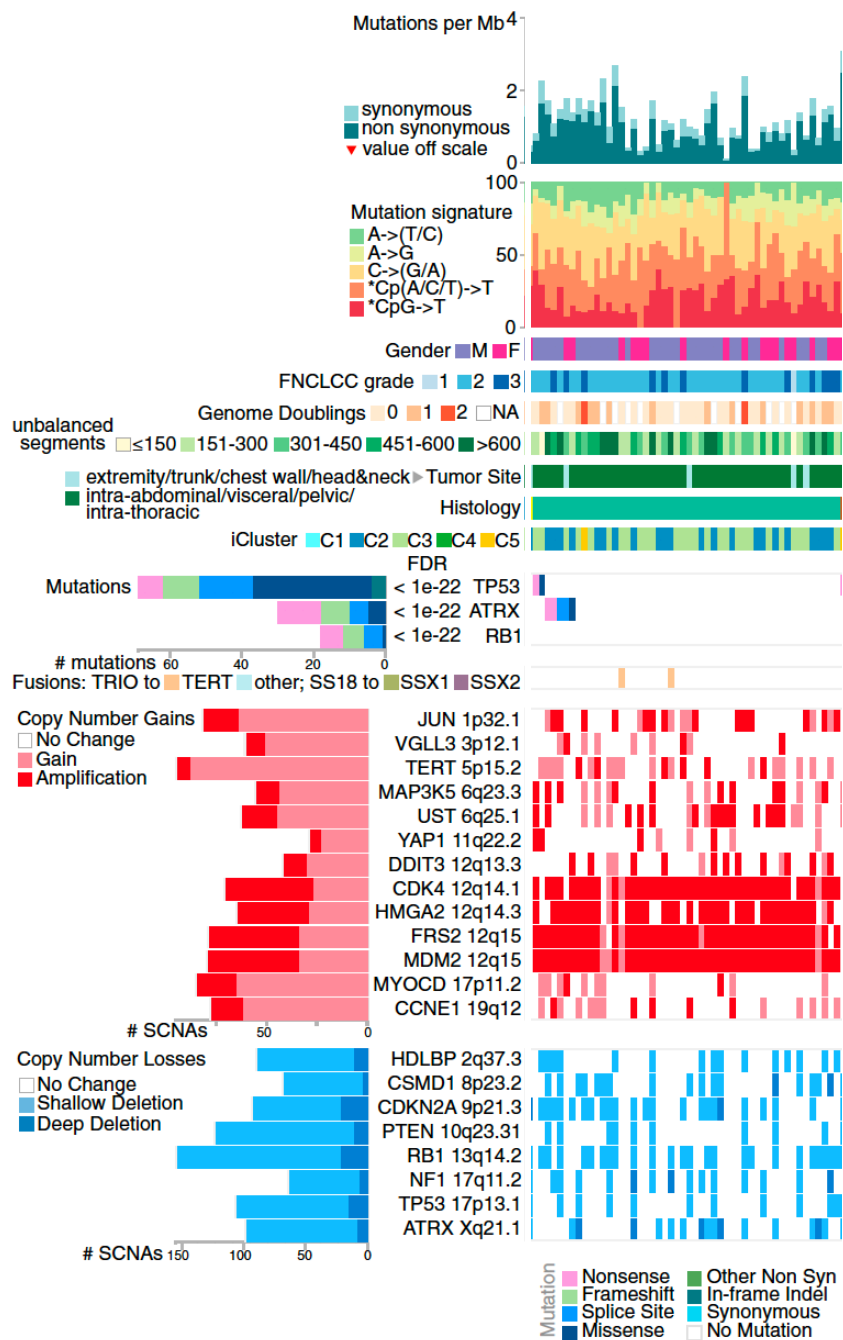
Quelques études ont porté sur l'analyse moléculaire exhaustive de plusieurs dizaines de cas de TLA/LBD et LDD par techniques de séquençage du génome ou de l'exome entier, par CGH/SNP-array et par techniques transcriptomiques.

**Parmi les anomalies quantitatives récurrentes, il était fréquemment détecté un gain ou une amplification des gènes *MDM2* (100% des cas), *CDK4* (92%), *HMG2* (76%)** (Barretina et al., 2010) (Kanojia et al., 2015) (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017), de même qu'un gain ou une amplification des gènes *FRS2* (96%) et *NAV3* (60%) (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017) ou encore des gènes *CPM*, *ERBB3*, *IGF2*, *UAP1*, mir557 et *IGF1R* (Kanojia et al., 2015). Une classe de gènes était fréquemment intéressée par ces amplifications récurrentes, celle des gènes codant pour des récepteurs tyrosine kinase (dans 32% des cas) (Asano et al., 2017). C'est le cas des gènes *DDR2* (amplifié dans 11% des cas de LBD/LDD), *ERBB3* (7%), *NTRK1* (5%), *FGFR3* (4%), *ROS1* (4%) ou *IGF1R* (2%) (Asano et al., 2017) (Kanojia et al., 2015). D'autres gènes associés à l'inhibition de la différenciation adipocytaire présentaient des altérations du nombre de copies (CNA) : *JUN* (42%), *DDIT3* (32%), *PTPRQ* (46%), *YAP1* (16%) et *CEBPA* (24%) (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017). Des délétions récurrentes étaient également observées mêmes si moins fréquentes. Elles intéressaient les gènes *ATRX* (10% des cas de topographie profonde et 20% des cas de topographie plus superficielle), *NF1* (6 et 22%) et *CDKN2A* (2 et 42%) (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017) ou encore les gènes *RUNX3*, *ARID1A*, *ATM* et *CHEK1* (Kanojia et al., 2015).

Si les anomalies quantitatives sont fréquentes et récurrentes dans les LBD/LDD, les **mutations sont peu fréquentes, avec un taux de mutations de 1,1 par mégabases (Mb) ou Tumor Mutational Burden (TMB)** (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017) (Sanchez-Vega et al., 2018) (Asano et al., 2017) (**Figure 3**). Ces événements rares intéressent les gènes suivants : *TP53* (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017) (Kanojia et al., 2015) (Asano et al., 2017) (Hirata et al., 2019), *ATRX* (Cancer Genome Atlas Research Network., 2017) (Hirata et al., 2019), ou *NF1*, *PLEC*, *FAT3*, *CHEK2*, *MDC1* (Kanojia et al., 2015) ou *KIT*, *FGFR1*, *ARID1A*, *CHEK2*, *ROCK1* (Asano et al., 2017) ou encore *MUC16*, *TTN*, *TRHDE*, *PCLO*, *ZNF717*, *FLG*, *NAV3* (Hirata et al., 2019).

Concernant les **voies de signalisation oncogénique impliquées dans la liposarcomagenèse**, une étude a confirmé l'implication fréquente (> 80% des cas de LDD, n=46) des voies du cycle cellulaire et de P53, avec l'amplification récurrente des gènes *CDK4* et *MDM2*, respectivement (Sanchez-Vega et al., 2018). Dans une autre étude, ce sont les voies de signalisation des MAP Kinases, ERBB, JAK-STAT, Wnt, de l'apoptose et du cycle cellulaire qui sont associées à la liposarcomagenèse (Kanojia et al., 2015).

Figure 3. Altérations moléculaires dans les LDD d'après les données du TCGA.

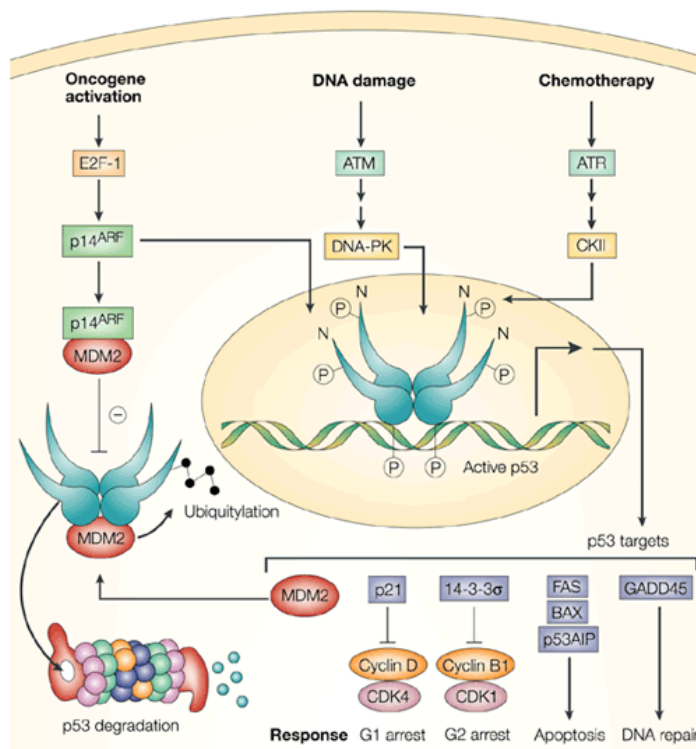


D'après The Cancer Genome Atlas Research Network. *Cell*.2017;171:950–965

D'un point de vue fonctionnel, le gène *MDM2* régule négativement le gène *TP53* qui est un gène suppresseur de tumeur. Le rôle de la protéine MDM2 est d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 et d'entraîner la translocation de p53 depuis le noyau vers le cytoplasme. MDM2 étant une E3 ubiquitine ligase, MDM2 entraîne l'ubiquitination de p53 et donc la dégradation de p53 par le protéasome. En dégradant p53, MDM2 inhibe la transcription de gènes cibles de p53 et donc MDM2 inhibe notamment l'effet pro-apoptotique de p53 (**Figure 4**)(Bullock and Fersht, 2001). A noter que MDM2 est transcriptionnellement régulé par p53 ; p53 est donc capable de déclencher son autodestruction par une boucle de rétrocontrôle négative. En conditions physiologiques, MDM2 et p53 s'autorégulent et sont capables de contrôler leur niveau d'expression intracellulaire.

En conditions pathologiques, l'amplification du gène *MDM2* entraîne un niveau très élevé de la protéine au niveau intracellulaire, dépassant les mécanismes d'autorégulation des deux protéines. La protéine p53 sauvage est donc constamment négativement régulée.

**Figure 4. Aspects fonctionnels de la voie p53.**



D'après Bullock and Fersht. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1:68-76



La voie de signalisation de P53 peut être altérée par une mutation du gène *TP53*, dans de rares cas de LBD/LDD et notamment dans les cas de syndrome de Li-Fraumeni, syndrome de prédisposition à de multiples cancers et notamment aux sarcomes (ostéosarcomes, rhabdomyosarcomes, liposarcomes ou en encore leiomyosarcomes, LMS), causé par une mutation constitutionnelle du gène *TP53* (Malkin D et al.).

### 3. Prise en charge thérapeutique des liposarcomes

#### Traitements standards des stades localisés

Dans les stades localisés, la prise en charge thérapeutique repose sur la **chirurgie avec des marges carcinologiques**. Dans les localisations rétropéritonéales, la question des marges de résection est toujours débattue avec le risque élevé de récurrence locale (Lee et al., 2018).

**Dans les localisations profondes des membres, pour des LDD de haut grade selon la classification de la FNCLCC, les patients peuvent bénéficier d'une radiothérapie adjuvante ou néoadjuvante** (Lee et al., 2018).

Concernant la radiothérapie rétropéritonéale, **l'essai STRASS** (essai multicentrique international, randomisé, de phase III) a étudié les effets de la radiothérapie pré-opératoire dans les sarcomes du rétropéritoine avec pour objectif primaire la survie sans récurrence abdominale (Bonvalot et al., 2019). 266 patients ont été inclus dans l'essai dont 75% de LPS, 14% de léiomyosarcomes et 11% d'autres types histologiques. Après une médiane de suivi de 43 mois, la survie sans récurrence abdominale à 3 ans dans le groupe radiothérapie pré-opératoire *versus* chirurgie était de 60,4% et de 58,7% (HR=1,01, 95%IC0,71-1,44, p=0,954), respectivement (Bonvalot et al., 2019). Mais l'analyse en sous-groupe des **patients porteurs d'un LPS montrait un bénéfice en termes de survie sans récurrence abdominale chez ces patients** (Bonvalot et al., 2019).

#### Traitements standards des stades avancés

Les LBD/LDD ne figurent pas parmi les STS de plus mauvais pronostic. Toutefois, une maladie localement non résecable ou la survenue de métastases sont associées à une évolution défavorable.

Une problématique majeure dans le traitement systémique des STS repose sur la rareté et la grande hétérogénéité des sarcomes. Par conséquent, de nombreuses études incluent des patients

présentant des STS tous types histologiques confondus ; l'efficacité des molécules testées est donc assez variable. Parmi les agents cytotoxiques utilisés dans la prise en charge des STS, on retiendra la doxorubicine, l'ifosfamide, la dacarbazine, la gemcitabine et le docétaxel (Ratan and Patel, 2016). Ces molécules peuvent être utilisées seules ou en combinaison.

Dans une étude rétrospective portant sur 488 patients porteurs de STS de stades avancés, traités par chimiothérapie en première ligne (doxorubicine en monothérapie ou en association à l'ifosfamide), le sous-type histologique « liposarcome (LPS) » était associé à une meilleure survie globale que les autres STS (Karavasilis et al., 2008). En analyse univariée, la médiane de survie globale était de 18 mois ( $p < 0,001$ ) et en analyse multivariée, ce sous-type était un facteur de meilleur pronostic (HR=0,70, 95%IC 0,50-0,98,  $p=0,03$ ) (Karavasilis et al., 2008).

**Même si les protocoles associant doxorubicine et ifosfamide demeurent les plus efficaces et les plus utilisés en première ligne** (et ce depuis les années 1970), ils ne sont pas curatifs et présentent des bénéfices limités (Ratan and Patel, 2016) (Young et al., 2017). C'est pourquoi d'autres molécules de chimiothérapie ont été développées. **Depuis les années 2010, deux nouveaux traitements viennent compléter l'arsenal thérapeutique et sont validés dans la prise en charge des liposarcomes : la trabectédine et l'eribuline** (Ratan and Patel, 2016).

Dans un essai de phase III multicentrique, la trabectédine, un dérivé alcaloïde, a montré son efficacité dans le traitement des LPS avancés après échec de la chimiothérapie classique par rapport à l'utilisation de dacarbazine, en termes de survie sans progression. La médiane de survie sans progression était de 4,2 versus 1,5 mois dans le bras trabectédine versus dacarbazine (HR=0,55, 95%IC 0,44-0,70,  $p < 0,001$ ) (Demetri et al., 2016). Cependant, l'objectif primaire de l'étude à savoir l'amélioration de la survie globale n'était pas atteint, avec des médianes de survie globale de 12,4 *versus* 12,9 mois dans les bras trabectédine ou dacarbazine, respectivement (Demetri et al., 2016).

Quant à l'eribuline, un poison des microtubules entraînant l'arrêt du cycle cellulaire, son bénéfice par rapport à l'utilisation de dacarbazine a été démontré en terme de survie globale dans un essai randomisé de phase III chez des patients porteurs de LPS ou de léiomyosarcomes avancés, en échec (Schöffski et al., 2016). Ce bénéfice était d'ailleurs essentiellement observé chez les patients porteurs de LPS. La médiane de survie globale était de 15,6 *versus* 8,4 mois dans le groupe eribuline *versus* dacarbazine (HR = 0,51, 95%IC 0,35-0,78,  $p=0,0015$ )(Demetri et al., 2017).

En revanche dans un essai de phase II, le pazopanib, un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) non spécifique utilisé dans les STS avancés, ne présentait pas d'efficacité dans le sous-groupe des LPS avancés et a donc été exclu de l'essai de phase III (van der Graaf et al., 2012). D'autres ITK non

spécifiques, notamment le sunitinib, le sorafenib et le regorafenib, ont montré une faible efficacité dans le traitement des LPS avancés au cours d'essais de phase II (Mahmood et al., 2011)(von Mehren et al., 2012)(Mir et al., 2016).

### **Nouvelles stratégies thérapeutiques : thérapies ciblées et immunothérapie**

**Une cible thérapeutique qui suscite l'intérêt dans les LBD et LDD de stades avancés est l'amplification de l'oncogène *MDM2* qui résulte en la surexpression de la protéine**, présente dans 100% des cas de LBD/LDD. L'objectif est d'antagoniser l'interaction MDM2-P53 et de restaurer l'activité pro-apoptotique de la protéine P53 sauvage. Rappelons que la protéine P53 sauvage est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, la réparation de l'ADN et l'apoptose (**Figure 4**).

**Plusieurs classes de molécules capables d'inhiber la protéine MDM2 sont en cours de développement** (Vassilev et al., 2004)(Bill et al., 2016a) (Wagner et al., 2017). Parmi ces antagonistes de MDM2, on distingue en particulier des inhibiteurs de l'interaction MDM2-P53 (notamment la classe des nutlines) et des inhibiteurs de l'activité E3 ubiquitine ligase de MDM2.

En 2004, la première classe d'antagonistes de MDM2 découverte est celle des nutlines, petites molécules de la famille des cis-imidazolines capables d'inhiber l'interaction MDM2-P53 (Vassilev et al., 2004). La preuve de concept de l'effet d'un analogue de la nutlin-3a (RG7112) chez des patients atteints de LBD/LDD a été démontrée dans une étude portant sur 19 patients traités par RG7112 en néoadjuvant, avec pour résultats la mise en évidence de l'activité anti-tumorale : un patient en réponse partielle et 14 patients avec une maladie stable (Ray-Coquard et al., 2012). Citons également le RG7388 (idasanutline) qui fait partie de la seconde génération de nutlines et qui présente une plus grande sélectivité et efficacité que le RG7112 (Ding et al., 2013).

**Autre cible thérapeutique qui découle de la génomique des LBD/LDD, l'amplification du gène *CDK4***, présente dans plus de 90% des cas de LDD. L'objectif est de rétablir le point de contrôle du cycle cellulaire des phases G1/S.

Dans un essai de phase II sur l'effet du palbociclib dans le traitement des LBD/LDD de stades avancés, il a été montré une médiane de survie sans progression de 17,9 mois (95%IC 42,4-68,8%) avec une réponse complète (Dickson et al., 2016). D'autres inhibiteurs de CDK4/6, le ribociclib et l'abemaciclib, sont en cours d'investigations dans des essais cliniques (Infante et al., 2016)(Patnaik et al., 2016).

D'autres cibles moléculaires sont également à l'étude comme les récepteurs suivants : MET (aussi appelé *hepatocyte growth factor receptor*) (Bill et al., 2015), IGF1R (*insulin like growth factor 1 receptor*)(Asano et al., 2017) ou encore KIT (Kanojia et al., 2017).

**Le potentiel thérapeutique de l'immunothérapie a également été analysé dans le traitement des sarcomes de stades avancés.** Dans l'étude multicentrique de phase II sur l'effet du pembrolizumab (SARC028), sur 40 patients atteints de STS, dont 10 avec une histologie de LPS, les auteurs objectivaient deux patients en réponse partielle (20%), 4 patients avec une maladie stable (40%) et 4 patients en progression (40%) (Tawbi et al., 2017). La plupart des patients en réponse intéressait les types histologiques « sarcome pléomorphes indifférenciés, UPS » et « LDD » (Tawbi et al., 2017). Pour confirmer ces résultats, une autre étude est en cours avec des cohortes d'expansion sur ces sous types de STS. De plus, l'étude du microenvironnement tumoral révèle que les sous-types de sarcomes (parmi les LDD, les léiomyosarcomes et les UPS) de meilleur pronostic et avec une meilleure réponse au pembrolizumab sont caractérisés par la présence de structures lymphoïdes tertiaires (TLS), riches en lymphocytes B (Petitprez et al., 2020).

**Un défi majeur dans la prise en charge des tumeurs malignes, est l'identification de « biomarqueurs »,** en tant qu'indicateur objectivement mesurable ou évaluable d'un processus pathogène, qui influence ou prédit l'incidence ou l'évolution d'une maladie (Strimbu and Tavel, 2010)(Bill et al., 2016b). Dans le cas particulier les LBD/LDD, ces biomarqueurs pourraient aider au diagnostic de récurrence avant sa détection radiologique (dépistage secondaire) ou pourraient aider à l'établissement d'un pronostic des LBD/LDD qui vont évoluer défavorablement (en dehors des facteurs pronostiques déjà connus comme la localisation primitive ou la qualité de la résection) ou encore des biomarqueurs qui pourraient prédire la réponse à une thérapie ciblée.

## Ce qu'il faut retenir

- Les tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) / Liposarcomes bien différenciés (LBD) et les Liposarcomes dédifférenciés (LDD) sont les sous-types de liposarcome **les plus fréquents**.
- **TLA/LBD et LDD partagent des caractéristiques communes** : ils surviennent le plus souvent dans la sixième décennie, dans les localisations suivantes : les membres (topographie profonde sous-aponévrotique), le rétropéritoine, la région paratesticulaire. Les TLA/LBD et LDD sont caractérisés par une anomalie moléculaire récurrente, l'amplification de la région 12q incluant le gène *MDM2*.
- Malgré ces points communs, le pronostic des TLA/LBD et LDD est très différent et lié entre autres à l'aspect morphologique. Les TLA/LBD sont constitués les plus souvent d'une prolifération adipocytaire mature. En revanche, les LDD présentent des territoires de dédifférenciation correspondant à des territoires de haut grade. **Par conséquent, leurs profils cliniques évolutifs sont très distincts : alors que les TLA/LBD ne présentent pas de risque métastatique, le risque métastatique des LDD atteint 15 à 20% des cas, avec un taux de mortalité à 5 ans de 30%.**
- Le traitement des stades localisés repose sur la chirurgie associée au non à une radiothérapie dans les cas de LDD localisés au membre.
- Le traitement des stades avancés ou métastatiques consiste en l'utilisation de protocoles de chimiothérapies (notamment doxorubicine, ifosfamide, ou de molécules plus récentes, trabectedine ou eribuline). Les thérapies ciblées (antagonistes de MDM2 notamment) sont en voie de développement.

## Les problématiques soulevées

- A ce jour, la prise en charge des LBD ou LDD avancés ou métastatiques repose sur l'utilisation de **protocoles de chimiothérapies peu efficaces** et les **nouvelles thérapies ciblant l'amplification des gènes MDM2 ou CDK4 sont encore en cours de développement**.
- Il est nécessaire de **proposer de nouvelles cibles thérapeutiques** dans la prise en charge de ces tumeurs qui comptent parmi les types histologiques de STS les plus fréquents.
- La **découverte de biomarqueurs** susceptibles de prédire l'évolution de ces tumeurs ou leur réponse à une thérapie ciblée fait également partie des défis à relever.

## INTRODUCTION PARTIE II

### La Voie De Signalisation Du *Fibroblast Growth Factor* (FGF) /

#### *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR)

---

La voie de signalisation *Fibroblast Growth Factor* (FGF)/ *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) joue un rôle crucial et ubiquitaire dans de nombreux processus biologiques. Notamment, par l'intermédiaire de ses ligands (FGFs) et de ses récepteurs (FGFRs), elle est impliquée dans la régulation de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la motilité cellulaires durant l'embryogenèse et l'organogenèse. Chez l'adulte, cette voie contribue à l'homéostasie en participant à la maintenance des tissus, à la réparation et à la régénération tissulaire ainsi qu'au métabolisme. La voie FGF/FGFR est également impliquée dans la cancérogenèse (Cf § II.6).

#### 1. Les *Fibroblast Growth Factors* (FGFs)

Chez les mammifères, on dénombre 22 *Fibroblast Growth Factors* (FGFs). Ces FGFs sont impliqués dans des processus biologiques fondamentaux, notamment au cours du développement ou dans la régulation de certains métabolismes (Ornitz and Itoh, 2015)(Beenken and Mohammadi, 2009).

Parmi eux, il existe **18 ligands FGFs**, c'est-à-dire 18 protéines qui participent à l'activation de la voie de signalisation en se fixant sur les récepteurs au *Fibroblast Growth Factor* (FGFR). Ce sont les **FGF1 à FGF10** et les **FGF16 à FGF23**. Ces 18 ligands FGFs sont aussi appelés **FGFs sécrétés** (Ornitz and Itoh, 2015)(Beenken and Mohammadi, 2009). Ils sont détaillés ci-après.

Les autres FGFs, non sécrétés, **FGF11 à FGF14** sont des facteurs intracellulaires, homologues aux FGF (présentant un haut degré de ressemblance avec les autres FGF) mais sans activité sur les récepteurs FGFRs. Ces **FGFs intracellulaires** interagissent avec les canaux sodiques voltage-dépendant (Ornitz and Itoh, 2015)(Beenken and Mohammadi, 2009). A ce jour, il n'a pas été mis en évidence d'interaction entre ces FGFs intracellulaires et les FGFRs. N'ayant pas un rôle majeur dans la voie de

signalisation FGF/FGFR, ces FGFs ne seront pas détaillés. Quant au FGF15, il correspond à l'orthologue souris du FGF19 humain (et des autres vertébrés).

#### a. Les familles et sous-familles de FGFs sécrétés

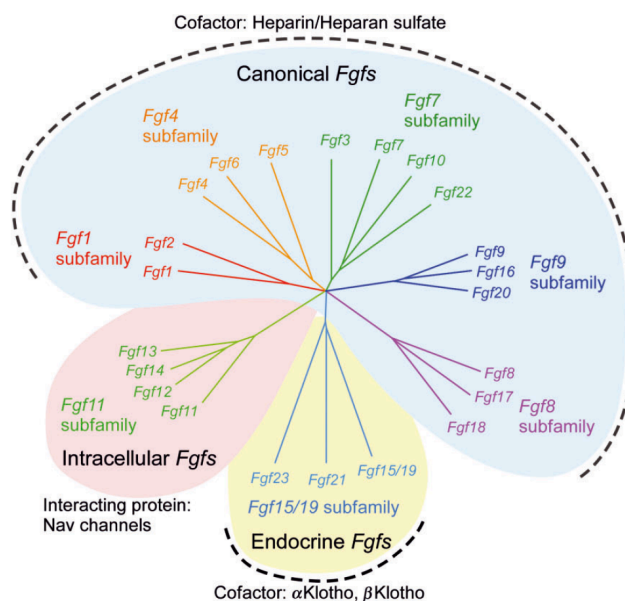
Parmi les 18 ligands FGFs sécrétés (FGF1-FGF10 et FGF16-FGF23), on distingue 6 familles, selon leurs fonctions biochimiques, leurs homologies de séquences et leurs phylogénèses :

- FGF1, FGF2
- FGF3, FGF7, FGF10, FGF22
- FGF4, FGF5, FGF6
- FGF8, FGF17, FGF18
- FGF9, FGF16, FGF20
- FGF19, FGF21, FGF23

Ces 6 familles de FGFs sécrétés sont elles-mêmes réparties en **deux sous-familles** : les **FGFs paracrines (aussi appelés canoniques)**, représentés par les 5 premières familles et les **FGFs endocrines**, représentés par la dernière famille (**Figure 5**).

La localisation chromosomique des gènes qui codent pour ces protéines est détaillée dans le **Tableau 2**.

**Figure 5. Les différentes familles et sous-familles de FGFs.**



D'après Ornitz and Itoh. Dev Biol 2015, 4:215–266 (Ornitz and Itoh, 2015)

**Tableau 2. Liste des FGFs et FGFRs et localisation chromosomique.**

Chromosomes	FGF/FGFR (région chromosomique)
Chromosome 4	<i>FGFR3</i> (4p16.3) - <i>FGF5</i> (4q21.21) - <i>FGF2</i> (4q27)
Chromosome 5	<i>FGF10</i> (5p12) - <i>FGF1</i> (5q31.3) - <i>FGF18</i> (5q35.1) - <i>FGFR4</i> (5q35.2)
Chromosome 8	<i>FGF20</i> (8p22) - <i>FGF17</i> (8p21.3) - <i>FGFR1</i> (8p11.23)
Chromosome 10	<i>FGF8</i> (10q24.32) - <i>FGFR2</i> (10q26.13)
Chromosome 11	<b>Cluster</b> : <i>FGF19</i> (11q13.3) - <i>FGF4</i> (11q13.3) - <i>FGF3</i> (11q13.3)
Chromosome 12	<b>Cluster</b> : <i>FGF23</i> (12p13.32) - <i>FGF6</i> (12p13.32)
Chromosome 13	<i>FGF9</i> (13q12.11)
Chromosome 15	<i>FGF7</i> (15q21.2)
Chromosome 19	<i>FGF21</i> (19q13.33) - <i>FGF22</i> (19p13.3)
Chromosome X	<i>FGF16</i> (Xq21.1)

#### b. La structure des FGFs sécrétés (paracrines et endocrines)

Les gènes *FGF* (*FGF1-FGF10* et *FGF16-FGF23*) codent pour des protéines monomériques de 20 à 30 kDa, comportant environ 150 à 300 acides aminés. Ces protéines FGFs présentent des différences significatives en termes de taille et de séquence. Toutefois, ils contiennent un domaine homologue constitué d'environ 120 acides aminés qui se situe entre les extrémités C- et N-terminales.

La plupart de ces FGFs possède un peptide signal, clivable, à l'extrémité N-terminale (à l'exception des sous-familles *FGF1* et *FGF9*). En effet, les FGFs étant des protéines sécrétées, ils contiennent cette région du peptide signal, qui correspond à un signal d'adressage. Ce signal permet le passage de la protéine à travers une membrane. Ce peptide est généralement clivé au cours de la sécrétion et donc absent dans la protéine mature.

#### c. Le rôle des FGFs sécrétés (paracrines et endocrines)

Le rôle des FGFs sécrétés est donc de se lier à un récepteur au FGF pour permettre son activation. Selon les sous-familles, ces ligands sont susceptibles de se lier à plusieurs FGFRs (et à des isoformes différentes des FGFRs, **Tableau 3**) (Ornitz and Itoh, 2015).



Leur rôle physiologique est détaillé dans le **Tableau 3** (Beenken and Mohammadi, 2009). La perte de fonction totale de la protéine (par *knockout* chez la souris) peut être létale ; c'est le cas pour FGF4, FGF8, FGF16 (létalité embryonnaire) ou encore FGF9 (décès post natal). Pour d'autres FGFs, la perte de fonction totale entraîne des anomalies sévères dans le développement (Beenken and Mohammadi, 2009).

### **Les FGFs paracrines (aussi appelés canoniques)**

#### ***La sous-famille FGF1***

Elle comprend **FGF1** (aussi appelé FGF acide) et **FGF2** (aussi appelé FGF basique). Ces FGFs ne présentent pas de peptide signal, mais peuvent néanmoins être relargués dans la matrice extracellulaire par des cellules endommagées ou être sécrétés de façon inhabituelle, en réaction à un stress cellulaire. Une hypothèse avancée quant à cette sécrétion inhabituelle serait une exocytose indépendante du système du réticulum endoplasmique-appareil de Golgi, par relargage après un dommage cellulaire. Ces FGFs ont également la capacité d'être transloqués dans le noyau des cellules.

FGF1 participe à la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation, de la survie et de l'apoptose. **FGF1 est le seul ligand FGF à pouvoir activer toutes les isoformes des FGFRs (Ornitz and Itoh, 2015).**

#### ***La sous-famille FGF4***

Elle comprend **FGF4**, **FGF5** et **FGF6**. Ces FGFs possèdent un peptide signal, clivable, en N-terminal.

#### ***La sous-famille FGF7***

Elle comprend **FGF7**, **FGF3**, **FGF10** et **FGF22**. Ces FGFs possèdent un peptide signal, clivable, en N-terminal.

#### ***La sous-famille FGF8***

Elle comprend **FGF8**, **FGF17** et **FGF18**. Ces FGFs possèdent un peptide signal, clivable, en N-terminal.

### ***La sous-famille FGF9***

Elle comprend **FGF9**, **FGF16** et **FGF20**. Ces FGFs ne présentent pas de peptide signal, mais possèdent une séquence interne, non clivable, ayant des fonctions similaires et permettant la sécrétion et le transport de ces FGFs.

Ces FGFs « paracrines » fonctionnent donc à proximité de la cellule qui les sécrète. Ils requièrent la présence de cofacteurs extracellulaires pour se lier à leur FGFR : **les protéoglycanes de type « heparan sulfate »** pour lesquels ils présentent une forte affinité (Cf §. II3a).

**Ces FGFs paracrines jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et chez l'adulte, dans les processus d'homéostasie (réparation et remodelage des tissus).**

### **Les FGFs endocrines**

Il s'agit de la **sous-famille FGF19**, qui comprend FGF19 (ou FGF15 chez les rongeurs), **FGF21** et **FGF23**.

Contrairement aux FGFs paracrines, ces FGFs endocrines présentent intrinsèquement une faible affinité avec les protéoglycanes de type « heparan sulfate » et peuvent se libérer de la matrice extracellulaire et agir de façon endocrine, c'est-à-dire à distance via la circulation sanguine, comme des hormones. Ces FGFs endocrines nécessitent la présence de **cofacteurs de la famille klotho pour interagir avec leurs récepteurs**.

Des études *in vivo* ont mis en évidence que FGF21 régule le métabolisme des hépatocytes et des adipocytes via FGFR1 et  $\beta$ -Klotho alors que FGF19 activait FGFR4 et régule le métabolisme des hépatocytes. Quant à FGF23, il régule le métabolisme du phosphate en contrôlant sa réabsorption par les tubules proximaux du rein.

**Ces facteurs endocrines jouent un rôle essentiel dans la régulation des métabolismes des phosphates, des acides biliaires, du glucose et des lipides (Ornitz and Itoh, 2015).**

**Tableau 3. Spécificités et rôles physiologiques des FGFs.**

Sous-famille	FGF	Liaison aux FGFRs	Rôle physiologique
FGF1	FGF1	Toutes les isoformes des FGFRs	Morphogenèse, angiogenèse, régulation de plusieurs métabolismes
	FGF2	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR1b, FGFR4	Morphogenèse, angiogenèse, régulation de plusieurs métabolismes
FGF4	FGF4	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	Développement des membres et formation des valves cardiaques
	FGF5		Régulation de la croissance des cheveux
	FGF6	Myogenèse	
FGF7	FGF3	FGFR2b + FGFR1b (FGF3 et FGF10)	Développement de l'oreille interne
	FGF7		Morphogenèse
	FGF10		Morphogenèse
	FGF22		Organisation neuronale présynaptique
FGF8	FGF8	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	Développement des membres, du cerveau, des yeux et des oreilles
	FGF17		Développement du cerveau et du cervelet
	FGF18		Développement des os
FGF9	FGF9	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3b et FGFR3c, FGFR4	Organogenèse et développement des gonades
	FGF16		Développement du coeur
	FGF20		Facteur neurotrophique
FGF19	FGF19 (FGF15)	FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c, FGFR4	Homéostasie des acides biliaires et lipolyse
	FGF21	FGFR1c, FGFR3c	Homéostasie du glucose, lipolyse et lipogenèse
	FGF23	FGFR1c, FGFR3c, FGFR4	Homéostasie du phosphate et de la vitamine D

D'après les références Ornitz and Itoh, 2015 et Breenken and Mohammadi 2009

A noter que certains FGFs sécrétés peuvent être internalisés dans le cytoplasme puis transloqués dans le noyau des cellules (à partir de l'endocytose des complexes FGF/FGFR activés et à partir de sources endogènes de ligands FGFs). Par exemple, FGF1 et FGF2 sont connus pour être transloqués dans le noyau et être capables d'activer des facteurs de transcription (directement ou par l'intermédiaire d'autres molécules).

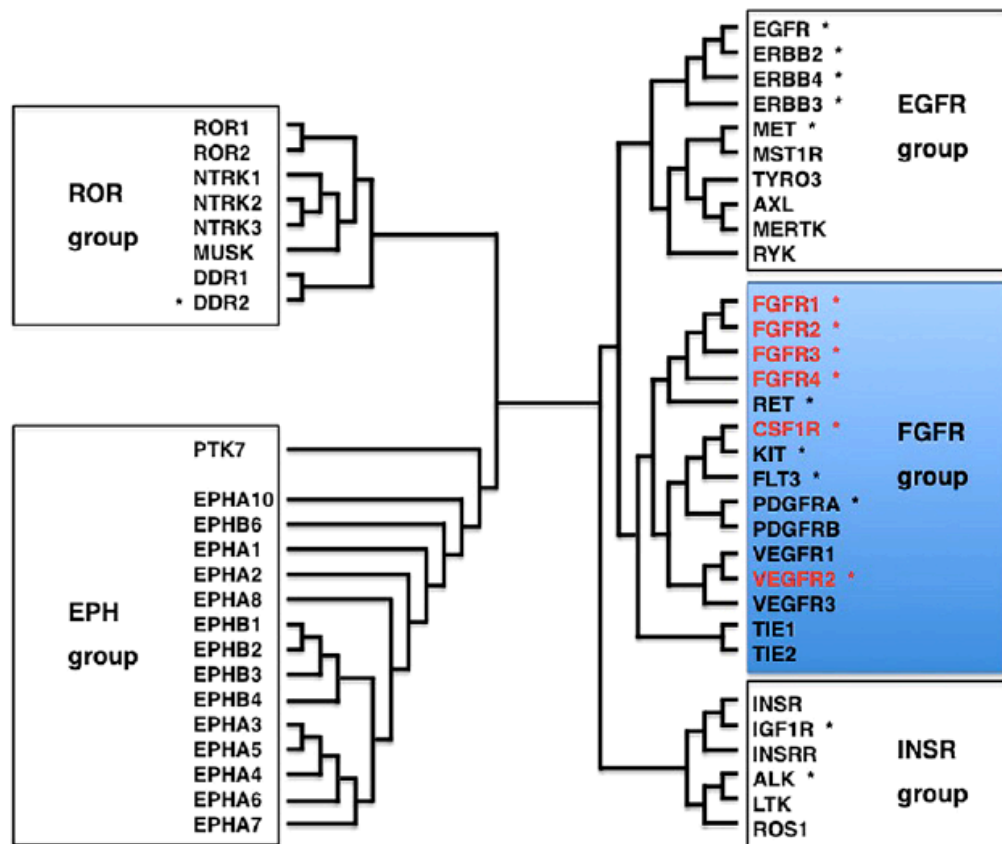
## 2. Les récepteurs au *Fibroblast Growth Factor* (FGFRs)

Les récepteurs au *Fibroblast Growth Factor* (FGFRs) sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (RTKs). Tous les RTK possèdent un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase, entraînant l'activation en cascade de voies de signalisation en aval telles que la voie des MAP Kinases : ERK1/ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 et 2*) ou encore la voie PI3K-AKT. D'après une analyse à l'aide du programme Clustal Omega portant sur 54 RTKs humains, les FGFRs font partie d'un même groupe de RTKs associant d'autres récepteurs : VEGFR1-3, RET, CSF1R, KIT, PDGFRA et PDGFRB, FLT3 et TIE1-2 (Katoh, 2016a) (**Figure 6**).

Quatre gènes *FGFR1* à *FGFR4* codent respectivement pour les protéines FGFR1, FGFR2, FGFR3 et FGFR4 dont la taille varie entre 110 et 150kDa. La localisation chromosomique des gènes qui codent pour ces protéines est détaillée dans le **Tableau 2**. Ces quatre protéines présentent un certain degré d'homologie : 56% d'acides aminés identiques entre FGFR1 et FGFR4 et jusqu'à 71% d'acides aminés identiques entre FGFR1 et FGFR2.

Chez la souris, le phénotype du *knockout* (KO) des FGFRs n'est pas viable pour FGFR1 et FGFR2. Pour FGFR3, le phénotype des souris associe des anomalies squelettiques et articulaires, cérébraux, pancréatique, intestinaux ainsi que des troubles de l'oreille interne. Quant au KO de FGFR4, il induit des troubles du métabolisme du cholestérol et de la synthèse des acides biliaires (Ornitz and Itoh, 2015).

Figure 6. La superfamille des RTKs : Arbre phylogénétique de 54 RTK humains.



D'après Katoh. *Int J Mol Med.*2016;38:3-15.

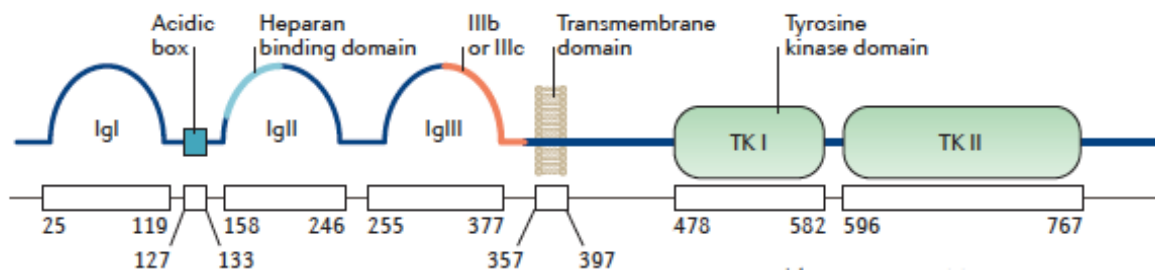
#### a. Structure des FGFRs

Les FGFRs partagent une architecture commune et sont constitués par (Figure 7) :

- **Trois domaines de type immunoglobuline (Igl, IgII et IgIII) dans leur portion extracellulaire.** Les domaines **IgII et IgIII** sont nécessaires et suffisants pour assurer la **liaison** et la **spécificité du ligand à son récepteur**. Le domaine **IgII** contient le domaine de liaison aux cofacteurs protéoglycans de type heparan sulfate.
- **Un seul domaine transmembranaire**
- **Un domaine tyrosine kinase dans leur portion intracellulaire.** Il s'agit en réalité d'un domaine séparé en deux, : TKI et TK II. Cette structure est similaire à celle de deux autres RTKs : VEGFR et PDGFR (Wesche et al., 2011).

De plus, dans leur portion extracellulaire, les FGFRs sont caractérisés par une « **boîte acide** » (**acid box**) : séquence d'acides aminés acides riche en sérines, située entre les domaines Igl et IgII, caractéristique des FGFRs (Wesche et al., 2011). Le domaine Igl et cette « acid box » pourraient **jouer un rôle d'auto-inhibition du récepteur** (Kalinina et al., 2012).

**Figure 7. Structure des FGFRs.**



D'après Babina and Turner. *Nature Rev Cancer*. 2017;17:318-332(Babina and Turner, 2017).

#### b. Spécificité de l'interaction FGFs-FGFRs

Chaque récepteur peut être activé par plusieurs ligands et un même ligand peut activer plusieurs FGFRs.

**Cependant la spécificité de la liaison entre un ligand et son récepteur est modulée par un épissage alternatif du domaine IgIII des récepteurs FGFR1, FGFR2 et FGFR3 (excepté pour FGFR4).** Au total, il existe sept isoformes de FGFRs : des isoformes b (FGFR1b-3b) et c (FGFR1c-FGFR3c). En effet, dans le domaine IgIII, il existe une partie toujours conservée dans la portion N-terminale codée par l'exon 7 (exon IIIa) et une partie variable (par épissage alternatif) dans la portion C-terminale qui est codée par deux exons mutuellement exclusifs, l'exon 8 (exon IIIb) ou l'exon 9 (IIIc). Ce domaine IIIb ou IIIc est donc déterminant pour cette spécificité d'interaction FGF/FGFR (Johnson et al., 1991)(Beenken and Mohammadi, 2009)(Johnson and Williams, 1993).

**Ces différentes isoformes ont leurs ligands spécifiques sauf FGF1 qui active toutes les isoformes (Ornitz and Itoh, 2015).**

De plus, selon cet épissage alternatif, l'expression des FGFR1-3 est spécifique d'un tissu : l'expression de l'isoforme b des FGFRs est limitée aux tissus épithéliaux alors que l'expression des isoformes c des FGFRs, aux tissus conjonctifs (Orr-Urtreger et al., 1993)(Yan et al., 1993)(Ornitz et al., 1996). En conditions physiologiques, une isoforme b de FGFRs (exprimée donc dans un tissu épithélial) est activée par un FGF sécrété par un tissu conjonctif (par exemple un membre de la sous-famille FGF7) (Ornitz and Itoh, 2015). Inversement, une isoforme c de FGFRs (exprimée donc dans un tissu conjonctif) est activée par un FGF sécrété par un tissu épithélial (par exemple un membre des sous-familles FGF4 ou FGF8) (Ornitz and Itoh, 2015).

### 3. Les cofacteurs extracellulaires associés aux FGFs

Au cours de la liaison du FGF avec son FGFR, le ligand (paracrine ou endocrine) se lie à son récepteur avec un certain degré de spécificité. Comme nous l'avons vu, cette spécificité est médiée par plusieurs paramètres : la séquence primaire du ligand et des récepteurs et par l'expression spatiale et temporelle des FGF, FGFR. Cette liaison du FGF à son récepteur nécessite l'action de cofacteurs.

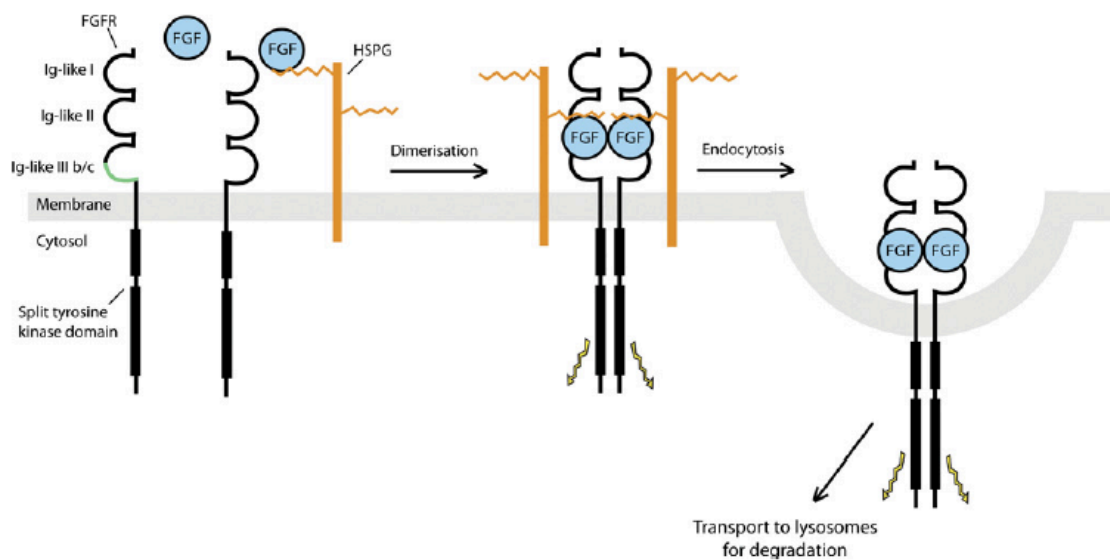
#### a. Les protéoglycane de type sulfate d'héparane (HSPG)

Les sulfates d'héparane ou héparane sulfate sont des polysaccharides présents dans la matrice extracellulaire. Ces sulfates d'héparane se lient de façon covalente à des protéoglycane dont il existe plusieurs types : des protéines de surface transmembranaires (type syndecans), des protéines de surface ancrées au glycerophosphatidylinositide (type glypicans) ou des protéines situées dans la matrice extracellulaire (type perlecan ou agrin) (Belov and Mohammadi, 2013)(Ornitz and Itoh, 2015).

L'interaction des protéoglycane de type héparane sulfate (HSPGs) avec les FGFs paracrine se fait avec une affinité modérée à élevée (Belov and Mohammadi, 2013). L'interaction des HSPG avec les FGFRs se fait au niveau du domaine extracellulaire IgII. En se liant à la fois au FGF et au FGFR, **le HSPG permet de stabiliser le complexe FGF-FGFR**. Une fois le complexe FGF-HSPG-FGFR stabilisé, ceci facilite la dimérisation de deux complexes symétriques FGF-HSPG-FGFR (**Figure 8**). La dimérisation des FGFRs permet ensuite l'activation et la transphosphorylation des domaines tyrosine kinase intracellulaires puis l'activation des voies en aval (Wesche et al., 2011) (Ornitz and Itoh, 2015).

De plus, les HSPG jouent un autre rôle auprès des FGFs paracrines. Localisés à la surface de la cellule ou dans la matrice extracellulaire, ils peuvent séquestrer les FGFs près de leur site d'action, en créant un **réservoir extracellulaire de stockage** (Wesche et al., 2011) (Ornitz and Itoh, 2015).

**Figure 8. Formation des complexes FGF-HSPG-FGFR.**



D'après Wesche et al. Biochem J. 2011 ;437 :199-213.

## b. Les protéines Klotho

Les protéines Klotho qui incluent  $\alpha$ -Klotho,  $\beta$ -Klotho et  $\gamma$ -Klotho (aussi appelé KLPH) font partie de la famille des  $1\beta$ -glycosidases (Ornitz and Itoh, 2015). **Ces cofacteurs sont essentiellement liés aux FGFs endocrines.**

Ils sont constitués d'un ou deux domaines de type  $\beta$ -glycosidase ( $\gamma$ -Klotho et  $\alpha$ -Klotho/ $\beta$ -Klotho, respectivement), d'un seul domaine transmembranaire (environ 1000 acides aminés) et d'une petite portion intracytoplasmique (Ornitz and Itoh, 2015).

Le gène  $\alpha$ -Klotho est très exprimé dans les tubules distaux du rein et dans les plexus choroïdes. Une fonction importante du complexe FGF23-FGFR- $\alpha$ -Klotho est la régulation du métabolisme du phosphate et du calcium dans le rein. Le gène  $\beta$ -Klotho est exprimé dans le foie et le tissu adipeux



blanc. Il s'agit d'un cofacteur important pour FGF19 et FGF21 et leurs récepteurs, FGFR4 et FGFR1c, respectivement. Le gène *KLPH* est exprimé dans les yeux et le tissu adipeux brun (Ornitz and Itoh, 2015).

Les protéines Klotho participent donc à la formation d'un complexe FGF-Klotho-FGFR et à sa stabilisation. Ces protéines peuvent également rentrer **en compétition avec le site d'ancrage de certains FGFs paracrines (issus de la sous-famille des FGF8)** sur leur récepteur FGFR. Les cofacteurs Klotho peuvent ainsi moduler la spécificité des FGFRs pour leurs ligands et favoriser l'interaction avec des ligands endocrines (Goetz et al., 2012).

#### c. Les autres protéines extracellulaires associées

**FGF Binding Protein 1 (FGFBP1)** est une protéine capable de mobiliser les FGFs pour promouvoir l'interaction avec les FGFRs (Ornitz and Itoh, 2015).

Récemment, le gène codant pour **FGFRL1 (aussi appelé FGFR5)** a été identifié. Même si FGFRL1 est une protéine qui présente des similitudes structurelles avec les FGFRs, elle n'appartient pas à la famille des FGFRs dans la mesure où **FGFRL1 ne possède pas de domaine tyrosine kinase intracellulaire**. Son rôle n'est pas encore très clairement défini : cette protéine jouer un rôle de piège à FGFs (« ligand trap ») en interférant dans la liaison des FGFs aux FGFRs. Il pourrait aussi modifier la transduction du signal intracellulaire, en recrutant des tyrosines phosphatases SHP-1 (Ornitz and Itoh, 2015). Autre mécanisme de régulation, FGFRL1 serait un régulateur négatif de la signalisation, en s'hétérodimérisant à des FGFRs pour empêcher la transphosphorylation des FGFRs (Helsten et al., 2015).

## 4. Les voies de signalisation en aval des FGFRs

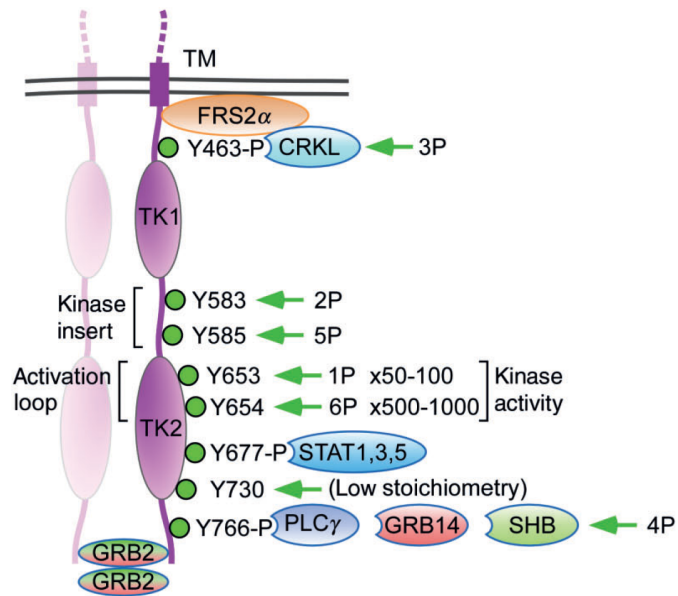
Classiquement, les voies de signalisation en aval d'un RTK sont activées de la façon suivante : un ligand se fixe sur son récepteur, entraînant la dimérisation de complexes ligand-récepteur. Cette dimérisation facilite la transphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et entraîne le recrutement et l'activation de molécules en aval de la voie de signalisation. Ces molécules en aval sont activées soit directement par la liaison au récepteur, soit indirectement par des protéines adaptatrices.

Dans le cas des FGFRs, la fixation du ligand FGF (et du HSPG) à son récepteur entraîne la dimérisation des complexes FGF-HSPG-FGFR (homo- ou hétéro-dimérisation) et la transphosphorylation des domaines tyrosines. Ensuite, **l'activation de certaines voies en aval nécessite le recrutement de protéines adaptatrices**. Il existe deux protéines adaptatrices prépondérantes : le **FGFR substrate 2 $\alpha$  (FRS2 $\alpha$ )** et la **phospholipase C (PLC)  $\gamma$ 1**. Le recrutement de l'une ou l'autre des protéines adaptatrices est lié aux sites de phosphorylation du domaine tyrosine kinase du FGFR.

Par exemple, pour FGFR1, il existe 7 sites majeurs de phosphorylation identifiés sur les résidus tyrosine : Tyr463, Tyr583, Tyr 585, Tyr653, Tyr654, Tyr730 et Tyr766 (Mohammadi et al., 1996)(Furdui et al., 2006). A noter que l'activation complète de FGFR1 nécessite la phosphorylation des résidus suivants : Tyr653, Tyr583, Tyr463, Tyr 585, Tyr654 et de façon séquentielle. Cet ordre séquentiel de phosphorylation est fonction de la séquence protéique (résidus de phosphorylation) et de la conformation de la protéine et des contraintes structurelles engendrées (Lew et al., 2009). Parmi ces résidus, les résidus Tyr 653 et Tyr 654 sont présents dans les 4 FGFRs et jouent un rôle très important dans la boucle d'activation et sont nécessaires à l'activité catalytique du récepteur (Mohammadi et al., 1996) (Lew et al., 2009) (**Figure 9**). Il semblerait que pour FGFR2 les mêmes résidus soient phosphorylés ; contrairement à FGFR3 et FGFR4 qui ne possèdent respectivement que quatre et trois sites de phosphorylation (dont les résidus Tyr 653 et 654) (Roskoski, 2020).

La phosphorylation du résidu Tyr766 entraîne le recrutement de PLC $\gamma$  (via son domaine SH2), tandis que FRS2 $\alpha$  (présent à la membrane) peut être recruté avec ou sans l'intermédiaire de résidus tyrosine phosphorylé (Mohammadi et al., 1991) (Beenken and Mohammadi, 2009). Enfin, la phosphorylation du résidu Tyr677 est nécessaire à l'activation de la voie STAT3 (Dudka et al., 2010).

**Figure 9. Sites de phosphorylation de FGFR1 et activation des voies en aval.**

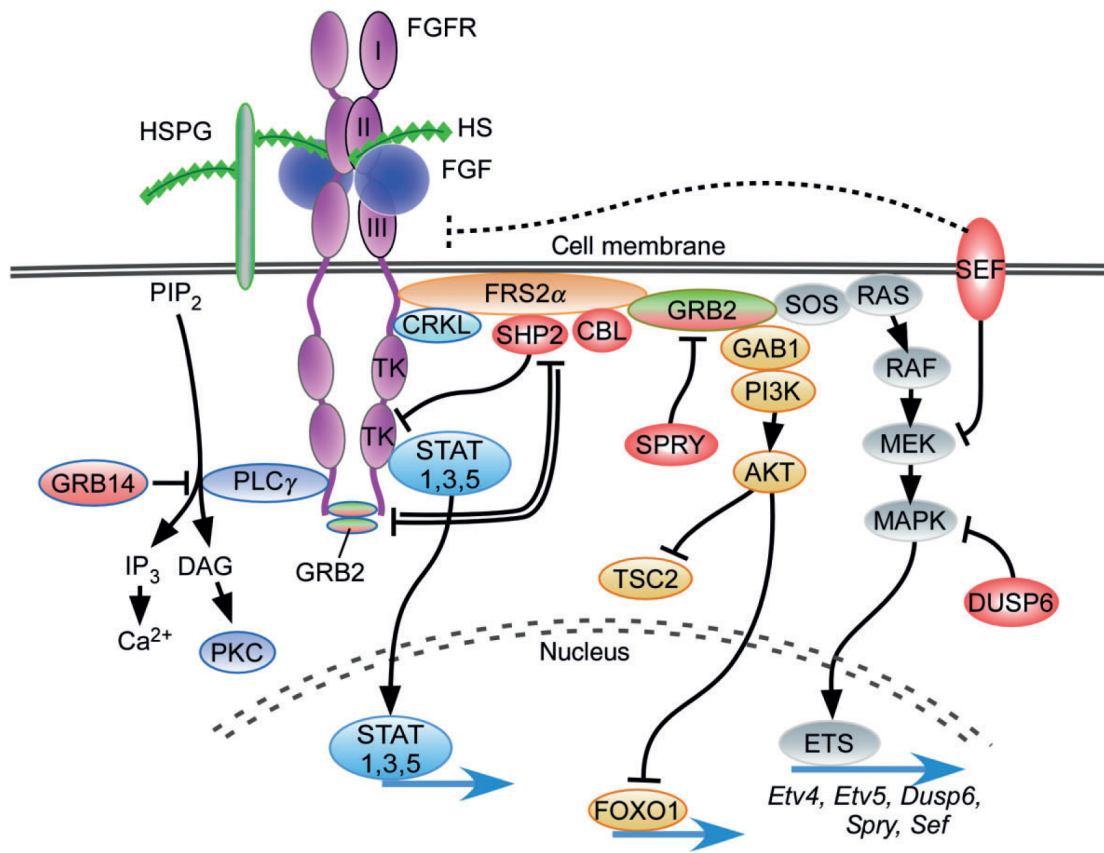


D'après Ornitz and Itoh. Dev Biol. 2015;4:215-266

Il existe quatre principales voies de signalisation intracellulaires en aval des FGFRs (**Figure 10**) :

- La voie des MAP Kinases ERK1/ERK2
- La voie PI3K-AKT
- La voie de PLC $\gamma$
- La voie JAK/STAT (*Signal transducer and activator of transcription*)

Figure 10. Activation des voies de signalisation en aval des FGFRs.



D'après Ornitz and Itoh. Dev Biol. 2015;4:215-266

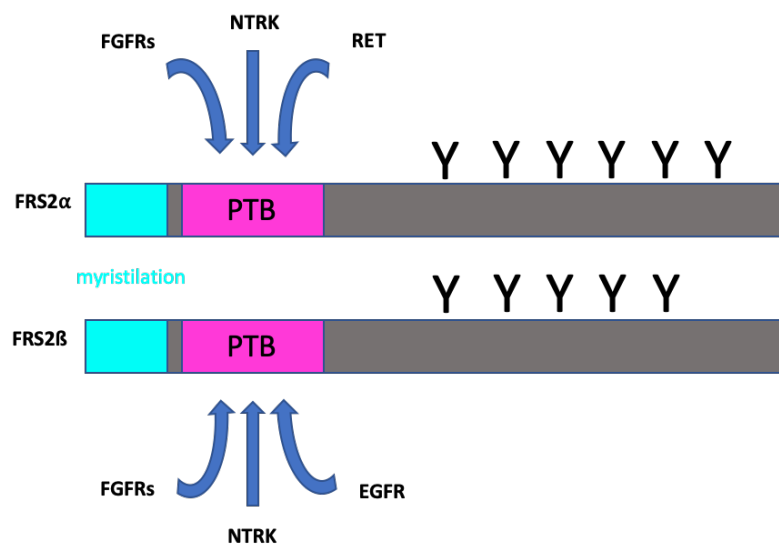
### a. La protéine adaptatrice FRS2 $\alpha$

La protéine FRS2 pour *FGFR substrate 2*, est une protéine adaptatrice, sans activité catalytique, mais présentant une activité de transduction du signal.

FRS2 présente deux isoformes FRS2 $\alpha$  et FRS2 $\beta$  (aussi appelé FRS3) avec une structure similaire composée :

- Dans sa portion **N-terminale**, par un **site d'ancrage à la membrane plasmique** grâce à une séquence d'acides aminés (un consensus de myristylation MGXXXS/T) permettant de se lier de façon constitutive aux lipides de la membrane plasmique.
- Par un **domaine PTB** (PhosphoTyrosine Binding) capable de se lier aux résidus tyrosines phosphorylés (notamment ceux des FGFRs). **Ce domaine PTB est responsable de la spécificité de FRS2 pour certains RTKs.**
- Dans sa portion **C-terminale** par **plusieurs sites de phosphorylation** (6 résidus tyrosine pour FRS2 $\alpha$  et 5 pour FRS2 $\beta$ ) (Gotoh, 2008)(Sato and Gotoh, 2009) (**Figure 11**).

**Figure 11. Structure de la protéine FRS2.**



**Via son domaine PTB, FRS2 est capable de se lier en amont à plusieurs RTKs spécifiques :** FGFRs, NTRK, RET et ALK (pour FRS2 $\alpha$ ) et FGFRs, NTRK et EGFR (pour FRS2 $\beta$ ) (Gotoh, 2008)(Sato and Gotoh, 2009). Une des particularités du domaine PTB de FRS2 est sa capacité à se lier non seulement à des résidus phosphorylés de récepteurs activés mais également à des résidus non phosphorylés de récepteurs non activés. Ce dernier cas de figure se produit plus particulièrement avec FGFR : **FRS2 peut se lier (via son domaine PTB) de façon stable à un FGFR sur ces résidus tyrosines non phosphorylés**, au niveau du domaine juxta-membranaire. En revanche, pour les autres récepteurs, il est nécessaire que celui-ci soit activé (Gotoh, 2008)(Sato and Gotoh, 2009).

Un fois lié à son RTK et notamment à un FGFR, FRS2 $\alpha$  est phosphorylé et active d'autres protéines en aval : soit GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*), soit SHP2 (*SH2-containing tyrosine phosphatase*, protéine codée par le gène *PTPN11* pour *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor de type 11*). L'activation de GRB2 active soit SOS (activation de la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2), soit GAB1 (activation de la voie PI3K/AKT) soit CBL (entraînant l'ubiquitination et donc la dégradation des complexe FGFR-FRS2). Par conséquent, FRS2 $\alpha$  agit comme un régulateur positif ou négatif de la transduction du signal (**Figure 10**) (Gotoh, 2008)(Sato and Gotoh, 2009).

Dans la suite du manuscrit, nous ne parlerons que de FRS2 $\alpha$  qui joue un rôle prépondérant dans la voie de signalisation FGF/FGFR et dont le potentiel oncogénique a été démontré dans plusieurs types de tumeurs, comme les cancers de l'ovaire ou encore les glioblastomes (Luo and Hahn, 2015).

#### b. La voie de la phospholipase C $\gamma$ (PLC $\gamma$ )

La phosphorylation d'un résidu tyrosine invariable de FGFR (par exemple le résidu Tyr766 pour FGFR1) crée un site de liaison pour le domaine SH2 de PLC $\gamma$ . Les domaines SH2 permettent aux protéines contenant ces motifs de se lier à d'autres protéines sur leurs résidus phosphorylés.

Le recrutement de PLC $\gamma$  permet le clivage du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) (Wesche et al., 2011). Le DAG par l'intermédiaire de la protéine kinase C (PKC) (une sérine thréonine kinase) active des facteurs de transcription impliqués

dans des mécanismes **favorisant la survie cellulaire**, tandis que IP3 active des voies de signalisation calcium-dépendantes (notamment la voie de la calcineurine), **favorisant la motilité et l'invasion cellulaire**.

### c. La voie des MAP Kinases ERK1/ERK2

Le recrutement de FRS2 $\alpha$  entraîne sa phosphorylation et la fixation de la protéine adaptatrice GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) via son domaine SH2, ce qui active en cascade la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2. Le premier maillon de cette cascade consiste au recrutement de la protéine GRB2 couplée à la protéine SOS (*Son Of Sevenless*), en situation sous-membranaire, proche du point d'ancrage de RAS. La proximité de SOS et RAS favorise l'échange d'un GDP par un GTP, induisant l'activation de RAS. En effet, la protéine RAS oscille entre deux états : un état inactif RAS-GDP (Guanosine Di-Phosphate) et un état actif : RAS-GTP (Guanosine Tri-Phosphate). Une fois activée, RAS va se lier à la kinase RAF qui va phosphoryler et activer les kinases MEK1 et MEK2 (MAPK-ERK-Kinase) qui vont elles-mêmes phosphoryler et activer ERK1 et ERK2. Les MAP Kinases ERK1/ERK2 sont ensuite transloquées dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription, notamment les facteurs de transcription ETS (E-26 transformation-specific) ou FOS qui participent à la régulation de l'expression de gènes cibles du cycle cellulaire (en particulier, l'expression de la cycline D1 et CDK6 participant à l'initiation du cycle cellulaire, passage en phase G1).

Cette voie est finement régulée, notamment par rétrocontrôle négatif exercé par ERK1/ERK2 et par stimulation de la synthèse d'inhibiteurs de la voie tels que *Sprouty* (SPRY) ou des phosphatases de la famille DUSP.

De plus, la phosphorylation de FRS2 $\alpha$  entraîne l'activation de SHP2 (*SH2-containing tyrosine phosphatase*) qui elle aussi active la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2. Cette activation via SHP2 serait d'ailleurs plus forte que celle médiée par GAB2 (Sato and Gotoh, 2009).

**La voie des MAP Kinases ERK1/ERK2 favorise particulièrement la prolifération cellulaire.**

#### d. La voie PI3K-AKT

Le recrutement de FRS2 $\alpha$  entraîne sa phosphorylation et la fixation de la protéine adaptatrice GRB2 qui active la voie PI3K/AKT via le recrutement de GAB1. PI3K est un hétérodimère à activité kinase qui peut être activé via l'activation d'un RTK ou directement par la protéine RAS. PI3K participe à la formation de phospho-inositols membranaires et notamment du phosphatidylinositol-3 phosphate (PIP<sub>3</sub>) qui recrute la sérine/thréonine kinase AKT qui est alors phosphorylée. L'activation d'AKT a pour conséquences : l'inhibition des facteurs pro-apoptotiques de la famille bcl2, ou encore FOXO1, et l'activation de la voie mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*).

**La voie PI3K/AKT/mTOR favorise particulièrement la survie cellulaire.**

La régulation de cette voie est notamment assurée par la protéine PTEN, une phosphatase à double spécificité dont la fonction principale est de déphosphoryler les phosphoinositides et de créer le PIP<sub>2</sub>.

A noter que la voie PI3K/AKT peut donc être activée par l'activation d'un RTK mais également par l'intermédiaire de RAS (interconnexion avec la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2).

#### e. La voie JAK/STAT

L'activation du RTK entraîne la phosphorylation des tyrosines kinases JAKs associées au RTK en intracellulaire. Les protéines JAKs transphosphorylées phosphorylent à leur tour des substrats en aval dont les RTKs et les protéines STATs. La phosphorylation et l'activation de STAT1, STAT3 et STAT5 entraîne la transcription de nombreux gènes (Ornitz and Itoh, 2015).

**La voie JAK/STAT favorise notamment la prolifération et la survie cellulaire.**

#### f. Modulateurs intracellulaires de la voie de signalisation FGF/FGFR

- **Inhibiteurs de la voie :**

Citons quelques inhibiteurs de la voie FGF/FGFR, parmi lesquels *Sprouty* (SPRY) qui agit comme régulateur négatif intracellulaire de plusieurs RTKs (FGFR, VEGFR, PDGFR) en interagissant avec GRB2



pour inhiber les voies en aval (MAP Kinases ERK1/ERK2 et PI3K-AKT) (Wesche et al., 2011)(Ornitz and Itoh, 2015). On note également SEF (*similar expression to FGF*) et Dusp-6 (aussi appelé MKP-3 pour *MAPK phosphatase 3*) qui inhibe spécifiquement la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2 (Wesche et al., 2011)(Ornitz and Itoh, 2015).

- **Régulation de l'activation de FGFR :**

La réponse cellulaire à l'activation de la voie FGF/FGFR est régulée par les propriétés intrinsèques de cette voie mais également par la dynamique du « trafic » des FGFRs intracellulaire : synthèse, expression à la membrane, internalisation par endocytose, dégradation dans les lysosomes des FGFRs.

L'ubiquitine ligase CBL peut se lier à FRS2 phosphorylé et favoriser l'ubiquitination de FGFRs et donc leur dégradation. En revanche, l'endocytose des FGFRs n'aboutit pas nécessairement à leur dégradation. Il existe une « machinerie » de tri et de transport des FGFRs ubiquitinés : des petites vésicules appelées ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) qui véhiculent les FGFRs pour être dégradés de façon plus ou moins efficace. Il semble en effet que les FGFRs puissent être partiellement ou inefficacement dégradés pour être finalement exprimés à nouveau à la membrane (Haugsten et al., 2005)(Wesche et al., 2011).

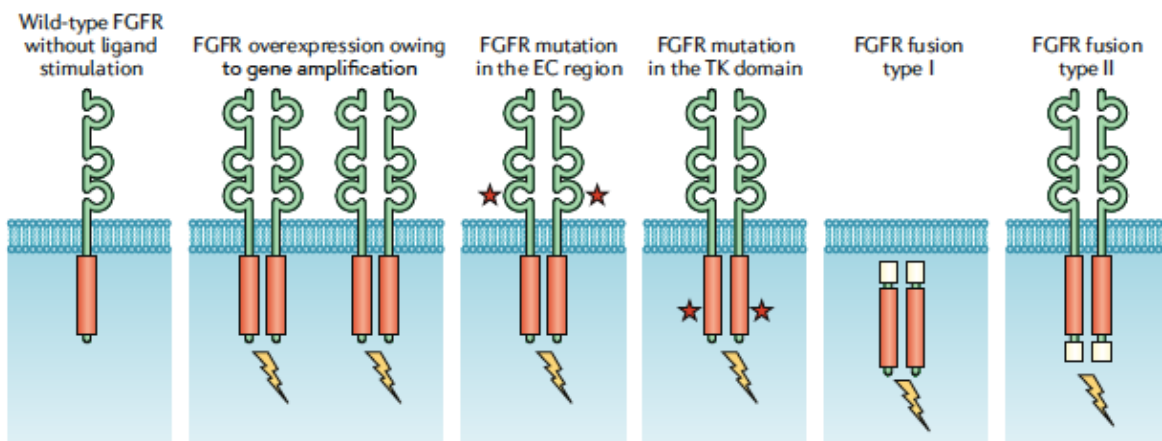
## 5. La dérégulation de la voie FGF/FGFR et pathologies non cancéreuses

Plusieurs types de syndromes congénitaux sont dus à des mutations germinales des *FGFRs*, notamment des syndromes de craniosynostose, d'achondroplasie, d'hypogonadisme. Même si certaines mutations sont identiques à celles observées de façon somatique dans des cancers, il n'est pas décrit à ce jour de prédisposition aux cancers chez ces patients atteints de syndromes congénitaux (Helsten et al., 2015).

## 6. La dérégulation de la voie FGF/FGFR et cancers

Parmi les mécanismes de dérégulation de la voie FGF/FGFR, on distingue : ceux impliquant directement le récepteur (amplification génique ou mécanismes post-traductionnels entraînant la surexpression du récepteur, mutations ponctuelles ou translocations entraînant une activation constitutive du récepteur) et ceux liés à l'expression du ligand (**Figure 12**).

**Figure 12. Mécanismes de dérégulation de la voie FGF/FGFR.**



D'après Katoh. Nat Rev Clin Oncol. 2019;16:105-122.

**L'activation aberrante de la voie de signalisation FGF/FGFR est rapportée d'en environ 20% des cas de cancers avec la répartition suivante : 14% d'anomalies des FGFs (et 7% d'anomalies des FGFRs (Helsten et al., 2016).**

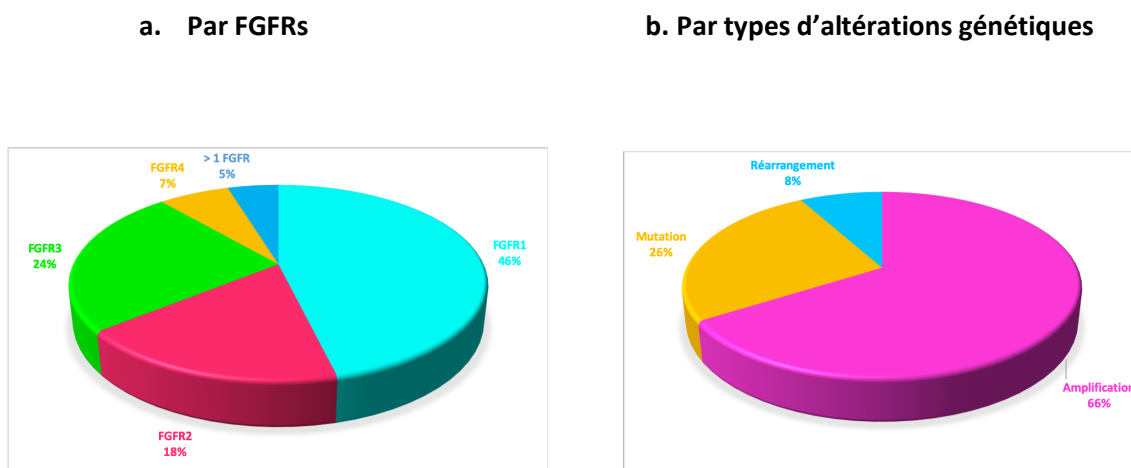
### a. Répartition par types d'altérations génétiques

D'après une étude portant sur 4853 cancers, **une anomalie d'un ou plus des FGFRs était observée dans 360 cas soit 7% des cancers** : 5% présentaient une amplification, 2% présentaient une mutation et 0,5% présentait un gène de fusion impliquant un FGFRs (Helsten et al., 2016).

Parmi les cas avec altérations de FGFRs, le récepteur le plus fréquemment touché était **FGFR1 (49% des cas)** suivi par FGFR3 (26%), FGFR2 (19%) et FGFR4 (7%) (Helsten et al., 2016). Les altérations des FGFRs étaient, par ordre de fréquence, des **amplifications (66%)**, des mutations (26%) et des réarrangement (8%)(Helsten et al., 2016) (**Figure 13a**).

Dans 5% des cas, plus d'une altération de FGFRs étaient observée, notamment des amplifications associées à une mutation ou un gène de fusion impliquant un des 4 FGFRs (Helsten et al., 2016) (**Figure 13b**).

**Figure 13. Répartition des altérations de FGFRs : a. par FGFRs et b. par types d'altérations génétiques.**



- **Amplifications des gènes *FGFR1-4***

C'est le type d'altération de FGFRs le plus fréquent (Helsten et al., 2016) et parmi les 4 FGFRs, c'est ***FGFR1*** qui est le plus souvent amplifié (42% des cas avec altération d'un FGFR (Helsten et al., 2016)).

Les cancers qui présentent une amplification de *FGFR1* sont par ordre de fréquence : les carcinomes mammaires (14%), les carcinomes épidermoïdes broncho-pulmonaires (9%), les carcinomes ovariens (5%), les carcinomes urothéliaux (7%) et autres (les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, les adénocarcinomes colo-rectaux...)(Helsten et al., 2016).

Les autres FGFRs sont amplifiés notamment dans les carcinosarcomes utérins (*FGFR3*), les adénocarcinomes gastriques (*FGFR2*) et les carcinomes à cellules claires du rein (*FGFR4*) (Helsten et al., 2015) ou encore certains sarcomes (*FGFR3*) (Barretina et al., 2010).

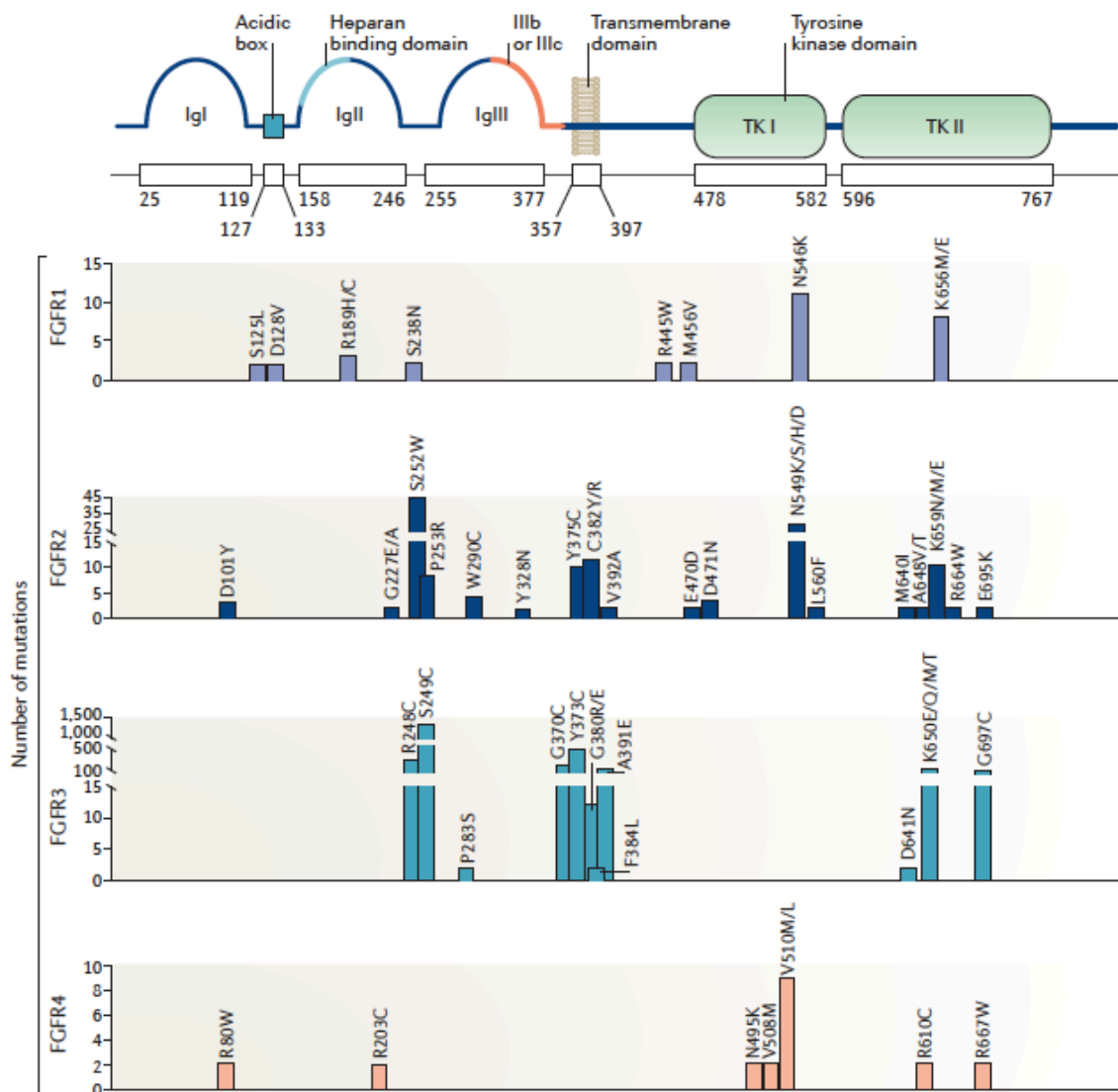
Quel que soit le FGFR amplifié, cette altération génétique conduit à la surexpression du FGFR à la membrane cellulaire ce qui favorise les interactions entre FGFRs et donc leurs dimérisations et phosphorylations et entraîne une activation constitutive de la voie.

- **Mutations activatrices des gènes *FGFR1-4***

Parmi les FGFRs, ce sont **FGFR2 et FGFR3 qui présentent le plus souvent des mutations** (Helsten et al., 2016). Notamment, les carcinomes urothéliaux (de haut grade) présentent un taux élevé de mutations de *FGFR3* et les carcinomes endométriaux, des mutations de *FGFR2* (Helsten et al., 2015). Des mutations de *FGFR1* et *FGFR4* ont été décrites dans des adénocarcinomes gastriques et des mélanomes (*FGFR1*) et dans des rhabdomyosarcomes et des mélanomes (*FGFR4*) (Helsten et al., 2015).

Contrairement aux mutations au sein d'EGFR, les mutations des FGFRs sont distribuées tout au long de la séquence et non limitées au domaine tyrosine kinase. Les mutations observées dans les domaines IgII et IgIII dans la portion extracellulaire du récepteur, ou dans le domaine transmembranaire ou encore dans le domaine tyrosine kinase sont susceptibles d'engendrer une plus grande affinité du récepteur pour son ligand ou encore une dimérisation et une activation constitutive du récepteur, ligand-indépendant (Babina and Turner, 2017) (**Figure 14**).

Figure 14. Répartition des mutations sur les FGFRs.



D'après Babina and Turner. Nature Rev Cancer. 2017;17:318-332(Babina and Turner, 2017).

A noter que selon une étude portant sur 210 tumeurs malignes (dont 169 tumeurs primaires), la voie FGF/FGFR serait celle qui comporterait le plus fort taux de mutations non synonymes parmi les 518 protéines kinases analysées (au niveau des séquences codantes) (Greenman et al., 2007)(Touat et al., 2015).

- **Gènes de fusion impliquant *FGFR1-4***

Au sein des tumeurs solides, ce sont ***FGFR3* et *FGFR2*** qui sont le plus fréquemment réarrangés (Helsten et al., 2016) dans les carcinomes urothéliaux, les glioblastomes, les cholangiocarcinomes ou encore des carcinomes épidermoïdes broncho-pulmonaires, etc. (Helsten et al., 2016).

Dans ces tumeurs, plusieurs partenaires de fusion ont été décrits et notamment les gènes *TACC1* (*Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 1*), *TACC3* (*Transforming Acidic Coiled-Coil Containing Protein 3*), *BICC1* (*BicC family RNA binding protein 1*), *NPM1* (*nucleophosmin 1*), etc. (Helsten et al., 2016).

Dans les syndromes myéloprolifératifs, c'est le gène *FGFR1* qui est souvent impliqué dans des fusions au cours desquelles la partie N-terminale d'un gène partenaire (*ZNF198*, *BCR*, etc.) est fusionnée avec la partie C-terminale impliquant le domaine tyrosine kinase de *FGFR1*, fusion de type I d'après la **Figure 12** (Wesche et al., 2011).

Le mécanisme à l'origine de ce gène de fusion peut correspondre à une translocation entre 2 chromosomes (translocation réciproque), à une insertion de matériel chromosomique ou à une inversion sur un même chromosome.

Le gain de fonction engendré par ce gène de fusion peut entraîner soit une surexpression d'un gène « normal » soit l'expression d'un nouveau gène, chimérique, constitué par des séquences issues des deux gènes qui se trouvent fusionnés. Dans le cas des gènes de fusion impliquant les FGFRS, ceci aboutit soit à une activation constitutive du FGFR, ligand-indépendant (par dimérisation permanente) soit à une surexpression du FGFR (sous la dépendance d'un nouveau promoteur ou due à la perte des séquences régulatrices), soit à une localisation aberrante de la protéine de fusion conduisant à une instabilité chromosomique (localisation au niveau des centrosomes) (Touat et al., 2015)(Babina and Turner, 2017).

Dans les certains carcinomes ou glioblastomes, les fusions *FGFR3-TACC3* sont de type II d'après la **Figure 12** c'est-à-dire entraînant le remplacement de l'extrémité C-terminale de *FGFR3* par son partenaire de fusion. Ce type de fusion entraîne la perte du résidu Tyr760 nécessaire à l'activation de la voie PLC $\gamma$  (Kato, 2019).

- **Altérations des FGFs**

La plupart des altérations moléculaires des FGFs concerne des amplifications. Notamment les trois ligands *FGF3*, *FGF4* et *FGF19* sont fréquemment co-amplifiés sur l'amplicon 11q13 (carcinomes

épidermoïdes pulmonaires et de la tête et du cou, carcinomes mammaires ou encore urothéiaux) (Helsten et al., 2015).

De plus, l'expression des ligands peut être modulée de façon aberrante par des mécanismes autocrines (par les cellules tumorales elles-mêmes) et paracrines (par les cellules du stroma (mécanisme paracrine))(Touat et al., 2015).

#### b. Répartition par sous-types histologiques de cancers

D'après l'étude de Helsten et al., les 3 types histologiques présentant la plus grande fréquence d'altérations des FGFRs étaient : les carcinomes urothéiaux (32%), les carcinomes mammaires (18%) et les carcinomes endométriaux (13%) (**Figure 15**).

- **Carcinomes urothéiaux**

Dans ce groupe de cancers, 15% présentaient une mutation de *FGFR3*, 7% une amplification de *FGFR1*, 6% un gène de fusion et 3% une amplification de *FGFR3*. A noter que les mutations de *FGFR3* étaient très fréquentes dans les tumeurs de bas grade (Helsten et al., 2016). D'après la revue de Katoh et al, l'activation aberrante de *FGFR3* serait même impliquée dans 20 à 50% des cas de carcinomes vésicaux, dès les stades précoces (Katoh, 2019).

- **Carcinomes mammaires**

Une anomalie d'un des 4 FGFRs était observée dans 18% des cas avec notamment une amplification de *FGFR1* dans 14% (Helsten et al., 2016). De plus la co-amplification de *FGF3*, *FGF4* et *FGF19* en 11q13.3 est rapportée dans 15% des carcinomes mammaires triple-négatif d'après les données de the cancer Genome Atlas (TCGA) (Katoh, 2019).

- **Carcinomes endométriaux**

L'anomalie la plus fréquemment observée était une mutation de *FGFR2* (S252W, P253R, C382R, N549K) (Helsten et al., 2016).

- **Carcinomes non à petites cellules broncho-pulmonaires**

Les carcinomes épidermoïdes présentaient une amplification de *FGFR1* dans 9% et une mutation somatique de *FGFR2* (P253R, S252W) ou *FGFR3* (G370C, K650E, R248C, S249C) dans 3%. Quant aux adénocarcinomes, ils présentaient une anomalie d'un des 4 FGFRs dans seulement 4%

(Helsten et al., 2016). D'après Katoh et al, L'amplification de *FGFR1* atteignait 17% des carcinomes épidermoïdes broncho-pulmonaires (Katoh, 2019). Toujours dans cette revue, l'amplification de *FGFR1*, présente dès les stades précoces de carcinomes épidermoïdes serait donc un évènement précoce dans leur oncogenèse, à l'inverse des adénocarcinomes broncho-pulmonaires qui présentent cette anomalie plus tardivement (Katoh, 2019).

- **Sarcomes**

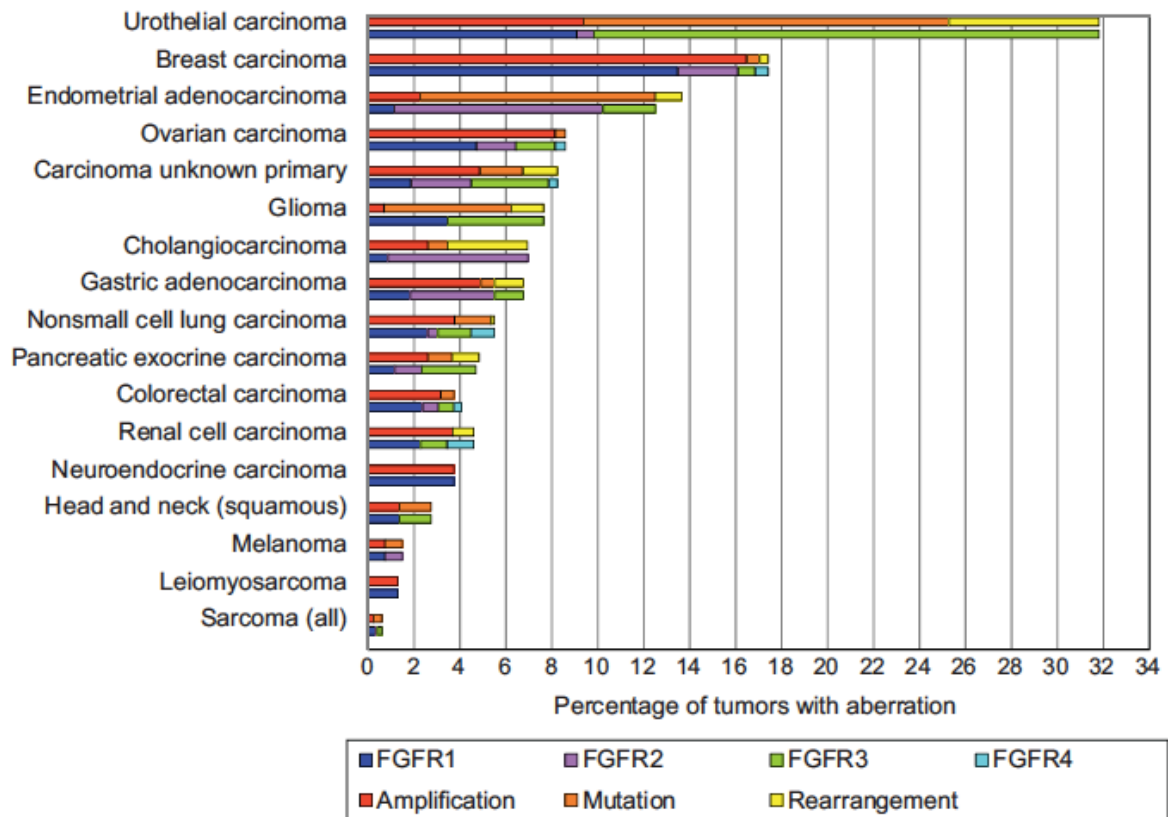
D'après Helsten et al, les sarcomes présenteraient une dérégulation de la voie FGF/FGFR dans 4% des cas (Helsten et al., 2016). Cette étude portait sur 324 cas de sarcomes avec par ordre décroissant de nombre de cas : des léiomyosarcomes, des liposarcomes, des ostéosarcomes, des rhabdomyosarcomes, des angiosarcomes et des chondrosarcomes. Les anomalies les plus fréquentes étaient des amplification du gène *FGFR1* (Helsten et al., 2016).

Dans une autre étude, les anomalies de FGFRs associées aux sarcomes étaient : les rhabdomyosarcomes avec une mutation du gène *FGFR4* observée dans 7,5% des cas (rhabdomyosarcomes alvéolaires préférentiellement mais également embryonnaires) ou une amplification du gène *FGFR1* dans les rhabdomyosarcomes pléomorphes (3%), les ostéosarcomes avec amplification du gène *FGFR1* (5%), les synoviosarcomes avec une surexpression des FGFs (FGF2, FGF8, FGF9, FGF11 et FGF18), les sarcomes d'Ewing avec mutations du gène *FGFR1* et enfin les liposarcomes avec une amplification du gène *FRS2* (Zhou et al., 2016) (Hallinan et al., 2016)(Wesche et al., 2011)(Cf § III.1).



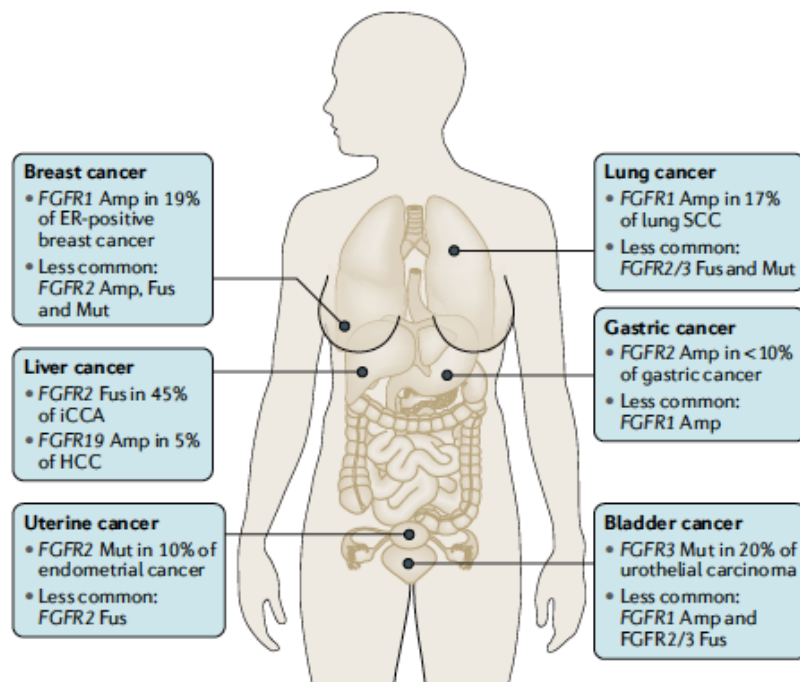
Figure 15. Fréquence et distribution des altérations des FGFRs.

a.



D'après Helsten et al. Clin Cancer Res. 2016 ;22:259-267.

b.



D'après Katoh. Nature RevClin Oncol. 2019 ;16 :105-122.

### c. Répartition par mécanismes biologiques

La dérégulation de la voie FGF/FGFR participe à la carcinogénèse selon trois principaux modes d'actions ou mécanismes biologiques : **(1) en stimulant directement la prolifération, la survie des cellules cancéreuses (altérations « driver ») ; (2) en participant à l'angiogénèse et (3) en favorisant l'acquisition de mécanismes de résistance aux thérapies.**

- **Dérégulation de la voie FGF/FGFR et mécanismes « driver » oncogéniques**

La plupart des altérations précédemment décrites (amplifications, mutations activatrices, réarrangements impliquant les FGFRs) font partie des altérations dites « driver » dans la mesure où elles participent à la prolifération cellulaire (notamment par activation de la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2), à la survie cellulaire (notamment par activation de la voie PI3K/AKT), *etc.*

- **Dérégulation de la voie FGF/FGFR et angiogénèse**

L'angiogénèse tumorale repose sur deux processus : (i) la formation de nouveaux vaisseaux à partir du bourgeonnement de cellules endothéliales issues de vaisseaux préexistants et (ii) la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules progénitrices normales ou tumorales qui se différencient en cellules endothéliales.

La voie de signalisation FGF/FGFR joue un rôle important dans la néo-angiogénèse, directement ou indirectement en interagissant avec d'autres voies comme celle du VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) ou celle du PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*) (Touat et al., 2015) (Dieci et al., 2013).

Parmi les FGFs, FGF2 est un facteur pro-angiogénique qui participe à la prolifération et à la migration de cellules endothéliales directement via FGFR1 (ou FGFR2) ou indirectement via l'induction ou la sécrétion de VEGF par les cellules endothéliales (Katoh, 2016a). L'activation de la voie FGF/FGFR par les cellules tumorales peut donc jouer un rôle important dans le développement et le maintien de cette néo-angiogénèse (Touat et al., 2015)(Dieci et al., 2013).

- **Dérégulation de la voie FGF/FGFR et résistance aux thérapies**

L'apparition de mécanismes de résistance aux thérapies ciblées est inévitable et limite leur efficacité dans le temps.

Dans le cas de la dérégulation de la voie FGF/FGFR, on distingue les altérations conférant une résistance primaire ou plus fréquemment secondaire aux traitements anti-FGFRs et celles conférant une résistance à d'autres thérapies ciblées.

Citons comme mécanisme de résistance commun à tous les récepteurs à activité tyrosine kinase : les mutations sur des acides aminés dits « gatekeeper ». En conditions physiologiques, ce type d'acides aminés « gatekeeper » stabilise la liaison de l'inhibiteur de tyrosine kinase au sein de la poche hydrophobique du récepteur. Historiquement décrit dans les phénomènes de résistance à l'imatinib (Gorre et al., 2001), ce concept a ensuite été généralisé à d'autres RTKs et inhibiteurs de tyrosine kinase (Azam and Daley, 2006). Les conséquences de telles mutations sont : l'abolition des interactions moléculaires spécifiques entre récepteur et inhibiteur (par encombrement stérique avec substitution d'un acide aminé par un autre, plus « volumineux ») ou encore des modifications de conformation du récepteur qui déstabiliseraient une interaction forte inhibiteur-récepteur ou stabiliseraient une interaction faible inhibiteur-récepteur.

Dans le cas des mécanismes de résistance aux anti-FGFRs, on recense plusieurs mutations sur des résidus « gatekeeper » : notamment, les mutations V561M et N546K du gène *FGFR1*, les deux conférant une résistance au PD173074, et la V561M, conférant une résistance au lucitanib et à l'AZD4547 (Zhou et al., 2020)(Ryan et al., 2019). De même, la mutation V555M du gène *FGFR3* est un événement qui confère une résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinases anti-FGFR (AZD4547 et PD173074) (Zhou et al., 2020) (Chell et al., 2013).

Un autre mécanisme de résistance aux anti-FGFRs consiste en l'activation d'autres RTKs activant eux-mêmes les mêmes voies de signalisation intracellulaires que les FGFRs. Ce mécanisme a été démontré notamment sur des lignées cellulaires de carcinomes urothéliaux avec altérations de *FGFR3* traités par BGJ398 avec acquisition rapide d'une résistance et activation d'autres RTKs soit HER2 soit ERBB3 (Zhou et al., 2020)(Babina and Turner, 2017).

Dans le cas de mécanismes de résistance à d'autres thérapies ciblées, la voie FGF/FGFR peut également être impliquée dans des phénomènes d'activation croisée. Par exemple, dans le cas d'adénocarcinomes broncho-pulmonaires présentant une mutation activatrice du gène *EGFR* et donc traités par anti-EGFR (Gefitinib), Ware et al. ont mis en évidence l'activation de la voie FGF2/FGFR1 par les cellules tumorales elles-mêmes pour échapper à l'inhibition de la voie de signalisation EGFR (Ware et al., 2013). De la même manière, les amplifications du gène *FGFR1* pourraient favoriser la prolifération des carcinomes mammaires de type luminal B et participer à la résistance à l'hydroxytamoxifène (Turner et al., 2010).

***In fine*, la dérégulation de la voie FGF/FGFR joue un rôle très important dans les mécanismes biologiques impliqués en cancérologie.**

## 7. Les stratégies thérapeutiques ciblant la voie FGF/FGFR en cancérologie

La fréquence des altérations de la voie FGF/FGFR en oncologie a conduit au développement de nombreuses thérapies ciblant cette voie. A l'heure actuelle, ce sont les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) qui sont les plus répandus et utilisés. D'autres thérapies sont également en voie de développement, les anticorps monoclonaux ou encore les « pièges » à FGFs.

A noter que dans ce chapitre, nous nous limiterons aux thérapies utilisées en cancérologie.

### a. Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) anti-FGFR

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) sont de petites molécules qui inhibent l'activité du récepteur en agissant au niveau de la portion intracellulaire du récepteur en bloquant les sites de liaison à l'ATP. Il existe deux classes d'ITKs anti-FGFR : les ITKs sélectifs et non sélectifs de FGFRs. Ils sont généralement disponibles par voie orale.

La plupart des ITKs non sélectifs de FGFRs présentent le plus souvent une inhibition des VEGFRs et des PDGFRs, ceci étant dû à une forte similarité de leurs domaines tyrosine kinase (Perera et al., 2017). Ces ITKs non sélectifs présentent l'avantage de cibler plusieurs RTKs et notamment de cibler la dérégulation de la voie FGF/FGFR et de bloquer l'activité d'acteurs majeurs de la néoangiogenèse. Ces ITKs non sélectifs présentent en contrepartie l'inconvénient de toxicités plus étendues essentiellement imputables à l'effet anti-angiogénique de l'inhibition des VEGFRs (hypertension, évènements cardiovasculaires, protéinurie) (Babina and Turner, 2017) (Dieci et al., 2013).

Parmi les ITKs non sélectifs de FGFRs, citons notamment (**Tableau 4**) :

**Le Lucitanib (E3810)** qui est un dérivé quinoline et un puissant ITK ciblant à la fois les FGFRs et les VEGFRs. Les valeurs d'IC50, IC50 qui représente la concentration inhibitrice médiane (c'est-à-dire la concentration nécessaire d'un antagoniste pour inhiber 50% de l'activité du récepteur en question)

ces valeurs d'IC50 sont très faibles de l'ordre du nanomolaire pour les récepteurs VEGFR1-3, FGFR1 et FGFR2 (**Tableau 4**). Cette molécule est utilisée dans des essais cliniques en oncologie, notamment dans le traitement des carcinomes mammaires ou broncho-pulmonaires avancés avec altération de la voie FGF/FGFR. Les effets secondaires décrits sont ceux de l'effet anti-angiogénique : hypertension et protéinurie ainsi qu'un hypothyroïdisme (Dieci et al., 2013) (Babina and Turner, 2017). A noter que l'hyperphosphatémie, un effet secondaire classique des inhibiteurs de FGFRs n'a pas été décrit (Roskoski, 2020).

**Le Dovitinib (TKI258)** qui est un dérivé quinoline-benzimidazole et un puissant ITK ciblant à la fois les VEGFRs, les FGFRs et le PDGFRB. Les valeurs d'IC50 sont de l'ordre du nanomolaire pour FGFR1-3, VEGFR1-3 et PDGFRB (**Tableau 4**). Cette molécule est utilisée dans des essais cliniques en oncologie, notamment dans le traitement des carcinomes à cellules rénales ou mammaires. A noter que l'hyperphosphatémie, un effet secondaire classique des inhibiteurs de FGFRs n'a pas été décrit. En revanche, le dovitinib entraîne une élévation plasmatique de FGF23, marqueur de l'inhibition de FGFR1. Ses principaux effets secondaires sont d'ordre gastro-intestinal et la fatigue. De façon intéressante, cette molécule présente une activité dans les cas de mutation « gatekeeper » V651M du gène *FGFR1* (Roskoski, 2020)(Babina and Turner, 2017).

Citons également **le ponatinib (AP24534), le Nintedanib (BIBF1120), le Brivanib (BMS582664) ou encore le Lenvatinib (E7080), en cours d'essais cliniques dans le traitement de cancers avancés ou métastatiques avec altérations de FGFRs (Cf Tableau 4).**

Du fait de leur caractère non sélectif, il est difficile de savoir si la voie FGF/FGFR est suffisamment inhibée et si les effets cliniques observés ne sont pas dus essentiellement à l'inhibition de la voie de signalisation VEGF/VEGFR (Babina and Turner, 2017).

**Tableau 4. Liste non exhaustive des ITKs anti-FGFRs non sélectifs.**

Nom de molécule	FGFRs (IC50)	Autres RTKs (IC50)	Essais cliniques impliquant la voie FGF/FGFR
<b>Dovitinib (TKI258)</b>	FGFR1 (8,0nM)	VEGFR1 (10nM)	Carcinomes urothéliaux avec mutation ou surexpression de FGFR3 (Phase I)
	FGFR3 (9,0nM)	VEGFR2 (13nM)	Tumeurs gastriques avec amplification de <i>FGFR2</i> (phase II)
	FGFR2 (40nM)	VEGFR3 (8nM) PDGFRβ (27nM) FLT3 (1nM) c-KIT (2nM)	Carcinomes épidermoïdes broncho-pulmonaires avec amplification <i>FGFR1</i> (phase II)
<b>Lucitanib (E3810)</b>	FGFR1 (17,5nM)	VEGFR1 (7nM)	Tumeurs solides avancées avec amplification de <i>FGFR1</i> (phase I)
	FGFR2 (82,5nM)	VEGFR2 (25nM)	Carcinomes mammaires métastatiques avec altération de FGFRs (Phase II)
		VEGFR3 (10nM)	Carcinomes mammaires métastatiques RE+ avec amplification 11q/ <i>FGFR1</i> (phase II)
<b>Ponatinib (AP24534)</b>	FGFR1 (2,2nM)	VEGFR2 (1,5nM)	Carcinomes biliaires avec fusion FGFR2 (phase II)
	FGFR2 (1,6nM)	PDGFRα (1,1nM)	Cancers de stade avancé avec altération FGFRs (phase II)
	FGFR3 (18,2nM)	ABL (<1nM)	
	FGFR4 (7,7nM)		
<b>Brivanib (BMS582664)</b>	FGFR3 (68nM)	VEGFR1 (380nM) VEGFR2 (25nM) VEGFR3 (10nM)	Carcinomes colo-rectaux métastatiques avec élévation des FGFs plasmatiques (phase II)
<b>Lenvatinib (E7080)</b>	FGFR1 (46nM)	VEGFR1 (22nM) VEGFR2 (4nM) VEGFR3 (5,2nM) PDGFRα (51nM) PDGFRβ (39nM)	Cancers avancés avec altérations de la voie FGF/FGFR (phase II)
<b>Nintedanib (BIBF1120)</b>	FGFR1 (69nM)	VEGFR1 (34nM)	Carcinomes urothéliaux avec mutation, surexpression ou sauvage pour FGFR3 (phase II)
	FGFR2 (37nM)	VEGFR2 (21nM) VEGFR3 (13nM)	
		PDGFRα (59nM)	Carcinomes non à petites cellules broncho-pulmonaires avancés après échec d'au moins deux lignes de chimiothérapie (phase II)

D'après Katoh. *Trends in Pharma Sci.*2016 et Babina and Turner. *Nat Rev Cancer.*2017

Pour les FGFRs seules les valeurs d'IC50 < 100nM sont mentionnées.

Parmi les ITKs sélectifs de FGFRs, on distingue principalement deux catégories, les inhibiteurs pan-FGFRs et les inhibiteurs ne ciblant que certains FGFRs. Généralement dans cette dernière catégorie, soit l'inhibition porte sur les FGFR1-3 (BGJ398, Debio1347) soit l'inhibition ne porte que sur FGFR4 (BLU9931) (Katoh, 2016b). Ces différences de sélectivité sont expliquées par l'analyse phylogénétique des 54 RTKs (**Cf Figure 6**) qui met en évidence une diversification de FGFR4 par rapport aux autres FGFR (Katoh, 2016a). De plus, l'alignement des séquences d'acides aminés des domaines

tyrosine kinase des 4 FGFRs révèle de fréquentes substitutions spécifiques à FGFR4, notamment au niveau de la position suivante occupée par une tyrosine (région charnière) : FGFR1 (Tyr563), FGFR2 (Tyr566), FGFR3 (Tyr557) qui est substituée par une cystéine sur FGFR4 (Cys552) (Kato, 2016a).

Malgré leur sélectivité, ces ITKs anti-FGFRs peuvent exercer une inhibition sur les VEGFRs mais dans une moindre mesure. Les effets secondaires des ITKs sélectifs des FGFRs sont très différents de ceux observés chez les patients traités par ITKs non sélectifs anti-FGFRs. Les effets secondaires le plus souvent rapportés et associés aux FGFRs sont : l'hyperphosphatémie, asthénie, sécheresse buccale ou oculaire, onycholyse, alopecie ou encore des calcifications tissulaires dues au blocage de la voie du ligand FGF23 (Dieci et al., 2013)(Touat et al., 2015).

Parmi ces ITKs sélectifs de FGFRs, citons notamment (**Tableau 5**) :

**Le JNJ-42756498 (Erdafitinib®) qui est un inhibiteur pan FGFRs et un dérivé des quinoxalines** (Perera et al., 2017). Les valeurs des IC50 rapportées initialement sont de l'ordre du nanomolaire pour les 4 FGFRs : FGFR1 (1,2nM), FGFR2 (2,5nM), FGFR3 (3nM) et FGFR4 (5,7nM) ; quant à la valeur de l'IC50 pour le VEGFR2 elle est de 36,8nM. Les valeurs des IC50 pour les FGFRs sont variables en fonction du type d'altération génétique et du FGFR concerné. Ces valeurs vont de 0,1nM (amplification de *FGFR2*) à 129,2nM (mutation *FGFR4* p.Y367C) (Perera et al., 2017). De plus, il est décrit une accumulation lysosomale de JNJ-42756493 qui pourrait contribuer à une inhibition anti-FGFR prolongée (Perera et al., 2017). En 2019, l'erdafitinib a été le premier ITK sélectif pan-FGFR autorisé en première ligne dans le traitement dans les carcinomes urothéliaux avec une mutation du gène *FGFR2* ou *FGFR3* ou en deuxième ligne dans le traitement dans les carcinomes urothéliaux localement avancés ou métastatiques après une chimiothérapie à base de sels de platine. Cette autorisation fait suite aux résultats de l'essai de phase II montrant un taux de réponse de 40% (IC95% 31-50) : 3% en réponse complète, 37% avec une réponse partielle. Les toxicités les plus fréquentes (> 50% des cas) étaient l'hyperphosphatémie (77%, dont 2% de grade 3 ou 4), une stomatite (58%, dont 10% de grade 3 ou 4) et une diarrhée (51%, dont 4% de grade 3 ou 4) (Loriot et al., 2019).

**Pour les raisons suivantes : inhibiteur sélectif pan FGFRs, valeurs d'IC50 très faibles, de l'ordre du nanomolaire pour les 4 FGFRs et relative sélectivité vis-à-vis du VEGFR2, c'est l'inhibiteur que nous avons sélectionné pour réaliser notre étude.**

**Le LY287445 qui est un inhibiteur pan FGFR** et un dérivé pyrazole-indazole. Cet inhibiteur pan FGFRs présentent des valeurs d'IC50 très faibles pour les 4 FGFRs mais également une valeur d'IC50 assez faible pour le VEGFR2, suggérant une inhibition de cette voie. Toutefois, il n'est pas décrit dans

la publication princeps d'effet secondaire à type d'hypertension à des doses efficaces *in vivo* (Zhao et al., 2011).

Les données des essais cliniques portant sur les ITKs sélectifs de FGFRs mettent en évidence des variations d'efficacité en fonction des altérations génétiques impliquées. Il semblerait que les effets inhibiteurs des TKIs sélectifs soient plus importants dans les cas de fusion avec FGFRs ou d'amplification FGFR2 que pour le traitement d'autres types d'altérations génétiques (Babina and Turner, 2017).

#### b. Anticorps monoclonaux et « pièges » à FGFs

D'autres types d'inhibiteurs sont en développement.

Les anticorps monoclonaux, tout d'abord tels que le MFGR1877S, spécifique de FGFR3, ou encore le FPA144 (Bemarituzumab), spécifique de l'isoforme FGFR2b. Ces anticorps monoclonaux sont en cours d'essais cliniques notamment dans des essais de phase I ou II dans le traitement de carcinomes urothéliaux ou myélomes et dans des essais de phases I ou III dans le traitement des cancers gastro-oesophagiens, respectivement.

Les « pièges » à FGFs dont le rôle est de séquestrer les FGFs pour empêcher leur liaison et donc l'activation de leurs récepteurs. Citons le FP-1039, un piège à FGFs consistant la portion extracellulaire du variant FGFR1 IIIc, en cours d'essais cliniques de phase I dans le traitement de cancers endométriaux ou de tumeurs solides avancées.



**Tableau 5. Liste non exhaustive des ITKs anti-FGFRs sélectifs.**

Nom de molécule	FGFRs (IC50)	Autres RTKs (IC50)	Essais cliniques
<b>AZD4547</b> <b>Anti FGFR1-3</b>	<b>FGFR1 (0,2nM)</b> <b>FGFR2 (1,8nM)</b> <b>FGFR3 (2,5nM)</b> FGFR4 (165nM)	VEGFR2 (24nM)	Carcinomes non à petites cellules broncho-pulmonaires avec altérations FGFRs (phase II) Carcinomes à petites cellules broncho-pulmonaires avec altérations FGFRs (phase II)
<b>JNJ42756493</b> <b>Erdafitinib</b> <b>Anti panFGFRs</b>	<b>FGFR1 (&lt;1nM)</b> <b>FGFR2 (&lt;1nM)</b> <b>FGFR3 (1.1nM)</b> <b>FGFR4 (&lt;1nM)</b>	VEGFR2 (50nM)	Carcinomes urothéliaux avancés ou métastatiques avec altérations FGFRs (phases I, II, III) Carcinomes mammaires métastatiques RE+/HER2-/FGFR amplifié (phase I) Tumeurs solides, lymphomes non-Hodgkiniens, lésions histiocytaires (pediatric MATCH treatment trial) (phase II)
<b>BGJ398</b> <b>Infigratinib</b> <b>Anti FGFR1-3</b>	<b>FGFR1 (0,9nM)</b> <b>FGFR2 (1,4nM)</b> <b>FGFR3 (1,0nM)</b> FGFR4 (60nM)		Gliomes avec fusion FGFR1-TACC1 ou FGFR3-TACC3 ou mutations FGFR1-3 (phase II) Cancers solides ou hématologiques avec altérations de FGFRs (phase II) Cholangiocarcinomes avec fusion FGFR2 en 1 <sup>ère</sup> ligne (phase III)
<b>LY2874455</b> <b>Anti panFGFRs</b>	<b>FGFR1 (2,8nM)</b> <b>FGFR2 (2,6nM)</b> <b>FGFR3 (6,4nM)</b> FGFR4 (6,0nM)	VEGFR2 (7nM)	Cancers avancés (phase I) Leucémies aiguës myéloïdes en rechute ou réfractaires (phase I)
<b>TAS-120</b> <b>Anti panFGFRs</b>	<b>FGFR1 (3,9nM)</b> <b>FGFR2 (1,3nM)</b> <b>FGFR3 (1,6nM)</b> <b>FGFR4 (8,3nM)</b>		Myélomes ou tumeurs solides avancés avec altérations FGFRs (phase I) Carcinomes mammaires avancés avec amplification FGFR2 (phase II) Sarcomes des tissus mous (MULTISARC) (phase III)
<b>Debio 1347</b> <b>Anti FGFR1-3</b>	<b>FGFR1 (9,3nM)</b> <b>FGFR2 (7,6nM)</b> <b>FGFR3 (22nM)</b> FGFR4 (290nM)		Tumeurs solides avancées avec altérations FGFR1-3 (phase I) Carcinomes mammaires métastatiques (phase I/II)

D'après Katoh. *Trends in Pharma Sci.*2016 et Babina and Turner. *Nat Rev Cancer.*2017

## Ce qu'il faut retenir

- Chez l'Homme, la voie de signalisation FGF/FGFR est constituée de **22 FGFs dont 18 ligands FGFs** (paracrines et endocrines) et de **quatre FGFRs, récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase**.
- Lorsque le ligand FGF se fixe sur son récepteur, le FGFR se dimérise, se transphosphoryle et entraîne **l'activation de voies de signalisation intracellulaires en aval** : la voie PLC $\gamma$ , la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2, la voie PI3K/AKT et la voie JAK/STAT avec pour conséquences : la **prolifération, la survie et la motilité cellulaire et l'angiogenèse**. Pour être activées, certaines de ces voies nécessitent l'activation d'une **protéine adaptatrice, FRS2**, située directement en aval du récepteur.
- La voie de signalisation FGF/FGFR est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, notamment les cancers.
- La dérégulation de la voie de signalisation FGF/FGFR résulte soit de mécanismes FGFRs dépendants : amplification génique ou mécanismes post-traductionnels entraînant la surexpression du récepteur, mutations ponctuelles ou translocations entraînant une activation constitutive du récepteur soit de mécanismes FGFRs indépendants, liés à l'expression du ligand FGF. **L'activation aberrante de la voie de signalisation FGF/FGFR est rapportée d'environ 20% des cas de cancers** : 14% d'anomalies des FGFs et 7% d'anomalies des FGFRs. Parmi les cancers avec altération de la voie FGF/FGFR, on retient particulièrement les carcinomes urothéliaux, mammaires, endométriaux et épidermoïdes broncho-pulmonaires.
- **La fréquence de la dérégulation de la voie FGF/FGFR a conduit au développement de thérapies ciblant cette voie, avec notamment les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) sélectifs et non sélectifs des FGFRs.**

## Les problématiques soulevées

- **La dérégulation de la voie FGF/FGFR est-elle impliquée dans la liposarcomagenèse des TLA/LBD et LDD ?**

## INTRODUCTION – PARTIE III

### La Voie De Signalisation FGF/FGFR Et Les Liposarcomes Bien Différenciés Et Dédifférenciés (LBD/LDD)

---

Les données concernant l'implication de la voie FGF/FGFR dans la tumorigenèse des TLA/LBD et LDD sont peu nombreuses. Sur Pubmed, les termes « FGFR » [AND] « liposarcoma » génèrent 9 résultats. Même si les termes « FRS2 » [AND] « liposarcoma » ne génèrent eux aussi que 9 résultats, la littérature fait état de l'association du gène *FRS2* et des TLA/LBD et LDD.

#### 1. Amplification et surexpression du gène *FRS2* dans les LBD/LDD

Depuis 1993, l'origine des séquences constituant les néochromosomes caractéristiques des TLA/LBD et LDD est connue, il s'agit de séquences issues du bras long du chromosome 12, nécessairement, mais non exclusivement (Pedeutour et al., 1993). Depuis cette date, la liste des gènes impliqués dans cette amplification 12q13-15 n'a cessé de croître, notamment grâce aux résultats d'analyses quantitatives pan génomiques (CGH/SNP-array).

Les premiers articles ayant mis en évidence l'amplification du gène *FRS2* dans les TLA/LBD et LDD sont les suivants :

**En 2007, le gène *FRS2* a été identifié comme étant surexprimé dans les LDD** parmi 80 gènes différentiellement exprimés dans les LDD et LPS pléomorphes (Singer et al., 2007).

**En 2008, le gène *FRS2* figurait parmi les gènes amplifiés sur l'amplicon 12q**, identifiés par technique de CGH-array à partir de la lignée cellulaire GOT3 issue d'un LBD (Persson et al., 2008).

**En 2011, l'amplification du gène *FRS2* était confirmée sur 21 cas de LBD et 17 cas de LDD**, par technique de CGH-array, et corrélée à l'expression de l'ARNm (Tap et al., 2011).

**Depuis, de nombreuses études ont rapporté cette amplification du gène *FRS2* et notamment, celle du réseau de recherche du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), portant sur 50 cas de LDD, dans laquelle cette amplification récurrente du gène *FRS2* était présente dans 96% des cas.**

Dans notre expérience, au laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides, cette amplification est également très fréquente, présente dans 96% des cas (analyses de 67 tumeurs primaires TLA/LBD et LDD, en routine diagnostique). A noter que le gène *FRS2* est localisé à 625 kb du gène *MDM2* ; leurs coordonnées génomiques respectives sont : *FRS2*, chr12:69.864.129–69.973.562 et *MDM2*, chr12:69.201.971-69.239.320.

Cette amplification est également corrélée à la surexpression de l'ARNm du gène *FRS2* (Tap et al., 2011)(Wang et al., 2011).

## 2. Niveau d'expression et activation de la protéine *FRS2* dans les LBD/LDD

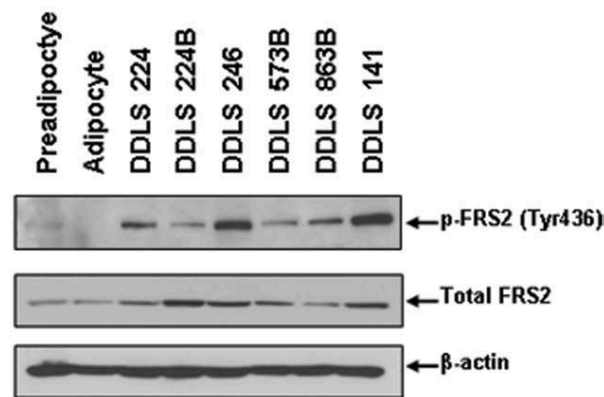
A ma connaissance, **seules trois études se sont intéressées au niveau d'expression de la protéine *FRS2* et à son activation.** L'une portant sur l'analyse de tumeurs primaires (11 cas de LDD) (Zhang et al., 2013) et les deux autres sur des lignées cellulaires issues de LDD (Wang et al., 2011) (Hanes et al., 2019).

**En 2011, Wang et al.** réalisaient une étude d'expression du gène *FRS2* au niveau de l'ADN, de l'ARNm sur des cas de LBD et LDD et au niveau de la protéine *FRS2* seulement sur des lignées de LDD (6 au total). Leurs conclusions étaient les suivantes :

- Présence d'une amplification récurrente du gène *FRS2* dans 94% (15 sur 16 cas de LBD étudiés par CGH-array), confirmée par une analyse FISH sur 35 cas de LBD et 22 cas de LDD (100% des cas).
- Présence d'une surexpression de l'ARNm de *FRS2* (dans les cas de LBD et LDD : expression de *FRS2* de l'ordre de 20 fois supérieure à celle des lipomes et expression supérieure à 25-30 fois celle du tissu adipeux).
- Présence d'une expression élevée de la protéine *FRS2* phosphorylée sur le résidu Tyr436 dans les 6 lignées de LDD testées (Wang et al., 2011).

Toutefois, l'analyse des images de western blot (WB) montrait une expression de la protéine *FRS2* totale dans les 6 lignées de LDD (avec des niveaux variables d'une lignée à l'autre) et une expression de *FRS2* également dans les contrôles (adipocytes ou pré-adipocytes en l'absence d'amplification du gène *FRS2*). Quant à la phosphorylation de *FRS2* (Tyr436), elle était présente dans les 6 lignées de LDD, variable d'une lignée à l'autre et absente des contrôles (**Figure 16**).

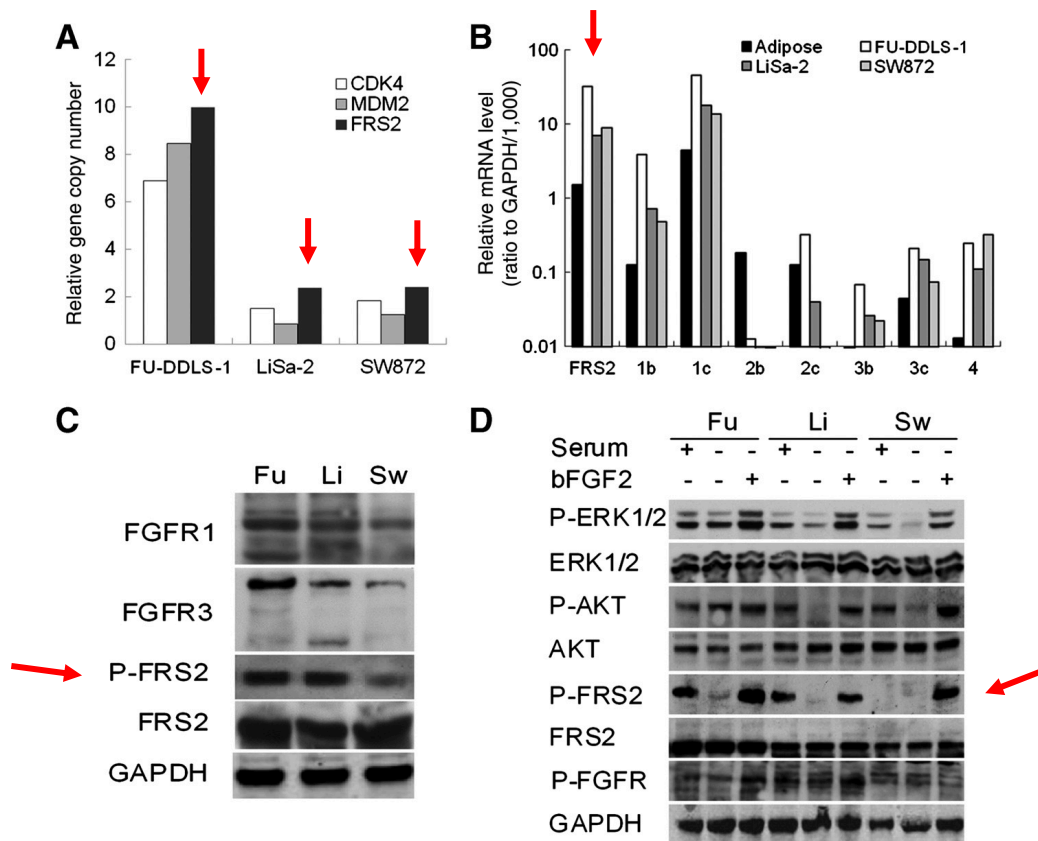
Figure 16. Niveau d'expression et de phosphorylation de la protéine FRS2 (selon Wang et al. 2011).



En 2013, Zhang et al. réalisaient une étude d'expression et une étude fonctionnelle de la protéine FRS2 dans des cas de liposarcomes de haut grade, en comparant LDD et sarcomes indifférenciés et pléomorphes de haut grade et dans trois lignées cellulaires. Leurs résultats étaient les suivants :

- Présence d'une amplification récurrente du gène *FRS2* dans 93% des cas de LDD (14 sur 15 cas étudiés en q-PCR) et dans seulement une lignée cellulaire FU-DDLS-1. A noter que l'autre lignée annoncée comme étant une lignée de LDD (SW872) ne présentait pas l'amplification 12q.
- Présence d'une surexpression de l'ARNm *FRS2* dans les trois lignées (surtout dans la FU-DDLS-1).
- Présence d'une expression détectée par IHC de la protéine FRS2 dans 82% des LDD (9 cas sur 11) et présence d'une activation de la voie avec phosphorylation de la protéine FRS2.
- Présence d'une expression détectée par WB de la protéine FRS2 dans les 3 lignées, décrite par les auteurs comme étant discrètement plus faible dans la lignée FU-DDLS-1, suggérant des mécanismes de régulation post transcriptionnelle.
- Cette activation de la voie de signalisation FGFR/FRS2 était positivement régulée par la stimulation par FGF2 (Zhang et al., 2013) (Figure 17).

**Figure 17. Niveau d'expression et de phosphorylation de FRS2 (selon Zhang et al. 2013).**



Les données concernant FRS2 sont signalées par une flèche rouge.

En 2019, Hanes et al. réalisaient, entre autres, une étude d'expression de l'ARNm et de la protéine FRS2 sur trois lignées issues de LDD. Leurs résultats étaient les suivants :

- Présence d'une surexpression du gène *FRS2* dans les trois lignées à des niveaux comparables (unité utilisée : fragments per kilobase million, FPKM) : 52,0, 51,8 et 44,3 pour les lignées NRH-LS1, LPS510 et LPS853, respectivement.
- Présence d'une expression détectée par WB de la protéine FRS2 totale dans les trois lignées alors que la phosphorylation de FRS2 n'était observée que dans les cellules stimulées par FGF et non à l'état basal ; ceci étant probablement dû au fait que la phosphorylation soit en dessous du seuil de détection avec l'anticorps utilisé (Hanes et al., 2019).

D'après ces résultats issus de trois études, nous pouvons conclure que **l'amplification et la surexpression en ARNm du gène *FRS2* ne sont pas nécessairement corrélées au niveau d'expression de la protéine et encore moins à son niveau d'activation et de phosphorylation.** Comme avancé par les auteurs, il est probable que des mécanismes de régulation post transcriptionnelle soient impliqués dans ces différences d'expression.

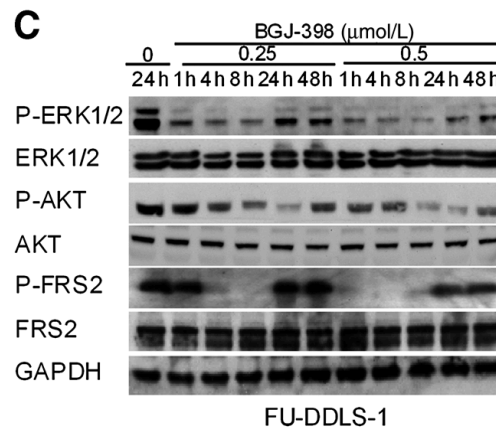
**L'amplification du gène *FRS2* n'est donc pas un biomarqueur fiable** pour prédire l'activation de la voie de signalisation FGF/FGFR dans les TLA/LBD et LDD.

### 3. En amont de *FRS2*, les FGFRs sont-ils exprimés et activés dans les LBD/LDD ?

Rappelons que *FRS2* est une protéine adaptatrice capable de se lier à plusieurs RTKs au premier rang desquels les FGFRs, mais également les Rc à la neurotrophine, RET et ALK (Gotoh, 2008). Il est nécessaire de s'assurer qu'en amont de l'activation de *FRS2*, le récepteur impliqué dans la liposarcomagenèse, est bien un des FGFRs.

Au début de mon travail de thèse, seule l'étude de **Zhang et al. en 2013**, avait mis en évidence à partir d'une lignée cellulaire issue de LDD, la lignée FU-DDLS-1, la surexpression d'ARNm du gène *FGFR1* et l'activation de la voie de signalisation FGFR/*FRS2* avec phosphorylation de la protéine FGFR, après stimulation par FGF2 (Cf. **Figure 17**) (Zhang et al., 2013). Dans cette même étude, les auteurs avaient analysé les effets de l'ITK sélectif anti FGFR1-3, le BGJ398 sur la prolifération et sur les voies de signalisation en aval des FGFRs. Sur la prolifération cellulaire, le BGJ398 entraînait une diminution de la prolifération avec une valeur d'IC50 de 0.25µM pour la lignée FU-DDLS-1 (Zhang et al., 2013). Sur les voies de signalisation en aval des FGFRs, le BGJ398 conduisait à une diminution de la phosphorylation des protéines *FRS2*, AKT et des MAP Kinases ERK1/2 (Zhang et al., 2013). Cependant, l'effet sur les voies d'aval était transitoire avec rebond après 24 à 48h de traitement par BGJ398 suggérant l'activation de mécanismes de rétrocontrôle capables de réactiver ces voies intracellulaires (Zhang et al., 2013) (**Figure 18**).

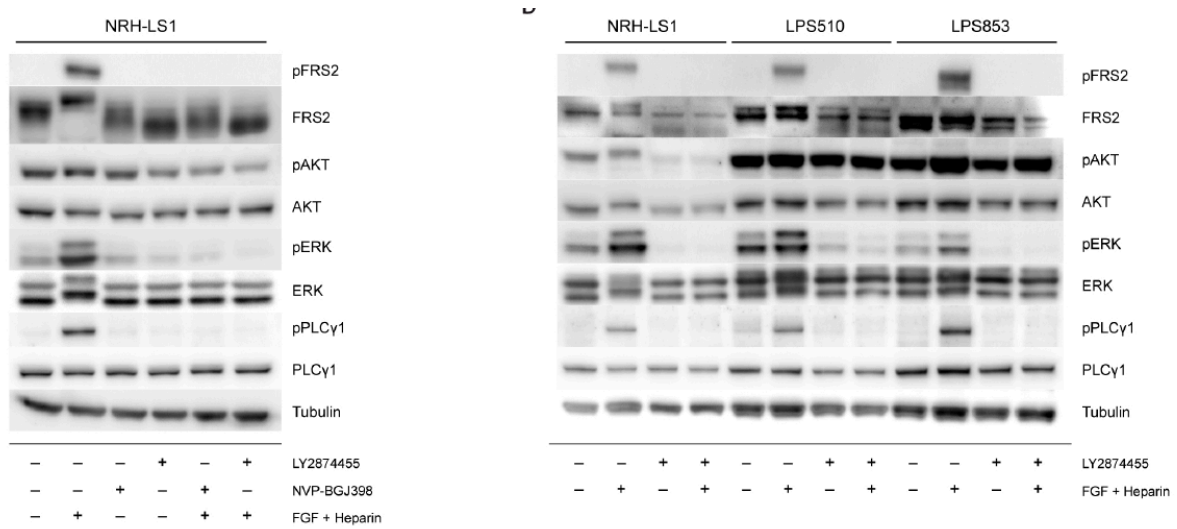
**Figure 18. Effets du BGJ398 sur la phosphorylation de FRS2 et sur les voies de signalisation en aval (selon Zhang et al. 2013).**



Depuis le début de mon travail de thèse, en 2019, Hanes et al. ont étudié sur 3 lignées issues de LDD avec amplification et surexpression du gène *FRS2* (NRH-LS1, LPS510 et LPS853) les effets d'un ITK sélectif pan FGFRs, le LY2874455, *in vitro*, sur la prolifération et les voies en aval. Ils ont montré une différence de sensibilité des cellules à cette drogue : sur la prolifération avec des valeurs d'IC50 de 5,5nM pour LPS510, de 6,9nM pour NRH-LS1 et de 100nM pour LPS853 (Hanes et al., 2019). Ils ont comparé les effets du LY2874455 sur la prolifération et l'apoptose avec les effets d'un autre ITK sélectif anti FGFR1-3 le BGJ398, avec de meilleurs résultats pour le traitement par LY2874455 (Figure 19) (Hanes et al., 2019). Afin d'élucider les différents profils de sensibilité des lignées aux ITKs, une étude d'expression de l'ARNm des quatre FGFRs a mis en évidence un niveau d'expression de *FGFR1* important dans les 3 lignées, alors qu'une seule lignée exprimait *FGFR4* (LPS853, la lignée la moins sensible au LY2874455) et il était détecté un niveau très bas de *FGFR2* et *FGFR3* (Hanes et al., 2019). Il n'était pas mis en évidence de mutation ou translocation sur les 4 FGFRs. Les effets *in vitro* du LY2874455 ont été confirmés *in vivo* sur un modèle de PDX (patient-derived xenograft).



**Figure 19. Effets du LY2874455 et du BGJ398 sur la phosphorylation de FRS2, ERK, AKT et PLC $\gamma$  (selon Hanes et al. 2019).**



Les conclusions que l'on peut tirer de ces deux études sont que certains FGFRs peuvent être surexprimés et notamment les gènes *FGFR1* et/ou *FGFR4*. Ces résultats doivent être confirmés au niveau protéique par analyses de WB et d'IHC, sur des lignées mais surtout sur des tumeurs primaires. De plus, la phosphorylation des FGFRs et donc l'activation de la voie FGF/FGFR reste à étudier. Les effets d'inhibiteurs de FGFRs *in vitro* et *in vivo* sont très encourageants et méritent d'être confirmés sur d'autres lignées cellulaires et avec d'autres inhibiteurs de FGFRs.

## Ce qu'il faut retenir

- Les données récentes de la littérature ont mis en évidence que le gène *FRS2*, localisé en 12q était co-amplifié avec le gène *MDM2* dans 96% des cas d'TLA/LBD et LDD.
- En revanche, les rares études portant sur l'expression protéique de *FRS2* et son activation suggèrent l'absence de corrélation entre cette amplification génomique et l'expression de la protéine et encore moins sa phosphorylation.
- Les données concernant l'implication d'un des quatre FGFRs sont encore plus restreintes :
- Zhang et al., dans une étude par qRT-PCR montraient sur une lignée issue de LDD la surexpression de *FGFR1*.
- Hanes et al., dans une étude transcriptomique portant sur 3 lignées cellulaires issues de LDD ont mis en évidence la surexpression de *FGFR1* dans les 3 lignées et la surexpression de *FGFR4* dans seulement une lignée. *FGFR2* et *FGFR3* n'étaient pas surexprimés.
- Les effets d'ITKs sélectifs de FGFRs (BGJ398, LY2874455) sur la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore les voies de signalisation en aval de la voie ont montré des résultats encourageants *in vitro* (une lignée de LDD, Zhang et al. 2013 et trois lignées de LDD, Hanes et al. 2019) et *in vivo* (un modèle de PDX, Hanes et al.).

## Les problématiques soulevées

- Les données de la littérature sur l'implication de la voie FGF/FGFR sont très rares et nécessitent d'être confirmées.
- A ce jour, aucune étude n'a porté sur l'analyse de l'expression protéique des quatre FGFRs dans une large série de tumeurs primaires (LBD et LDD).
- Les effets d'inhibiteurs sélectifs de FGFRs montrant des résultats encourageants sur la prolifération cellulaire, l'apoptose, le cycle cellulaire, la survie à long terme, les voies de signalisation en aval doivent être validés *in vitro* et *in vivo* sur de nouveaux modèles et avec de nouvelles drogues. Ces résultats pourraient être transférés aux patients atteints de LBD/LDD.
- Si l'efficacité des traitements anti-FGFRs se confirme, et dans la mesure où les traitements par monothérapie sont rarement efficaces à long terme avec l'émergence de phénomènes de résistance secondaires, l'action combinée de deux thérapies associant un inhibiteur de FGFRs et une autre molécule ciblant une autre voie doit être testée.
- L'identification de biomarqueurs fiables permettant de sélectionner les patients pouvant bénéficier de ces inhibiteurs de FGFRs demeure un défi.

## PRINCIPAUX RESULTATS

---

Les dernières problématiques soulevées quant à l'implication de la voie FGF/FGFR dans la tumorigenèse des LBD/LDD (Cf. § Introduction partie III) nous ont amenées à réaliser (1) une étude d'expression des FGFRs sur une grande série de tumeurs primaires de LBD/LDD et (2) une étude fonctionnelle des effets d'un inhibiteur pan-FGFRs très spécifique, le JNJ42756493 (erdafitinib) seul ou en association avec d'autres molécules sur des modèles *in vitro* de lignées cellulaires issues de LBD/LDD et *in vivo* de xénogreffes de souris pour terminer (3) par l'illustration de l'effet de ce traitement anti-FGFR, le JNJ42756493 (erdafitinib), chez un patient atteint de LDD avancé au cours d'un essai clinique de phase I.

**Nos résultats sont présentés dans le manuscrit intitulé : « Novel therapeutic insights in dedifferentiated liposarcoma: a role for FGFR and MDM2 dual targeting », soumis dans Clinical Cancer Research (document pdf de la soumission joint après la synthèse des principaux résultats).**

Pour faciliter la lecture, les principaux résultats de cet article sont présentés dans ce chapitre.

## I. Analyses de l'expression des 4 FGFRs sur des tumeurs primaires

### 1. Identification d'un sous-groupe de tumeurs primaires (LBD ou LDD) surexprimant la protéine FGFR1 et /ou FGFR4 (analyse IHC) et corrélation pronostique

Dans un premier temps, nous avons analysé en IHC, 418 tumeurs primaires dont 127 LBD et 291 LDD (issues de 358 patients) (**Figure 20**). Pour 47 patients, l'analyse des récurrences ou des métastases a également été réalisée, sans que des variations significatives n'aient été mises en évidence entre les différents prélèvements.

L'analyse IHC a été réalisée sur Tissue-Micro-Array (TMA) dans 282 cas incluant pour chaque cas, 3 « spots » représentatifs. Les autres cas étaient examinés sur coupe entière.

La détermination de score d'expression en IHC était réalisée comme suit : Pourcentage de cellules marquées (allant de 0 à 100%) x intensité d'expression (allant de 0 à 3). Les scores variaient de 0 à 300. Le seuil de positivité était défini par analyse biostatistique et celui retenu permettait la meilleure discrimination des deux populations en termes de survie. La surexpression de FGFR1 correspondait à un score supérieur ou égal à 50 et la surexpression de FGFR4, un score supérieur ou égal à 5.

Nous avons identifié un sous-groupe de tumeurs qui surexprimait FGFR1 (27%) ou FGFR4 (27%) ; **à noter qu'il s'agissait majoritairement de LDD**. Un sous-groupe présentait une surexpression conjointe de FGFR1 et FGFR4 (11%). Il n'était pas détecté d'expression de FGFR2 ou FGFR3 (**Tableau 6**).

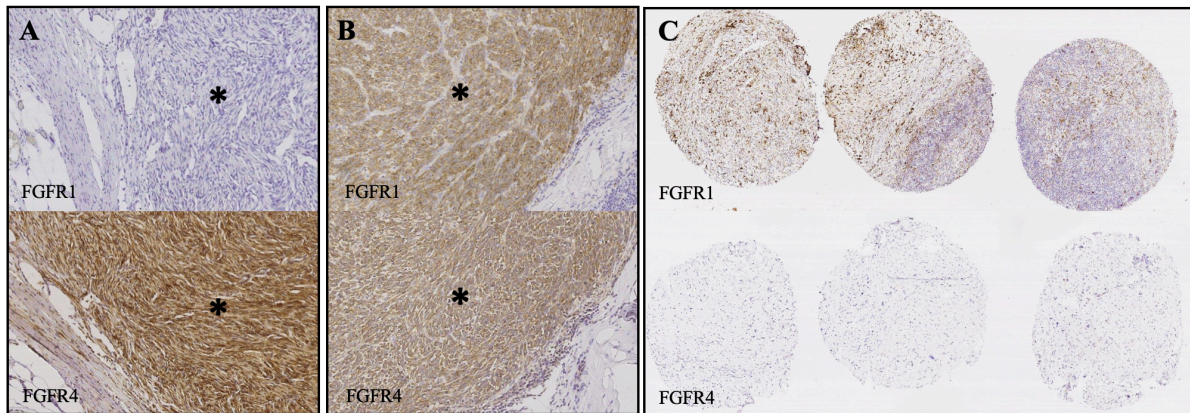
**Tableau 6. Expression de FGFR1 et FGFR4 dans notre série de 418 cas de LBD (WDLPS)/LDD (DDLPS).**

	All LPS (n=418)	WDLPS (n=127)	DDLPS (n=291)
FGFR1 expression			
< 50	304 (73%)	113 (89%)	191 (66%)
>= 50*	114 (27%)	14 (11%)	100 (34%)
FGFR4 expression			
< 5	307 (73%)	109 (86%)	198 (68%)
>= 5*	111 (27%)	18 (14%)	93 (32%)
FGFR1+FGFR4 co-overexpression			
FGFR1<50 and FGFR4<5	237 (57%)	100 (79%)	137 (47%)
FGFR1<50 and FGFR4>=5	67 (16%)	13 (10%)	54 (19%)
FGFR1>=50 and FGFR4<5	70 (17%)	9 (7%)	61 (21%)
FGFR1>=50 and FGFR4>=5§	44 (11%)	5 (4%)	39 (13%)

Abréviations : WDLPS correspond à LBD et DDLPS, à LDD.

\*, correspond au seuil de surexpression ; §, correspond à la co-expression

**Figure 20. Analyse IHC de la série de 418 cas de TLA/LBD et LDD.**

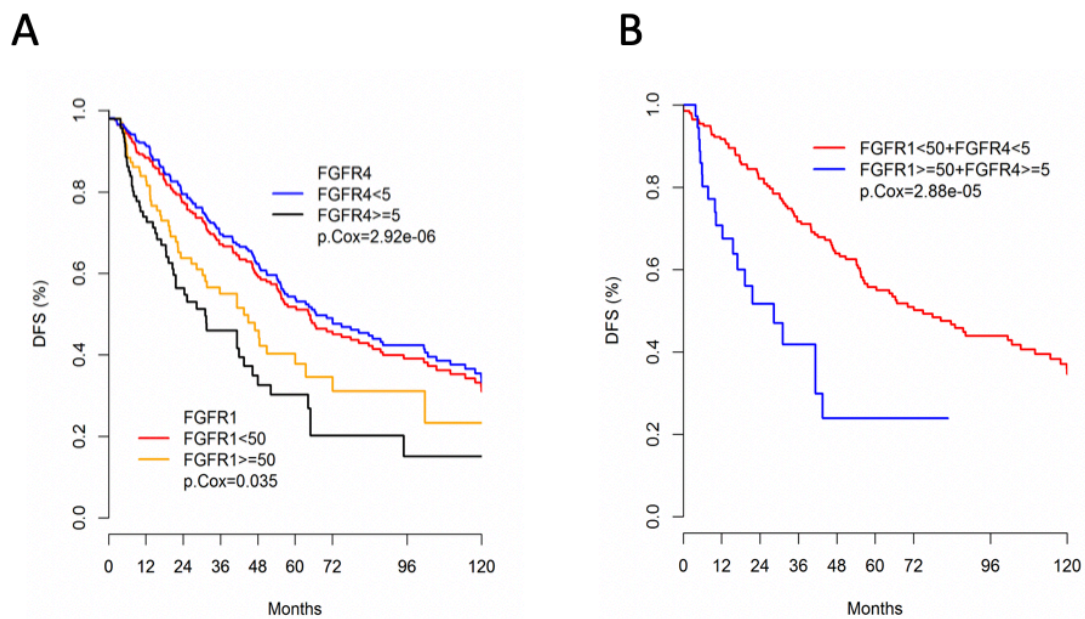


**Figure 20. Analyse IHC de la série de 418 cas de TLA/LBD et LDD.** A. Illustration d'un cas de LDD (cellules tumorales \*), FGFR1 négatif et FGFR4 surexprimé (score 300). B. Illustration d'un cas de LDD, FGFR1 surexprimé (score 300) et FGFR4 surexprimé (score 300). C. Illustration d'un cas de LDD (étudié en TMA), FGFR1 surexprimé (score 240) et FGFR4 négatif.

Nous avons ensuite analysé la valeur pronostique de cette surexpression dans notre cohorte de 358 patients.

Concernant la survie sans progression (DFS), en analyse univariée, étaient corrélées à un risque de récurrence : la surexpression de FGFR1 avec un Hazard Ratio, HR=1,4, 95%CI [1.0-2.0], p=0.03 ; la surexpression de FGFR4 : HR=2,2, 95%CI [1.6-3.1], p<0.0001 ; de même que la surexpression conjointe de FGFR1+FGFR4 : HR=2,9, 95%CI [1.8-4.9], p<0.0001 (**Figure 21**). L'analyse multivariée confirmait que la surexpression de FGFR1 et la co-expression FGFR1+FGFR4 étaient des facteurs de risque indépendants de mauvais pronostic, avec des valeurs : HR=1,9, 95%CI [1.4-2.7], p=0.00015 et HR=2,1, 95%CI [1.3-3.4], p=0.0025, respectivement.

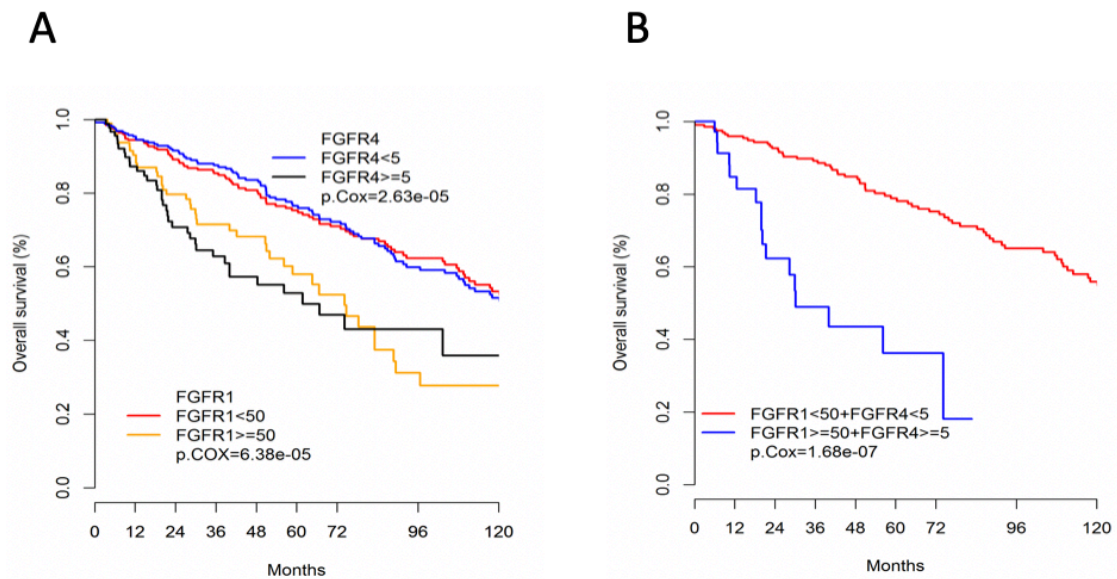
**Figure 21. Valeur pronostique de l'expression IHC de FGFR1, FGFR4 ou de la co-expression FGFR1+FGFR4, en termes de survie sans progression (DFS).**



Concernant la survie globale (OS), l'analyse univariée montrait un risque majoré pour les patients présentant une surexpression de FGFR1 : HR=2,1, 95%CI [1.5-3.0],  $p < 0.0001$  ; une surexpression de FGFR4 : HR=2,3, 95%CI [1.6-3.4],  $p < 0.0001$  et la co-expression FGFR1+FGFR4 : HR=4,7, 95%CI [2.6-8.4],  $p < 0.0001$  (**Figure 22**). Les résultats de l'analyse multivariée étaient concordants avec les valeurs suivantes : surexpression de FGFR1 : HR=1,9, 95%CI [1.2-3.0],  $p=0.008$  ; surexpression de FGFR4 : HR=2,0, 95%CI [1.2-3.1],  $p=0.006$  et surexpression conjointe FGFR1+FGFR4 : HR=4,0, 95%CI [2.1-7.8],  $p < 0.0001$ .



**Figure 22. Valeur pronostique de l'expression IHC de FGFR1, FGFR4 ou de la co-expression FGFR1+FGFR4, en termes de survie globale (OS).**



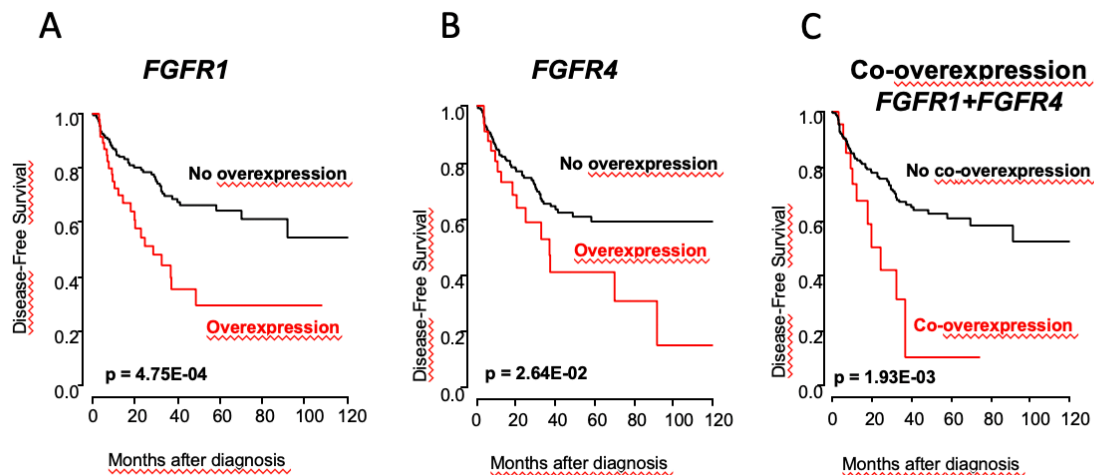
## 2. Confirmation de nos résultats sur une cohorte de validation (analyse de l'ARNm) et corrélation pronostique

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer nos résultats sur une cohorte indépendante de 276 patients issue de données publiques avec une analyse de l'expression des FGFRs au niveau de l'ARNm et comparaison avec l'expression du tissu adipeux normal.

Nous avons obtenu des résultats concordants avec nos analyses IHC. Un sous-groupe de patients présentait une surexpression de *FGFR1* (22%), de *FGFR4* (18%) et une co-expression *FGFR1+FGFR4* (9%).

L'analyse univariée sur la DFS confirmait le mauvais pronostic de la surexpression de *FGFR1* : HR=2,4, 95%CI [1.4-3.9], p=0.00069 ; de la surexpression de *FGFR4* : HR=1,9, 95%CI [1.1-3.3], p=0.029 et de la co-expression *FGFR1+FGFR4* : HR=2,6, 95%CI [1.4-4.9], p=0.0028 (**Figure 23**).

Figure 23. Valeur pronostique de l'expression en ARNm de *FGFR1* (A), *FGFR4* (B) ou de la co-expression *FGFR1+FGFR4* (C), en termes de survie sans progression (DFS).



## II. Implication de la voie FGF/FGFR dans la liposarcomagenèse

### 1. Analyse d'expression des FGFRs dans un panel de lignées cellulaires issues de LBD et LDD

L'analyse a porté sur trois lignées établies dans nos laboratoires : la lignée 93T449 (lignée issue d'un LBD), les lignées IB111 et IB115 (lignées issues de LDD) et la lignée IB136 (lignée contrôle, issue d'un leiomyosarcome des tissus mous, LMS).

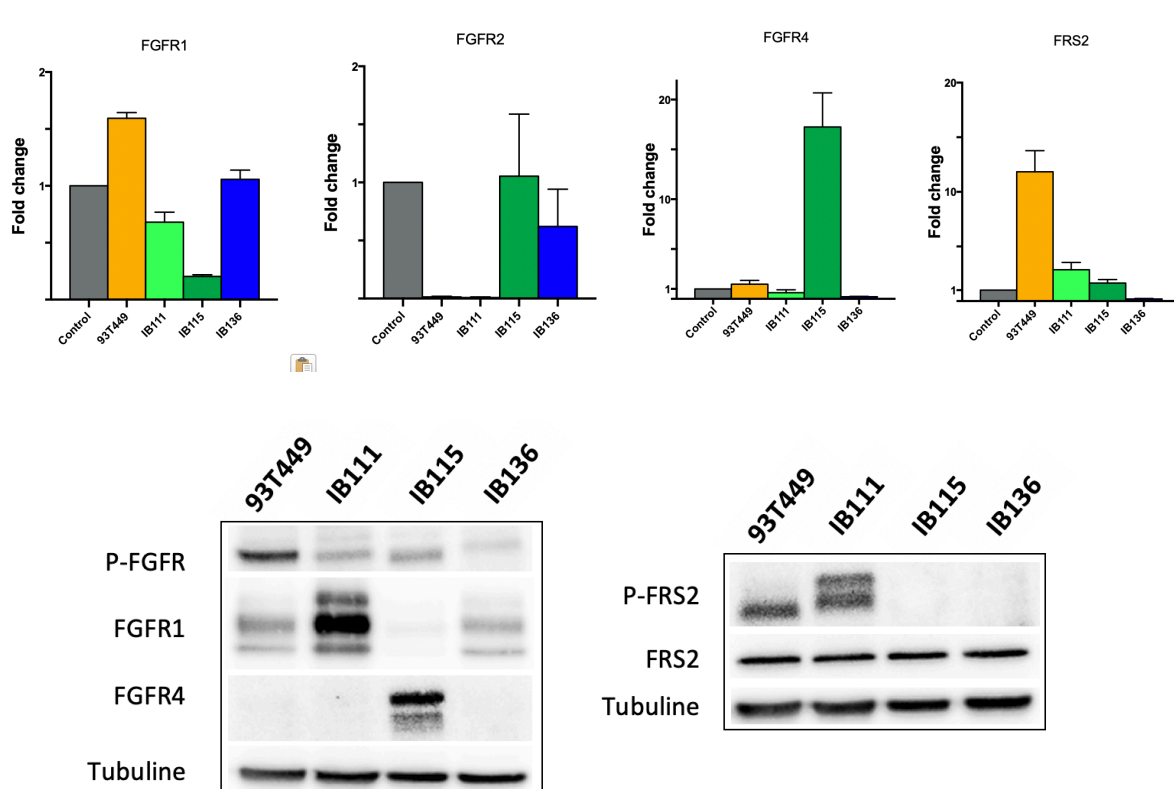
Nous avons observé des profils d'expression de FGFRs comparables à ceux observés dans les tumeurs primaires :

- Une absence d'expression de FGFR2 ou FGFR3 (pour *FGFR3*, les résultats de qRT-PCR montraient des valeurs de Ct à la limite du seuil de détection et donc les histogrammes n'ont pas été représentés), en ARNm et au niveau protéique,
- Une expression de FGFR1 ou FGFR4 (avec une très bonne concordance entre les niveaux de l'ARNm et de la protéine). De plus, à l'état basal, on observait une phosphorylation de la

protéine FGFR sur les résidus Tyr653/654 (communs aux 4 FGFRs), prédominant sur la lignée 93T449 (**Figure 24**), témoignant de l'activation constitutive de la voie.

- A noter que pour FRS2, on observait une surexpression du gène *FRS2* essentiellement dans la lignée 93T449 et que ce haut niveau d'expression génique n'était pas corrélé au niveau d'expression protéique. En effet, le même niveau d'expression de FRS2 était observé dans nos trois lignées issues de LBD/LDD ainsi que dans la lignée contrôle. Malgré ce niveau d'expression protéique équivalent, la protéine FRS2 n'était phosphorylée à l'état basal que dans deux lignées, 93T449 et IB111 (**Figure 24**).

**Figure 24. Expression des FGFRs et de FRS2 au niveau ARNm (\*) et protéique dans nos lignées, à l'état basal.**



(\*) Analyse par qRT-PCR : Fold changes calculés par rapport au contrôle (tissu adipeux normal, issu de dermolipectomies, en utilisant comme gène de référence *RPLPO*). A noter que l'expression de *FGFR1* était assez abondante dans toutes les lignées cellulaires (valeurs de  $\Delta Ct$  allant de 3,6 à 6,65) mais également dans le contrôle, ce qui « sous-estime » le niveau d'expression de *FGFR1* dans nos lignées par cette représentation.

## 2. Effets de l'inhibiteur pan FGFR, JNJ42756493, sur nos lignées issues de LBD et LDD

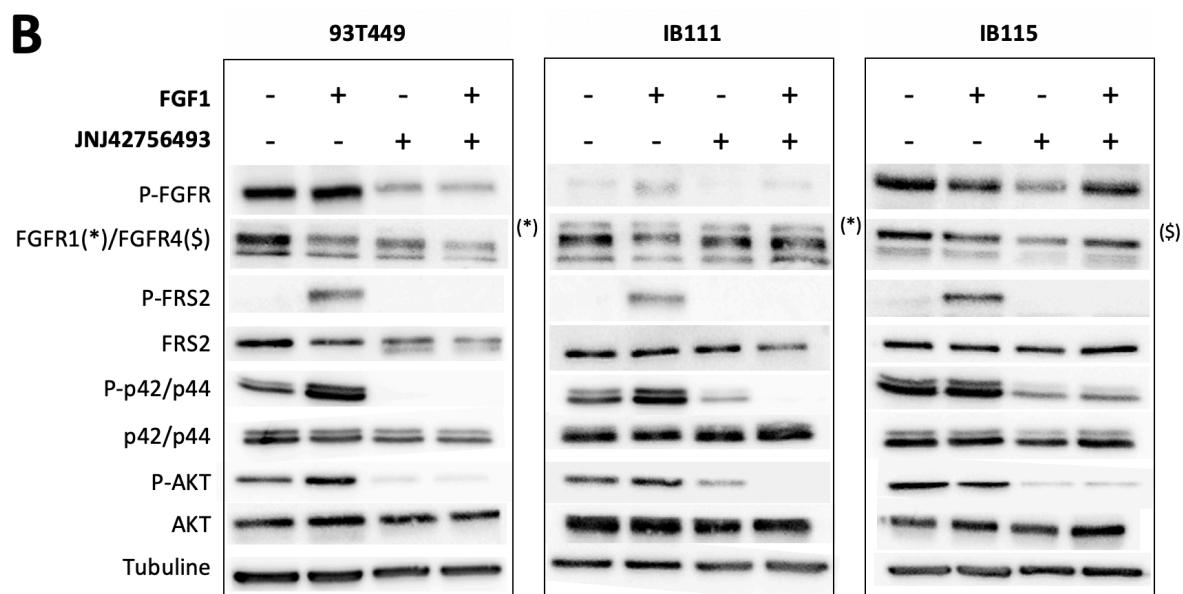
### Sur la viabilité cellulaire

Par technique de MTT, nous avons observé des profils de sensibilité variables au JNJ42756493 avec détermination de valeurs d'IC50 de 0,36 $\mu$ M (93T449), 1 $\mu$ M (IB111) et 2 $\mu$ M (IB115).

### Sur la phosphorylation des FGFRs et de FRS2 et sur l'activation des voies de signalisation intracellulaires en aval des FGFRs

Dans les cellules prétraitées par JNJ42756493 (30min), nous avons observé une diminution de la phosphorylation de FGFR et une absence de détection de phosphorylation de FRS2; la phosphorylation de FRS2 étant induite par la stimulation par FGF1 (pendant 15min, sans prétraitement par JNJ42756493). De même, la phosphorylation des MAP Kinases (ERK1/ERK2 ou p42/p44) et d'AKT était significativement réduite (**Figure 25**).

**Figure 25.** Analyse de la voie FGFR/FRS2 après stimulation par FGF1 et/ou inhibition par le JNJ42756493 dans nos trois lignées issues de LBD/LDD.



\*, expression de FGFR1 et \$, expression de FGFR4.

L'analyse de la phosphorylation des MAP Kinases (ERK1/ERK2) et d'AKT au cours d'une cinétique d'exposition au JNJ42756493 aux temps 15min, 4h, 24h et 72h a permis de mettre en évidence qu'à 72h, la voie des MAP Kinases ERK1/2 était à nouveau stimulée pour la lignée IB115. De plus, la diminution de phosphorylation d'AKT n'était pas constante dans nos lignées IB111 et IB115 et absente dans la lignée 93T449.

Cette dernière observation concernant la voie AKT, nous a conduits à étudier les effets d'un inhibiteur de la voie PI3K/AKT avec double cible PI3K et mTOR le BEZ235 sur nos lignées cellulaires, seul ou en association avec le JNJ42756493. Toutefois, devant l'absence de synergie pour nos deux lignées issues de LDD, nous avons testé **une autre combinaison associant l'inhibiteur des FGFRs avec un antagoniste de l'interaction MDM2-p53**, le RG7388.

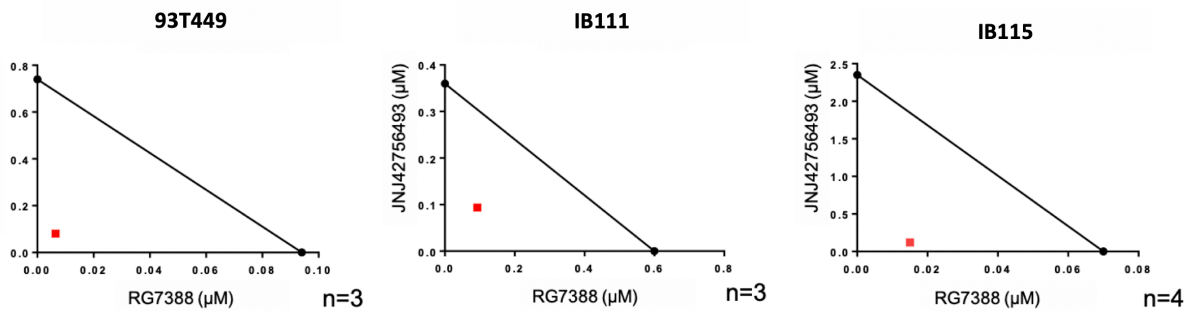
### III. Effets de la combinaison JNJ42756493 + RG7388

#### 1. *In vitro*, sur nos lignées issues de LBD et LDD

##### **Sur la viabilité cellulaire**

Déterminées par MTT, les valeurs d'IC50 du RG7388 étaient les suivantes : 0,04  $\mu$ M (93T449), 0,2  $\mu$ M (IB111) et 0,05  $\mu$ M (IB115). Pour les trois lignées, la combinaison JNJ42756483 + RG7388 exerçait une synergie sur la prolifération cellulaire (valeurs des index de combinaison (CI) < 1, déterminées selon la méthode de Chou et Talalay) : CI=0,18 (93T449), CI=0,40 (IB111) et CI=0,26 (IB115) (**Figure 26**).

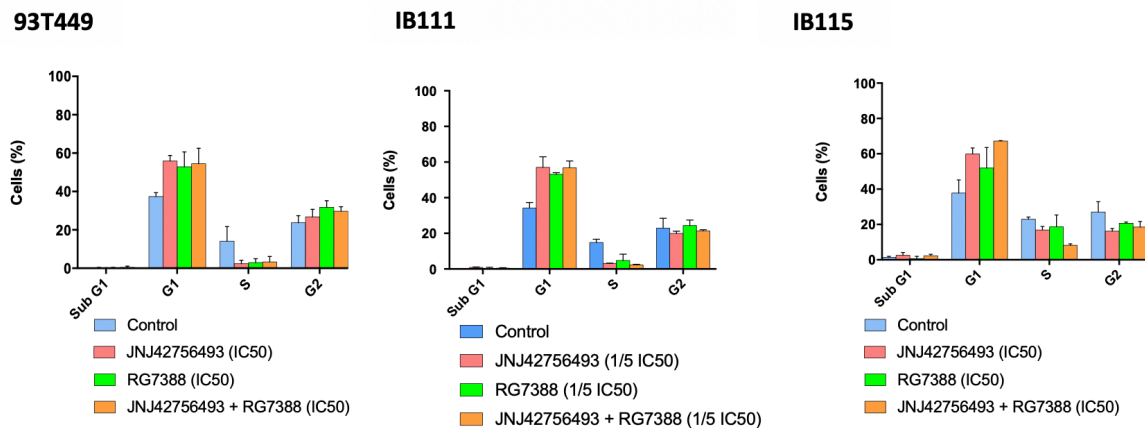
Figure 26. Isobogrammes montrant l'effet synergique de la combinaison JNJ42756483 + RG7388.



### Sur le cycle cellulaire

Le traitement des cellules par JNJ42756483 seul, RG7388 seul ou la combinaison induisait l'arrêt du cycle en phase G1 et la diminution de la proportion de cellules en phase S (**Figure 27**).

Figure 27. Effets sur la distribution des cellules au cours du cycle après 48h de traitement.



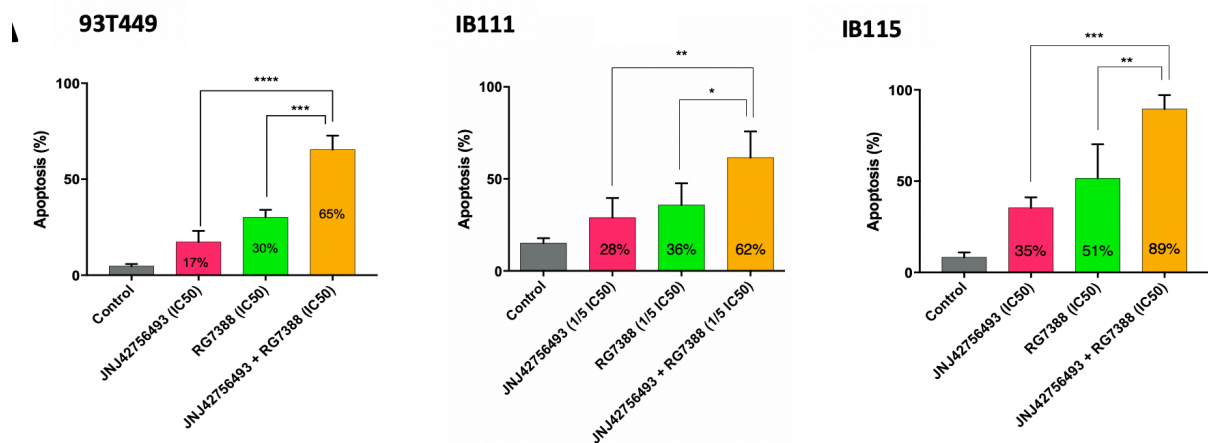
### Sur l'activation des voies de signalisation intracellulaires en aval des FGFRs

Les effets observés avec la combinaison étaient comparables à ceux observés avec le traitement par JNJ42756483 seul.

## Sur l'apoptose

Alors que l'effet du JNJ42756483 seul ou du RG7388 seul induisait l'apoptose de l'ordre de 17-35% et 30-51% respectivement, la combinaison JNJ42756483 + RG7388 entraînait un taux d'apoptose de 62 à 89%. Cette apoptose massive de 89% était observée dans la lignée IB115 (**Figure 28**).

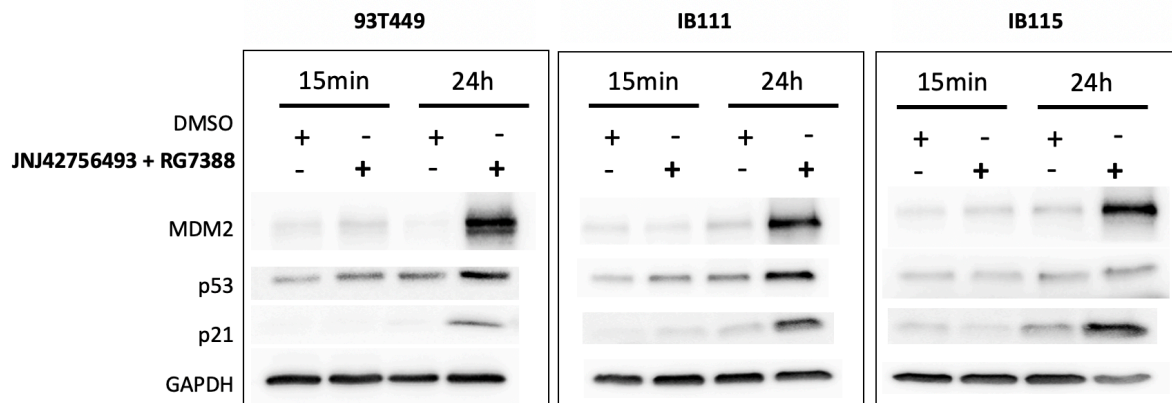
**Figure 28. Effets sur l'induction de l'apoptose après 72h de traitement.**



Quantification du pourcentage de cellules apoptotiques utilisant le marquage à l'annexine V-FITC avec iodeure de propidium et analyse par cytométrie en flux après 72h de traitement. Du fait d'un taux élevé d'apoptose pour la lignée IB111, les concentrations utilisées correspondaient à 1/5 de la valeur de l'IC50.

De plus, après 24h de traitement, nous avons observé une accumulation de la protéine p53 et une surexpression des protéines cibles directes de p53 : p21, MDM2, reflet de l'inhibition de l'interaction MDM2-p53 par le RG7388 (**Figure 29**) (effets comparables avec le traitement par RG7388 seul).

**Figure 29. Effets sur les protéines cibles de p53 après 15min et 24h de traitement.**

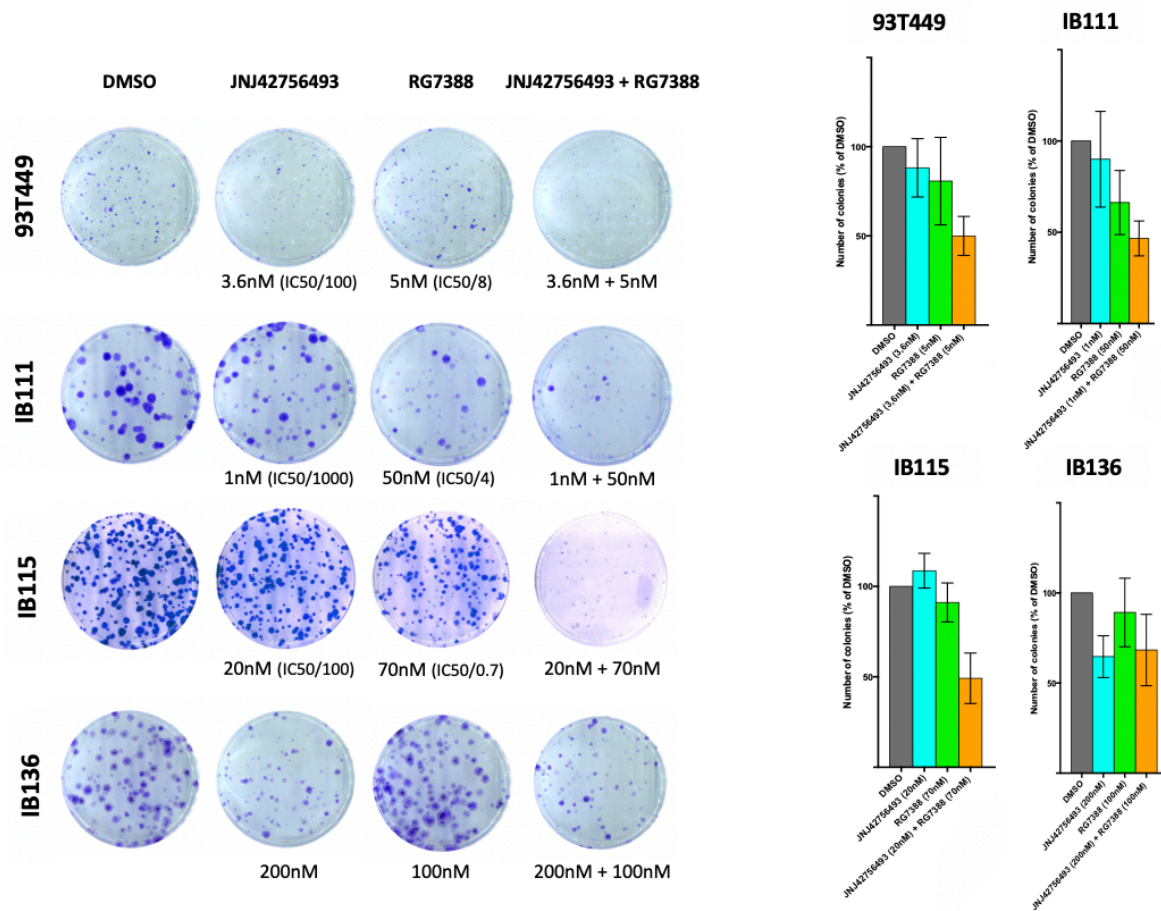


### Sur la survie à long terme

Alors que l'utilisation de concentrations de JNJ42756483 seul à la valeur de chaque IC50 entraînait une inhibition complète de la formation de colonies, l'utilisation de concentrations beaucoup plus faibles de JNJ42756483 (IC50/100 voire IC50/1000) en combinaison avec le RG7388, inhibait significativement la formation de colonies (**Figure 30**).



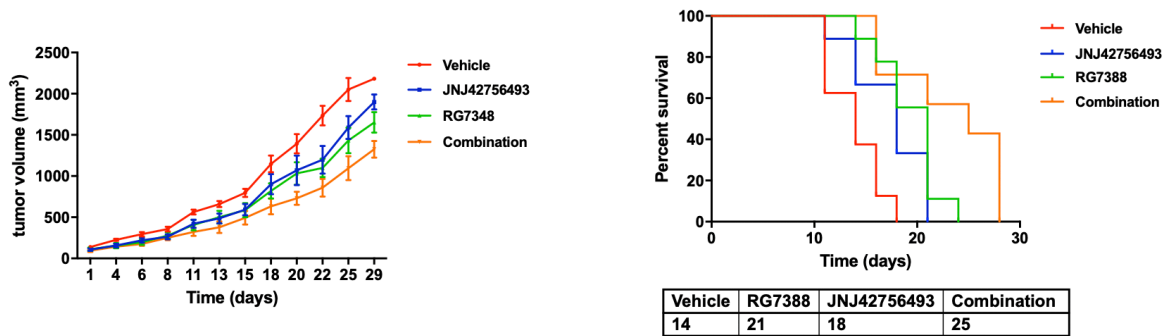
Figure 30. Effets sur la survie à long terme après 21 jours de traitement.



## 2. *In vivo*

Afin de valider nos résultats *in vitro*, nous avons réalisé une étude *in vivo* par xélogreffes chez des souris avec injection de la lignée IB115 et répartition en 4 groupes : contrôle, traitement par JNJ42756493, traitement par RG7388 et traitement par la combinaison JNJ42756493 + RG7388. La combinaison JNJ42756493 + RG7388 entraînait une réduction de la croissance tumorale ainsi qu'une meilleure survie comparée aux souris traitées par JNJ42756493 seul ou RG7388 seul (**Figure 31**).

Figure 31. Effets *in vivo*, sur la croissance tumorale et la survie des souris.

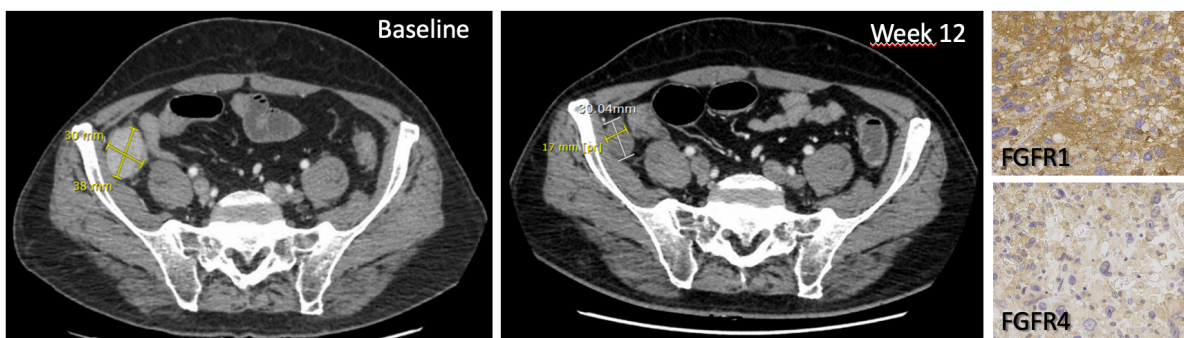


La première courbe représente la croissance tumorale et la seconde, la survie (courbes de Kaplan-Meier).

#### IV. Effets du traitement anti-FGFR, JNJ42756493 (erdafitinib) chez un patient atteint de LDD métastatique, réfractaire

Dans le cadre d'un essai de phase I à l'Institut Bergonié, un patient traité par erdafitinib pour un LDD métastatique a vu sa maladie se stabiliser avec une réduction du volume tumoral de l'ordre de 20% pendant 12 semaines (selon les critères RECIST). En accord avec nos hypothèses, l'analyse IHC de sa tumeur montrait une co-expression de FGFR1+FGFR4 (Figure 32).

Figure 32. Effets du JNJ42756493 (erdafitinib) chez un patient.



**Novel therapeutic insights in dedifferentiated liposarcoma:  
a role for FGFR and MDM2 dual targeting**

**Béregère Dadone-Montaudié<sup>1,2,3</sup>, Audrey Laroche-Clary<sup>4</sup>, Aline Mongis<sup>1</sup>, Emmanuel Chamorey<sup>5</sup>, Ilaria Di Mauro<sup>1,2</sup>, Vanessa Chaire<sup>4</sup>, Pascal Finetti<sup>6</sup>, Renaud Schiappa<sup>5</sup>, François Le Loarer<sup>4,7</sup>, Isabelle Birtwisle-Peyrottes<sup>8</sup>, Jean-François Michiels<sup>3</sup>, François Bertucci<sup>6</sup>, Florence Pedoutour<sup>1,2</sup>, Antoine Italiano<sup>4,9,10</sup>, Laurence Bianchini<sup>1</sup>.**

**Affiliations**

<sup>1</sup> Université Côte d'Azur, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR7284, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1081, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice (IRCAN), Nice, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France

<sup>3</sup> Laboratoire Central d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France

<sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM) U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>5</sup> Unité de Biostatistiques, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

<sup>6</sup> Laboratoire d'Oncologie Prédictive, centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM U1068, CNRS UMR7258, Institut Paoli-Calmettes, Université d'Aix-Marseille, France

<sup>7</sup> Département de Biopathologie, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>8</sup> Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

<sup>9</sup> Département d'Oncologie Médicale, Institut Bergonié, Bordeaux, France

<sup>10</sup> Université de Bordeaux, Faculté de Médecine, Bordeaux, France

**Running Title:** FGFR signaling pathway in liposarcoma

**Keywords:** (5) liposarcoma, FGFR, MDM2, JNJ42756493, RG7388

**Financial support :** Institut National du Cancer (INCa) and Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS) Programme de Recherche en Cancérologie 2016 PRTK-FILIPO ; Alan B. SLIFKA Foundation ; Association Infosarcomes ; Groupement des Entreprises Monégasques dans la Lutte contre le Cancer (Gemluc) ; Fondation ARC pour la recherche sur le cancer.

**Corresponding author:** Laurence Bianchini, PhD, IRCAN, Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides, Faculté de Médecine de Nice, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 2, France

Email address: laurence.bianchini@univ-cotedazur.fr

Phone number: +33493377009

Fax number: +33492037529

**Disclosure of potential conflicts of interest:** The authors declare no potential conflicts of interest

**Word count:** 5328

**Total number of figures and tables:** 5 figures and one table. Supplementary data: 3 figures and 4 tables.

## Statement of translational relevance

Well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas (WD/DDLPS) are the most frequent soft tissue sarcomas. Despite the hopes raised by some targeted therapies, effective well-tolerated treatments for DDLPS are still lacking. Small-molecule FGFR inhibitors are currently evaluated in advanced clinical trials including the potent pan-FGFR FDA-approved inhibitor erdafitinib. We provide the first analysis of FGFR1-4 expression and their prognostic value in a series of 694 clinical WD/DDLPS samples. We identified FGFR1 and FGFR4 as prognostic biomarkers. We demonstrated activity of erdafitinib and showed that erdafitinib combination with the MDM2 antagonist idasanutlin is highly synergistic *in vitro* and *in vivo*. The clinical relevance of our findings was supported by our data on a patient with DDLPS refractory to multiple lines of treatment whose tumor was stabilized for 12 weeks on erdafitinib. These findings provide a rationale to use FGFR expression as a biomarker to select patients for clinical trials investigating FGFR inhibitors and test combined erdafitinib and idasanutlin.

## Abstract

**Purpose:** Liposarcoma is the most common soft tissue sarcoma in adults. Effective treatments for metastatic dedifferentiated liposarcoma (DDLPS) patients are lacking. We aimed to evaluate the therapeutic potential of the pan-FGFR inhibitor erdafitinib for these patients.

**Experimental Design:** FGFRs expression and their prognostic value were assessed in a series of 694 samples of well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma (WDLPS/DDLPS). The effect of erdafitinib -alone or in combination with other antagonists- on tumorigenicity was evaluated *in vitro* and *in vivo*.

**Results:** We detected overexpression of FGFR1 and/or FGFR4 in a subset of WDLPS/DDLPS and demonstrated correlation of this expression with poor prognosis. Erdafitinib treatment induced a decrease in cell viability, cell cycle arrest in G1, apoptosis and strong inhibition of the ERK1/2 pathway. The association of erdafitinib with the PI3K/mTOR antagonist BEZ235 was not synergistic. Combining erdafitinib with the MDM2 antagonist RG7388 exerted a synergistic effect on viability, apoptosis and clonogenicity in three WDLPS/DDLPS cell lines. Efficacy of this combination was confirmed *in vivo* on DDLPS xenograft. Importantly, we report the efficacy of erdafitinib in one patient with metastatic DDLPS refractory to four prior lines of treatment showing disease stabilization for 12 weeks.

**Conclusions:** We provide evidence that the FGFR pathway has therapeutic potential for a subset of DDLPS and that FGFR1 and FGFR4 expression might constitute a powerful biomarker to select patients for FGFR inhibitor clinical trials. In addition, we show that combining erdafitinib with RG7388 is a promising strategy for patients with DDLPS that deserves further investigation in the clinical setting.

## Introduction

Sarcomas are rare solid tumors of mesenchymal origin. They constitute a heterogeneous and complex group of approximately 70 pathological subtypes. Among them, liposarcomas (LPS), derived from a lipogenic origin, are divided in four subtypes, according to the World Health Organization (WHO) Classification: atypical lipomatous tumor (ALT)/well-differentiated LPS (WDLPS), dedifferentiated LPS (DDLPS), myxoid LPS, and pleomorphic LPS. While ALT/WDLPS are locally aggressive but virtually never metastasize, DDLPS have a metastatic potential and a poor prognosis (1,2). Even though “LPS” subtype has been identified as a favorable prognostic factor in advanced soft tissue sarcomas (3), and if new cytotoxic agents have been developed such as trabectedin (4) and eribulin (5), the currently available chemotherapy regimens remain poorly efficient in advanced WDLPS/DDLPS (6).

With respect to targeted therapies, the pazopanib anti-angiogenic drug represents the only targeted therapy currently approved in soft tissue sarcomas, but is not indicated in liposarcoma because of unproven efficiency in the PALETTE trial (7). Both WDLPS and DDLPS are characterized by the amplification of a discontinuous region on the long arm of the chromosome 12 (1,2). This 12q13~15 amplicon encompasses several oncogenes including *MDM2*, *CDK4*, *HMGA2* (1,2,8-10), thus retained as potential therapeutic targets. The discovery of the *MDM2* amplification in 100% of WDLPS/DDLPS cases (9) led to the development of targeted therapies able to restore the pro-apoptotic effect of p53, by inhibiting the MDM2-P53 binding (11,12) including the nutlins. *CDK4* amplification led to the testing of CDK4 Inhibitors, palbociclib and abemaciclib, in WDLPS/DDLPS (13,14). Tumor responses were observed in these early-phase trials and the development of these drugs is ongoing.

Another gene almost always amplified in WDLPS/DDLPS is *Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2 (FRS2)*, located close to *MDM2* (at approximately 600kb) (9,15,16). *FRS2* plays a key role in the Fibroblast Growth Factor (FGF)/Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) signalling pathway, acting as an adaptor protein to activate the RAS/RAF/MAPK and the PI3K/AKT signalling cascades, leading to cell proliferation, migration and survival (17). Aberrant activation of this tyrosine kinase receptor, consecutively to a FGFR alteration (i.e. amplification, mutation, or fusion) or an overexpression of FGF ligands, has been demonstrated in several types of cancers, such as bladder, breast, or lung carcinoma (18). Despite the observation of the recurrent *FRS2* amplification, very few data are available about the FGFR expression (19-21) and the FGFR pathway deregulation in WDLPS/DDLPS (16,22,23). Frequent constitutive FGFR activation made FGFRs attractive targets for anti-cancer therapies. Several FGFR inhibitors are currently under clinical evaluation (8). Notably, Erdafitinib (JNJ42756493), a potent and very selective pan-FGFR tyrosine kinase inhibitor (24), has

been approved for patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma, with susceptible *FGFR3* or *FGFR2* genetic alterations, that has progressed during or following platinum-containing chemotherapy (25).

The main objective of our study was to determine the effect of the inhibition of the FGFR pathway in the treatment of WDLPS/DDLPS. We first analyzed the FGFRs expression and their prognostic value in a series of 694 clinical samples of WDLPS/DDLPS and in a panel of well-characterized WDLPS and DDLPS cell lines. Because monotherapies often lack sustained efficiency and lead to the emergence of secondary drug resistance, we further explored the potential synergy of two different combinations: first, between Erdafitinib and the PI3K/mTOR antagonist BEZ235; second between Erdafitinib and the Idasanutlin (RG7388), a potent and selective antagonist of the p53-MDM2 binding (26).

## **Materials and Methods**

### ***Patients population***

Two retrospective series of clinical tumor samples (694 samples) from patients with WDLPS/DDLPS were studied for FGFRs expression. The first series, analyzed at the protein level, included 418 WDLPS/DDLPS cases from 358 patients enrolled in the FILIPO (NCT03303885) multicentric study that involved three French sites (Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice; Institut Bergonié, Bordeaux, and Centre Antoine Lacassagne, Nice), including 106 patients with WDLPS and 252 patients with DDLPS. All cases were diagnosed by pathologist experts in soft tissue and confirmed by detection of *MDM2* amplification, according to the WHO Classification of Soft Tissue and Bone Tumours (1)(2). Clinical, pathological and follow-up data, were available for all patients. All patients gave their written non-opposition consent. The second series, analyzed at the mRNA level, was used as an independent validation set. It included WDLPS/DDLPS cases from 276 patients and 11 normal fat samples. It corresponds to a sample subset included in a pooled series of 1,432 primary soft tissue sarcomas that we had previously gathered from 16 public data sets (27). All samples had been profiled using DNA microarrays or RNA Sequencing. Inclusion criteria of the 276 samples were WDLPS/DDLPS pathological subtype and availability of *FGFR1* and *FGFR4* expression data. Before analysis, data were normalized as previously described (27).

### ***Analysis of FGFRs protein expression in clinical samples***

All 418 cases of the first series were analysed by immunohistochemistry (IHC) for expression of FGFRs, using the following monoclonal antibodies: FGFR1 (clone D8E4, 1/50, #9740, Cell Signaling Technology), FGFR2 (ab58201, 1/100, Abcam), FGFR3 (clone B-9, sc-13121, 1/100, Santa Cruz Biotechnology), and FGFR4 (clone A-10, sc-136988, 1/50, Santa Cruz Biotechnology), using the Dako Autostainer (Agilent Technologies), according to the manufacturer's recommendations. For 282 cases from Institut Bergonié, included in the Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes (RRePS) database (28), a tissue micro-array (TMA) containing three representative spots for each case was constructed from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE). For each one of the remaining cases, a representative whole-tissue section was analyzed from FFPE tissue.

Cytoplasmic or membranous staining was scored by two pathologists (BDM-JFM) according to the staining intensity (0: absence of staining; 1: weak staining; 2: moderate staining; and 3: strong staining) and the percentage of tumor cells harboring this staining intensity. The score of immunostaining for each FGFR ranged from 0 to 300, as a result of multiplying the percentage of positive tumor cells by the staining intensity. Overexpression was defined according to statistical analyses (see below) as tumors with a score superior or equal to 50 for FGFR1 (score  $\geq 50$ ) and a score superior or equal to 5 for FGFR4 (score  $\geq 5$ ).

### ***Cell lines and culture conditions***

All cell lines were established in our laboratories (Solid Tumor Genetics Laboratory of Nice University Hospital, Nice, France and Institut Bergonié, Bordeaux, France) from a primary retroperitoneal WDLPS (93T449), a primary periscapular DDLPS (IB111), a primary paratesticular DDLPS (IB115), and a soft-tissue leiomyosarcoma (LMS) (IB136)(29). All cell lines were genomically characterized by array-CGH and tested for mycoplasma. The cells were cultured in RPMI-1640 medium containing GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich) and grown at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>.

### ***Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis***

RNA was isolated from cells using Trizol (Invitrogen). The quantification and quality of the isolated RNA were evaluated using respectively a Nanodrop 2000 (ThermoFisher) and the 2100 Bioanalyzer (RNA 6000 Nano kit) (Agilent Technologies). RNA samples were treated by DNA-free (Applied



Biosystems). For each sample, one microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). The following TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) were used MDM2: Hs01066938\_m1; FGFR1: Hs00241111\_m1; FGFR2: Hs01552918\_m1; FGFR3: Hs00179829\_m1; FGFR4: Hs00242558\_m1; FRS2: Hs00183614\_m1; RPLP0: Hs99999902\_m1. RPLP0 was used as endogenous control for normalization. Short-term culture of dermolipectomy cells was used as the reference sample. The comparative threshold cycle (Ct) method was used to achieve relative quantification of gene expression. Each qRT-PCR experiment was performed three times in duplicate with the ABI PRISM 7500 detection System using FAM dyes (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations.

### ***Drugs***

The pan-FGFR inhibitor JNJ42756493 (erdafitinib) was supplied by Janssen Pharmaceuticals, the MDM2-TP53 interaction inhibitor RG7388 (idasanutlin) was supplied by Roche, and the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 (dactolisib) was purchased from Selleckchem.

### ***Drug synergy assays***

The drug synergy assays were performed as previously described, using the isobologram and combination index (CI) methods, derived from the Chou and Talalay principle (30). The combination effect of the two treatments was defined as follows:  $CI < 1$ , synergistic effect,  $CI = 1$ , additive effect, and  $CI > 1$ , antagonistic effect.

### ***Cell viability, cell apoptosis and cell cycle assays***

All cell viability, cell apoptosis and cell cycle assays were performed as previously described (30,31).

### ***Clonogenic cell survival assay***

Cells were seeded at very low density (330 cells per 10 cm-plate). The colonies were allowed to grow for 21 days in growth complete medium with specific drugs. After fixation in formaldehyde and staining with crystal violet (Sigma-Aldrich), the plates were scanned and the number of cell colonies was counted using FIJI (FIJI is just ImageJ) software.

### ***Western blotting***

Cells were treated for 45 min with either JNJ42756493 or control-treated with the corresponding concentration of JNJ42756493 diluent DMSO and for the last 15 min with or without 10 ng/ml of recombinant FGF1 (PeproTech, #100-17A). Treated and control cells were then washed with PBS and were extracted using a 1.5 X Laemmli lysis buffer. Whole cell proteins (30µg) were electrophoresed on 8-10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Immobilon, Millipore). Membranes were blocked with 5% BSA7030 (Sigma-Aldrich), for phosphorylated-FGFR and phosphorylated FRS2 or low-fat milk, then incubated overnight at 4°C with the following antibodies: anti-phospho-ERK (Thr202/Tyr204, #4370), anti-ERK (137F5, #4695), anti-phospho-AKT (Ser473, #4060), anti-AKT (11E7, #4685), anti-FGFR1 (D8E4, #9740), anti-FGFR4 (D3B12, #8562), and anti-phosphoFRS2 $\alpha$  (Tyr436, #3861) from Cell Signaling Technologies, anti-phospho-FGFR (Tyr653/Tyr654, PA5-64626, ThermoFisher), anti-FRS2 (ab183492, Abcam), anti-MDM2 (Ab1-IF2, OP46, Calbiochem), anti-P53 (DO-1, sc-126, Santa Cruz Biotechnology), anti-P21WAF1 (Ab-1, EA-10, Millipore), anti- $\beta$ tubuline (66240-1-Ig, ProteinTech), and anti-GAPDH (60004-1-Ig, ProteinTech).

Quantification of the WB was performed using ImageJ software. Images are representative of the results obtained in three separate experiments.

### ***Animal studies***

Four- to five-week-old female Ragy2C<sup>-/-</sup> mice were used. Induction of tumor xenografts was performed by subcutaneous injection of 0.2 ml cell suspensions containing  $5 \times 10^6$  live IB115 cells into the right flank of the mice. This study followed the Spanish and European Union guidelines for animal experimentation (RD 1201/05, RD 53/2013 and 86/609/CEE, respectively). Mice were randomized into control and treatment groups (n = 9 for vehicle, n = 10 for JNJ42756493, RG7388 groups and for combination group) two weeks after the tumor became measurable (15 days after injection: day 1 of treatment). Mice were randomized in 4 groups: vehicle (RG7388 diluent), RG7388 alone (12.5 mg/kg oral gavage five times per week), JNJ42756493 alone (40mg/kg oral gavage five times per week), and both drugs (RG7388 at 12,5mg/kg and JNJ42756493 at 40mg/kg, five times per week). RG7388 and JNJ42756493 were administered using RG7388 diluent (Klucel2%, Tween 80 0.1%, Methylparaben 0.09%, propylparaben 0.01%) and 2-hydroxypropyl beta-cyclodextrin 10% as the vehicle respectively. The tumors were measured every 2-3 days with a caliper, and diameters were recorded. Tumor volumes were calculated using the formula:  $a^2b/2$ , where a and b are the 2 largest diameters. The mice were sacrificed by cervical dislocation when tumors reached 2000mm<sup>3</sup>. Survival curves were established

based on the time between the beginning of treatment and sacrifice of mice. All experimental manipulations with mice were performed under sterile conditions in a laminar flow hood.

### ***Statistical analysis***

Data are represented as the mean +/- standard deviation (SD) from at least three experiments. Differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) or Student t-tests. Significant differences are indicated as \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ . Analysis of progression-free survival in animal studies was made using a log-rank test (Mantel-Cox test). All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 7.0 statistical software.

For the biostatistical analysis of expression data, qualitative data were described by using absolute and relative frequencies, quantitative data were described by using mean, standard deviation or median and range as appropriate. The continuous values were compared between groups using the Student t-test. Overall survival was defined as the time from primitive sarcoma diagnosis to death. Disease-free survival was defined as the time from sarcoma diagnosis to either local or metastatic recurrence. Patients showing no event (death or progression) or lost to follow-up were censored at the date of their last contact. Statistical comparisons were performed using Cox regression model for survival data. All significant variables in univariate analysis were included in the multivariate models. By definition, grading (according to the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) criteria) is correlated with subtypes, so only subtypes are included in the multivariate analysis. Statistical analyses were two-sided and were performed using R-3.5.1 for Windows. Cut-off for FGFR expression versus survival data were evaluated by using R function “cutp” for survival data model from the R package “survMisc” (<http://127.0.0.1:12810/library/survMisc/html/cutp.html>). The “cutp” function was bootstrapped (n=1000) and the optimal cut-off corresponded to the median value calculated from these 1000 calculations. When multiple samples were analyzed for one patient, only the first event was considered for statistical analyses (primitive event vs recurrence or metastasis).

## **Results**

### ***Expression of FGFRs in WDLPS/DDLPS patients and prognostic impact***

First, we assessed FGFR1-4 protein expression in a series of 418 cases from 358 patients with WDLPS/DDLPS (for 47 patients, at least 2 samples were analyzed) including a majority of DDLPS cases (70% versus 30% of WDLPS cases). Patient clinicopathological characteristics are summarized in Supplementary Table S1. The median follow-up was 78.1 months (95%CI [65.3-94.6]). IHC analysis

showed that none of the tumors expressed FGFR2 or FGFR3. Overexpression of FGFR1 was detected in 27% of the WD/DDLPS cases, overexpression of FGFR4 in 27% of the cases, and co-overexpression of FGFR1 and FGFR4 in 11% of the cases (**Table 1**). Representative examples of highly positive staining for FGFR1 and FGFR4 are shown in **Fig. 1A** and **B**. For both FGFR1 and FGFR4 overexpression was markedly more frequent in DDLPS than in WDLPS (34% of DDLPS vs 11% of WDLPS for FGFR1; 32% of DDLPS vs 14% of WDLPS for FGFR4). In these overexpressing cases, the median score was 100 for FGFR1 and 30 for FGFR4 (**Fig. 1C**). We then assessed the prognostic value of FGFR1 and/or FGFR4 overexpression in this cohort of 358 patients. FGFR1 and/or FGFR4 overexpression was associated with shorter disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). Regarding DFS, univariate analysis (Supplementary Table S2) showed a higher risk of recurrence for WD/DDLPS patients with FGFR1 overexpression (Hazard ratio, HR=1.4, 95%CI [1.0-2.0], p=0.03; **Fig. 1D**), FGFR4 overexpression (HR=2.2, 95%CI [1.6-3.1], p<0.0001; **Fig. 1D**), and FGFR1+FGFR4 co-overexpression (HR=2.9, 95%CI [1.8-4.9], p<0.0001; **Fig. 1F**). Pathological subtype and FNCLCC grading were also associated with prognosis. Multivariate analysis confirmed that FGFR4 overexpression (HR=1.9, 95%CI [1.4-2.7], p=0.00015) and FGFR1+FGFR4 co-overexpression (HR=2.1, 95%CI [1.3-3.4], p=0.0025) were independent adverse prognostic factors (Supplementary Table S2). Similar results were observed for OS. Cox univariate analysis (Supplementary Table S2) showed a higher risk of death for WD/DDLPS patients with FGFR1 overexpression with a HR equal to 2.1 (95%CI [1.5-3.0], p<0.0001; **Fig. 1E**), and for patients with FGFR4 overexpression (HR=2.3, 95%CI [1.6-3.4], p<0.0001; **Fig. 1E**). The death risk was even higher when FGFR1+FGFR4 were co-overexpressed (HR=4.7, 95%CI [2.6-8.4], p<0.0001; **Fig. 1G**). Non-complete resection (*i.e.* R1 or R2 resection), pathological subtype and location were also associated with poor prognosis. Cox multivariate analysis revealed that FGFR1 overexpression (HR=1.9, 95%CI [1.2-3.0], p=0.008), FGFR4 overexpression (HR=2.0, 95%CI [1.2-3.1], p=0.006) and FGFR1 + FGFR4 co-overexpression (HR=4.0, 95%CI [2.1-7.8], p<0.0001) remained independent adverse prognostic factors for OS (Supplementary Table S2).

In order to validate these results in an independent series of patients, we examined *FGFR1* and *FGFR4* mRNA expression in our pooled data set of 276 WDLPS/DDLPS samples and 11 normal fat samples (27). Their clinicopathological characteristics are summarized in Supplementary Table S3. The proportions of each LPS subtype were close to those of the “IHC” series with a majority of DDLPS (79% vs. 21%). Expression was heterogeneous across samples. Similar to protein expression, mRNA expression of *FGFR1* was higher than that of *FGFR4* in both WDLPS and DDLPS (Supplementary Fig. S1A). As observed at the protein level, a subset of LPS samples overexpressed *FGFR1* and *FGFR4*: 62

out of 276 LPS (22%) showed *FGFR1* overexpression, 51 out of 276 (18%) showed *FGFR4* overexpression, and 25 out of 276 (9%) showed *FGFR1+FGFR4* co-overexpression. In univariate analysis for DFS, *FGFR1* and/or *FGFR4* overexpression were also associated with shorter DFS (Supplementary Fig. S1B-D). The HR for DFS event in WD/DDLPS patients with overexpression when compared to patients without overexpression was 2.4 (95%CI [1.4-3.9]) for *FGFR1* (p=0.00069), 1.9 (95%CI [1.1-3.3]) for *FGFR4* (p=0.029), and 2.6 (95%CI [1.4-4.9]) for the *FGFR1+FGFR4* co-overexpression (p=0.0028), thus confirming the results observed at the protein level. In contrast, we found no correlation between expression of *FGFR2*, *FGFR3* or *FRS2* and prognosis (Supplementary Fig. S1E-G).

#### *Involvement of the FGF/FGFR signaling pathway in liposarcoma tumorigenesis*

We then investigated the sensitivity of WD/DDLPS cells to the pan-FGFR inhibitor JNJ42756493. We used a panel of in-house well-characterized and validated WDLPS (93T449) and DDLPS (IB111 and IB115) cell lines as well as a soft tissue LMS cell line (IB136) used as a non-adipose sarcoma control. First, we assessed FGFR1-4 expression both at the mRNA and protein levels using respectively qRT-PCR and immunoblotting. Expression of FGFR2 and FGFR3 was low both at the mRNA and protein levels in WD/DDLPS cells (Supplementary Fig. S2A). In contrast, *FGFR1* mRNA was the most abundantly expressed FGFR in WD/DDLPS cells at comparable levels to those detected in normal fat cells (Supplementary Fig. S2A). *FGFR4* expression was only detected in IB115 cells (Supplementary Fig. S2A). We found a consistent correlation between protein and mRNA expression for FGFR1 and FGFR4 (**Fig. 2A**) demonstrating that WD/DDLPS cells exhibit the same pattern of FGFR expression as primary WD/DDLPS tumors, namely predominant expression of FGFR1 and/or FGFR4.

Consistent with previous reports (15,16), we detected higher levels of *FRS2* mRNA in WD/DDLPS cells than in normal adipose tissue and in the IB136 LMS cells (Supplementary Fig. S2A) especially in the 93T449 cell line. However, mRNA did not appear to translate efficiently in protein since the level of FRS2 protein in WD/DDLPS cells was not higher than in the IB136 cells (**Fig. 2A**). In contrast, phosphorylated FRS2 as well as phosphorylated FGFR were detectable in WD/DDLPS cells, but not in LMS cells indicating constitutive activation of the FGFR pathway in LPS cells (**Fig. 2A**). Phosphorylated FRS2 was not always detected in IB115 unstimulated cells probably because it was at the limit of the detection with the antibody we used, as previously reported in other DDLPS cell lines (22).

We then studied the effects of JNJ42756493 on cell proliferation. Using an MTT assay, we first demonstrated that the three WD/DDLPS cell lines of our panel were sensitive to this inhibitor with IC50 values ranging from 0.36 to 1-2  $\mu$ M (Supplementary Table S4 and Fig. S2B). We further investigated the effect of the FGFR inhibitor on the different components of the FGFR signaling pathway from FGFR to the downstream kinases p42/p44 MAPK and AKT both in unstimulated cells and in FGF1-treated cells. In unstimulated cells, we detected phosphorylation of all the analyzed proteins of the FGFR pathway (**Fig. 2B**), confirming constitutive activation of the FGFR pathway in WD/DDLPS cells. FGF1 treatment greatly increased FRS2 phosphorylation as well as p42/p44 MAPK and AKT phosphorylation. Pretreatment with JNJ42756493 completely abolished FGF1-induced FRS2 phosphorylation and significantly reduced p42/p44 MAPK and AKT phosphorylation (**Fig. 2B**). We further examined the effects of JNJ42756493 on activation of p42/p44 MAPK and AKT by exposing the cells to JNJ42756493 from 15 min to 72 h. As shown in **Fig. 2C** and **D**, JNJ42756493 treatment for 15 min to 24 hours significantly decreased p42/p44 MAPK phosphorylation, whereas the effect on AKT phosphorylation was much less pronounced and consistent. When cells were exposed to JNJ42756493 for 72 hours, we observed a rebound for p42/p44 MAPK phosphorylation in IB115 cells suggesting that feedback mechanisms might reactivate this pathway. As we did not observe a consistent inhibition of AKT phosphorylation upon JNJ42756493 treatment and because the involvement of the PI3K/AKT pathway in WD/DDLPS tumorigenesis has been reported (32), we tested a specific dual inhibitor of the PI3K/AKT/mTOR pathway BEZ235. As expected, BEZ235 strongly inhibited AKT phosphorylation in the WD/DDLPS cell lines (Supplementary Fig. S3A and B). The effect of the JNJ42756493 and BEZ235 combination was then tested on viability, apoptosis and cell cycle in the three WD-DDLPS cell lines (Supplementary Fig. S3C-E). Drug synergy assays and the synergy analysis were performed as previously described (30) using the isobologram and combination index (CI) methods derived from the median-effect principle of Chou and Talalay (33). Synergy between the two drugs was not observed for the DDLPS cell lines (CI values superior to 1) and this lack of synergy was confirmed when the combination of JNJ42756493 and BEZ235 was tested on apoptosis induction and cell cycle distribution (Supplementary Fig. S3D and -E). This led us to investigate the potential synergy of another combination.

#### *Dual targeting of FGFR and MDM2 in WD/DDLPS cell lines*

MDM2 amplification and overexpression is a hallmark of WD/DDLPS (as observed in the cell lines of our panel (**Fig. 3A**)). Recently we reported that the nutlin analog RG7388 -a potent and selective inhibitor of the TP53-MDM2 interaction- exerted anti-tumour effects in DDLPS cells (30). We therefore

investigated whether targeting both FGFR and the MDM2-TP53 interaction had a synergistic effect in WD/DDLPS. We determined the sensitivity of the three WD/DDLPS cell lines to RG7388 and determined IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range from 40 to 200 nM (Supplementary Table S4). We then tested the potential synergism of the combination JNJ42756493 + RG7388 by determining the CI values (33). As shown in the isobologram representation (**Fig. 3B**), each of the WD-DDLPS cell lines exhibited CI values inferior to 1: 0.18 (93T449), 0.40 (IB111) and 0.26 (IB115) indicating synergism for both WD and DDLPS cells.

We then examined the effect of the JNJ42756493 + RG7388 combination on p42/p44 MAPK and AKT phosphorylation as well as on the expression of TP53, p21 and MDM2. The combined treatment induced an accumulation of the TP53 protein and of its targets p21 and MDM2 (**Fig. 3C**) as previously reported for the effect of RG7388 on DDLPS cells (30). The effects we observed on p42/p44 MAPK and AKT were comparable to those we detected upon JNJ42756493 treatment alone (**Fig 2C and D**), mainly an inhibition of p42/p44 MAPK phosphorylation from 15 min to 24h with a rebound at 72h (**Fig. 3C and D**).

We further analyzed the effect of the JNJ42756493 + RG7388 combination on apoptosis using an annexin V assay. Consistent with the isobologram experiments, we demonstrated a strong synergistic effect of the drug combination on apoptosis induction in all WD/DDLPS cell lines (**Fig. 4A**). Whereas each drug alone induced apoptosis in 17 to 35% and 30% to 51% of the cells for JNJ42756493 and RG7388 as single drugs respectively, drug combination induced apoptosis in most liposarcoma cells from 62% to massive apoptosis in IB115 cells (89% apoptotic cells).

We also investigated the effects of JNJ42756493 and RG7388 on cell cycle distribution. As shown in **Fig. 4B**, treatment of WD/DDLPS cells with JNJ42756493 or/and RG7388 for 48 h led to cell cycle arrest in G1 phase and a decrease in the proportion of cells in S phase.

To conclude our *in vitro* studies, we examined the effects of JNJ42756493 and RG7388 on long-term survival using a clonogenic assay. Interestingly, JNJ42756493, when used at the IC<sub>50</sub> values concentrations, completely inhibited colony formation in all WD-DDLPS cell lines (data not shown). Our aim was to demonstrate that, in combination with RG7388, JNJ42756493 at very low concentrations could significantly inhibit colony formation in WD/DDLPS cells. We chose to use low drug concentrations which produced only marginal effects when used as single agents: RG7388 from 5 to 70 nM and JNJ42756493 from 1 to 20 nM (**Fig. 4C and D**). Indeed, when combined with RG7388 (5-70 nM), JNJ42756493 used at concentrations 100 times (for 93T449 and IB115) and even 1000 times (for IB111) lower than its IC<sub>50</sub> values, was capable of inhibiting colony formation by 50%. Importantly, when the LMS IB136 cells were treated with the JNJ42756493 and RG7388 combination using even

higher concentrations than those used for the WD/DDLPS cells, no synergy was observed (**Fig. 4C and D**) indicating that the synergistic effect between JNJ42756493 and RG7388 was specific to the WD/DDLPS histological subtype.

#### *Dual targeting of FGFR and MDM2 in vivo*

To further validate the results of our *in vitro* study, we performed xenograft experiments testing the effects of the JNJ42756493 + RG7388 combination on *in vivo* tumor growth. IB115 cells were subcutaneously injected to Ragγ2C<sup>-/-</sup> mice to generate xenograft tumours. The mice were randomized into four groups including control (vehicle), JNJ42756493 (JNJ42756493 alone 40 mg/kg), RG7388 (RG7388 alone 12.5 mg/kg), and a combination of both drugs (JNJ42756493 + RG7388). We observed that the combination JNJ42756493 + RG7388 significantly reduced tumor growth rate (**Fig. 5A**). Moreover, survival was also affected with a median of survival of 25 days for the combination treatment group, 14 days for the control group (p=0.0016), 18 days for the JNJ42756493 group (p=0.0288) and 21 days for the RG7388 group (p=0.0443) (**Fig. 5B**).

#### *FGFR targeting in a patient with refractory DDLPS*

Finally, in order to investigate further the clinical relevance of our findings, we analyzed the case of one patient with advanced DDLPS treated with erdafitinib. This 57-year-old patient with metastatic DDLPS refractory to four prior lines of chemotherapy and targeted therapy (doxorubicin, regorafenib, high-dose ifosfamide, and trabectedin) was referred to the phase I unit of Institut Bergonié. He was enrolled in a phase I study assessing the safety and efficacy of erdafitinib. After 6-week treatment, the CT-scan showed a 20% decrease of the target lesion (RECIST 1.1 stabilization) which persisted after 12 weeks (**Fig. 5 C and D**). At week 18, the patient presented disease progression and was withdrawn from the study. Importantly, analysis of FGFR1 and FGFR4 protein expression of the patient tumor showed co-overexpression of FGFR1 (IHC score 120) and FGFR4 (IHC score 60) (**Fig. 5 E and F**).



## Discussion

Our study is the first to provide an exhaustive analysis of the expression of the four FGFRs and their prognostic value in a very large series of nearly 700 WD/DDLPS cases. Our series includes a majority of DDLPS cases in accordance with the need of efficient targeted therapies for patients with metastatic DDLPS. We have analyzed the expression of the four FGFRs at the protein level using IHC in 418 WD/DDLPS cases. We have shown that a significant percentage of WD/DDLPS overexpress FGFR1 and/or FGFR4 and that this expression was correlated with poor prognosis (**Fig. 1**). Importantly, the results obtained at the protein level were validated at the mRNA level from the analysis of an independent public data set (Supplementary Fig. S1). Our findings therefore suggest that FGFR1 and FGFR4 expression may serve as predictive biomarkers allowing the stratification of patients for inclusion in FGFR inhibitor clinical trials. Several publications have discussed the important issue of *FGFR* amplification value vs mRNA and protein expression as biomarkers to predict efficacy of FGFR inhibitors (34). *FGFR* amplification appears to be a rare event in WD/DDLPS. Asano et al used target sequencing with an OncoPanel including the four FGFRs to analyze a series of 19 WDLPS and 37 DDLPS cases (35). They reported one DDLPS case harboring a mutation in *FGFR1* and 2 DDLPS cases with *FGFR3* amplification. Importantly, the authors did not detect any FGFR3 protein expression by IHC in the cases harboring *FGFR3* amplification (35). In line with these results, arrayCGH analysis performed routinely as part of the diagnostic activity of our Laboratory of tumor genetics on 67 WDLPS and DDLPS samples detected only one DDLPS case showing *FGFR* amplification (*FGFR1*).

FGFR overexpression thus does not appear to result from *FGFR* amplification; the mechanism leading to FGFR1 and/or FGFR4 overexpression in these tumors therefore remains to be identified. Note that FGFR4 overexpression without amplification has been described in other tumor types (34).

A role for FGFRs in tumorigenesis has been described in many different types of tumors including sarcomas (36-39). In WD/DDLPS, available reports on this topic are scarce and have mainly focused on the potential role of *FRS2* in DDLPS tumorigenesis (16,22) on the basis of the nearly systematic amplification of the *FRS2* gene in these tumors (15,40,41). However, a very recent study did not support the potential of *FRS2* amplification as a biomarker in DDLPS since DDLPS cell lines expressing the same levels of *FRS2* did not display the same sensitivity to the FGFR inhibitor LY2874455 (22). Our data confirm the very frequent amplification of *FRS2* (96%) in WD-DDLPS primary tumors (CGH array analysis on 67 WDLPS and DDLPS cases). In our panel of WD/DDLPS cell lines, we have detected mRNA overexpression, but it was not correlated with the protein levels (**Fig. 2A**) in accordance with previous reports (15,16) suggesting post transcriptional regulation of *FRS2*

expression in WD/DDLPS cells. Importantly, we have shown that *FRS2* mRNA expression is not associated with prognosis (Supplementary Fig.S1G) in line with previous report (41).

We detected predominant expression of FGFR1 and FGFR4 in our panel of WDLPS and DDLPS cell lines (as reported by Hanes et al in three other DDLPS cell lines (22)), thereby reflecting FGFR expression pattern in primary tumors. *In vitro* experiments demonstrated a functional role of FGFR signaling in WD/DDLPS cells. We detected FGFR phosphorylation in unstimulated cells indicating constitutive activation of the FGFR pathway (**Fig. 2A**). FRS2 phosphorylation dramatically increased upon addition of a FGFR ligand (FGF1) indicating the FGFR pathway is functional in WD/DDLPS cells (**Fig. 2B**). We tested the activity of JNJ42756493, a potent and selective pan-FGFR inhibitor (24) currently approved for the management of bladder cancer (42). In all three cell lines, exposure to JNJ42756493 induced a decrease in viability, a cell cycle arrest in G1 and apoptosis. We detected high levels of ERK phosphorylation in unstimulated cells (**Fig. 2B**) even in serum-deprived cells (data not shown). JNJ42756493 treatment had a strong inhibitory effect on the ERK1/2 pathway (**Fig. 2C and D**), indicating that the FGFR pathway plays a major role in ERK activation in WD/DDLPS cells. The PI3K/AKT pathway was less affected (**Fig. 2C and D**), confirming previous reports using other FGFR inhibitors (LY2874455 (22) and NVP-BGJ398 in DDLPS cells (16,23)). Importantly, the impact of FGFR signaling on survival appeared much more pronounced than the impact on proliferation. Indeed, JNJ42756493 concentrations required to observe a 50% reduction in the colony formation were in the nM range (10 nM, 200 nM, 36 nM for respectively IB111, IB115 and 93T449 cells; data not shown) vs values in the  $\mu$ M range for MTT proliferation experiments. Strikingly, the relevance of our pre-clinical data is supported by the data we provide on a patient with DDLPS refractory to multiple lines of treatment and whose tumor was stabilized for 12 weeks on JNJ42756493 (**Fig. 5**). Interestingly, the tumor was shown to overexpress FGFR1 and FGFR4 supporting our hypothesis. This patient displayed secondary resistance after three months of treatment. This suggests that combination of therapies is necessary to overcome feedback loops and resistance; our study provides data on two combinations. The first one associating JNJ42756493 to the PI3K/mTOR antagonist BEZ235 unexpectedly proved to be antagonistic in DDLPS cells (Supplementary Fig. S3C). We had previously shown that combining the MDM2-TP53 interaction inhibitor RG7388 with a targeted non-genotoxic drug such as the CDK4 inhibitor palbociclib may hold therapeutic potential (30). The second combination we tested, associating JNJ42756493 with RG7388, was found to exert a highly synergistic effect on all the tumorigenicity parameters we analyzed (**Fig. 4**) in all three WDLPS and DDLPS cell lines. We showed a dramatic effect of the JNJ42756493 + RG7388 combination on apoptosis induction ranging from 65% to 89% (**Fig. 4A**). Marked effects on long term survival were observed for low, therefore more clinically relevant, concentrations of JNJ42756493 and RG7388 (**Fig. 4C and D**).

## **Conclusions**

In conclusion, effective well-tolerated treatments for DDLPS in the advanced/metastatic setting are lacking. FGFR inhibitors are reported to induce manageable toxicities in patients. Our findings provide a rationale to use FGFR1 and FGFR4 protein expression as biomarkers to select patients for clinical trials investigating FGFR inhibitors. Furthermore, we have demonstrated the efficacy of the JNJ42756493 + RG7388 combination both *in vitro* and *in vivo*; we hope that our data can be transferred to the clinical setting.

## **Acknowledgements**

The authors thank Sandrine Destree, Arnaud Borderie, Marianne Goracci, Valérie Velasco, Roger Grattery, Imène Krossa, Maha Hafsi, Charles-Maxime Vivier, Saloua Benhammouch, Gilbert Adam, Jean-Baptiste Courrèges and Antoine Thyss for their participation in this study.

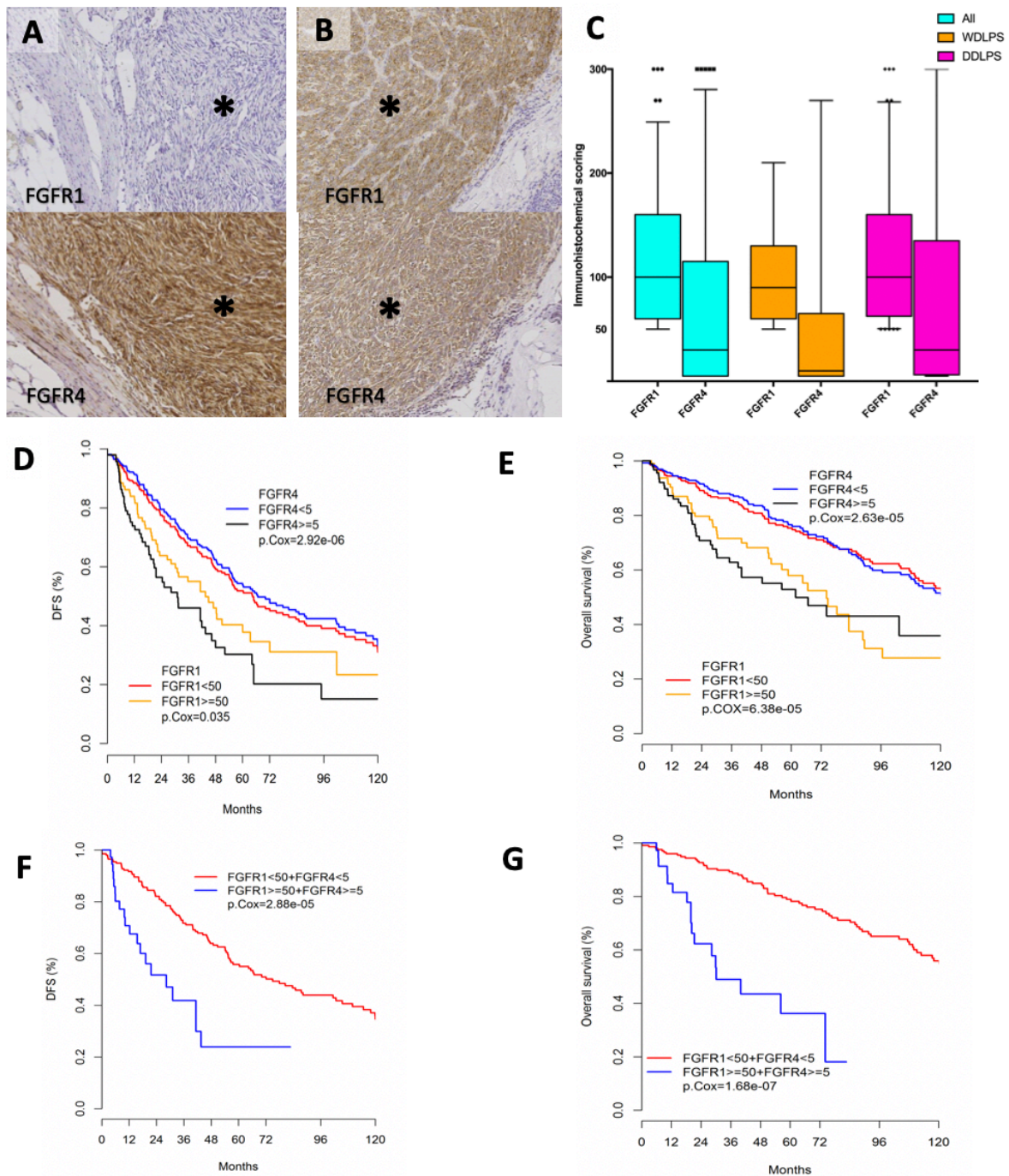
## References

1. Sbaraglia M, Dei Tos AP, Pedeutour F. Atypical lipomatous tumour/Well-differentiated liposarcoma. WHO Classification of Tumours Soft Tissue and Bone Tumours. 5th ed. Lyon: IARC; p. 36–8.
2. Dei Tos AP, Marino-Enriquez A, Pedeutour F. Dedifferentiated liposarcoma. WHO Classification of Tumours Soft Tissue and Bone Tumours. 5th ed. Lyon: IARC; p. 39–41.
3. Karavasilis V, Seddon BM, Ashley S, Al-Muderis O, Fisher C, Judson I. Significant clinical benefit of first-line palliative chemotherapy in advanced soft-tissue sarcoma. *Cancer*. 2008;112:1585–91.
4. Demetri GD, von Mehren M, Jones RL, Hensley ML, Schuetze SM, Staddon A, et al. Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34:786–93.
5. Schöffski P, Chawla S, Maki RG, Italiano A, Gelderblom H, Choy E, et al. Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2016;387:1629–37.
6. Jones RL, Fisher C, Al-Muderis O, Judson IR. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2005;41:2853–60.
7. van der Graaf WTA, Blay J-Y, Chawla SP, Kim D-W, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2012;379:1879–86.
8. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet*. 2010;42:715–21.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address: elizabeth.demicco@sinaihealthsystem.ca, Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*. 2017;171:950-965.e28.
10. Groisberg R, Hong DS, Holla V, Janku F, Piha-Paul S, Ravi V, et al. Clinical genomic profiling to identify actionable alterations for investigational therapies in patients with diverse sarcomas. *Oncotarget*. 2017;8:39254–67.
11. Ray-Coquard I, Blay J-Y, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol*. 2012;13:1133–40.
12. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004;303:844–8.
13. Dickson MA, Schwartz GK, Keohan ML, D'Angelo SP, Gounder MM, Chi P, et al. Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016;2:937–40.

14. Gahvari Z, Parkes A. Dedifferentiated Liposarcoma: Systemic Therapy Options. *Curr Treat Options Oncol.* 2020;21:15.
15. Wang X, Asmann YW, Erickson-Johnson MR, Oliveira JL, Zhang H, Moura RD, et al. High-resolution genomic mapping reveals consistent amplification of the fibroblast growth factor receptor substrate 2 gene in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50:849–58.
16. Zhang K, Chu K, Wu X, Gao H, Wang J, Yuan Y-C, et al. Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res.* 2013;73:1298–307.
17. Sato T, Gotoh N. The FRS2 family of docking/scaffolding adaptor proteins as therapeutic targets of cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:689–700.
18. Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:105–22.
19. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 2018;173:321-337.e10.
20. Li C, Shen Y, Ren Y, Liu W, Li M, Liang W, et al. Oncogene mutation profiling reveals poor prognosis associated with FGFR1/3 mutation in liposarcoma. *Hum Pathol.* 2016;55:143–50.
21. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res.* 2005;65:9226–35.
22. Hanes R, Munthe E, Grad I, Han J, Karlsen I, McCormack E, et al. Preclinical Evaluation of the Pan-FGFR Inhibitor LY2874455 in FRS2-Amplified Liposarcoma. *Cells.* 2019;8.
23. Hanes R, Grad I, Lorenz S, Stratford EW, Munthe E, Reddy CCS, et al. Preclinical evaluation of potential therapeutic targets in dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget.* 2016;7:54583–95.
24. Perera TPS, Jovcheva E, Mevellec L, Vialard J, De Lange D, Verhulst T, et al. Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2017;16:1010–20.
25. Siefker-Radtke AO, Necchi A, Park SH, García-Donas J, Huddart RA, Burgess EF, et al. First results from the primary analysis population of the phase 2 study of erdafitinib (ERDA; JNJ-42756493) in patients (pts) with metastatic or unresectable urothelial carcinoma (mUC) and FGFR alterations (FGFRalt). *American Society of Clinical Oncology*; 2018.
26. Ding Q, Zhang Z, Liu J-J, Jiang N, Zhang J, Ross TM, et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem.* 2013;56:5979–83.
27. Bertucci F, Finetti P, Monneur A, Perrot D, Chevreau C, Le Cesne A, et al. PARP1 expression in soft tissue sarcomas is a poor-prognosis factor and a new potential therapeutic target. *Mol Oncol.* 2019;13:1577–88.
28. RRePS - Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères. Available from: <https://rreps.sarcomabcb.org/> Accessed 12 May 2020.
29. Sirvent N, Forus A, Lescaut W, Burel F, Benzaken S, Chazal M, et al. Characterization of centromere alterations in liposarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;29:117–29.

30. Laroche-Clary A, Chaire V, Algeo M-P, Derieppe M-A, Loarer FL, Italiano A. Combined targeting of MDM2 and CDK4 is synergistic in dedifferentiated liposarcomas. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2017;10:123.
31. Laroche-Clary A, Lucchesi C, Rey C, Verbeke S, Bourdon A, Chaire V, et al. CHK1 inhibition in soft-tissue sarcomas: biological and clinical implications. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;29:1023–9.
32. Laroche A, Chaire V, Algeo M-P, Karanian M, Fourneau B, Italiano A. MDM2 antagonists synergize with PI3K/mTOR inhibition in well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas. *Oncotarget*. 2017;8:53968–77.
33. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 1984;22:27–55.
34. Perez-Garcia J, Muñoz-Couselo E, Soberino J, Racca F, Cortes J. Targeting FGFR pathway in breast cancer. *Breast Edinb Scotl*. 2018;37:126–33.
35. Asano N, Yoshida A, Mitani S, Kobayashi E, Shiotani B, Komiyama M, et al. Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/ dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget*. 2017;8:12941–52.
36. Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, Aoyama T, Nishijo K, Shibata KR, et al. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005;11:2702–12.
37. Girnita L, Girnita A, Wang M, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Larsson O. A link between basic fibroblast growth factor (bFGF) and EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma cells. *Oncogene*. 2000;19:4298–301.
38. Künstlinger H, Fassunke J, Schildhaus H-U, Brors B, Heydt C, Ihle MA, et al. FGFR2 is overexpressed in myxoid liposarcoma and inhibition of FGFR signaling impairs tumor growth in vitro. *Oncotarget*. 2015;6:20215–30.
39. Crose LES, Etheridge KT, Chen C, Belyea B, Talbot LJ, Bentley RC, et al. FGFR4 blockade exerts distinct antitumorigenic effects in human embryonal versus alveolar rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012;18:3780–90.
40. Tap WD, Eilber FC, Ginther C, Dry SM, Reese N, Barzan-Smith K, et al. Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:95–112.
41. Jing W, Lan T, Chen H, Zhang Z, Chen M, Peng R, et al. Amplification of FRS2 in atypical lipomatous tumour/well-differentiated liposarcoma and de-differentiated liposarcoma: a clinicopathological and genetic study of 146 cases. *Histopathology*. 2018;72:1145–55.
42. Facchinetti F, Hollebecque A, Bahleda R, Loriot Y, Olausson KA, Massard C, et al. Facts and New Hopes on Selective FGFR Inhibitors in Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2020;26:764–74.

**Figure 1.**

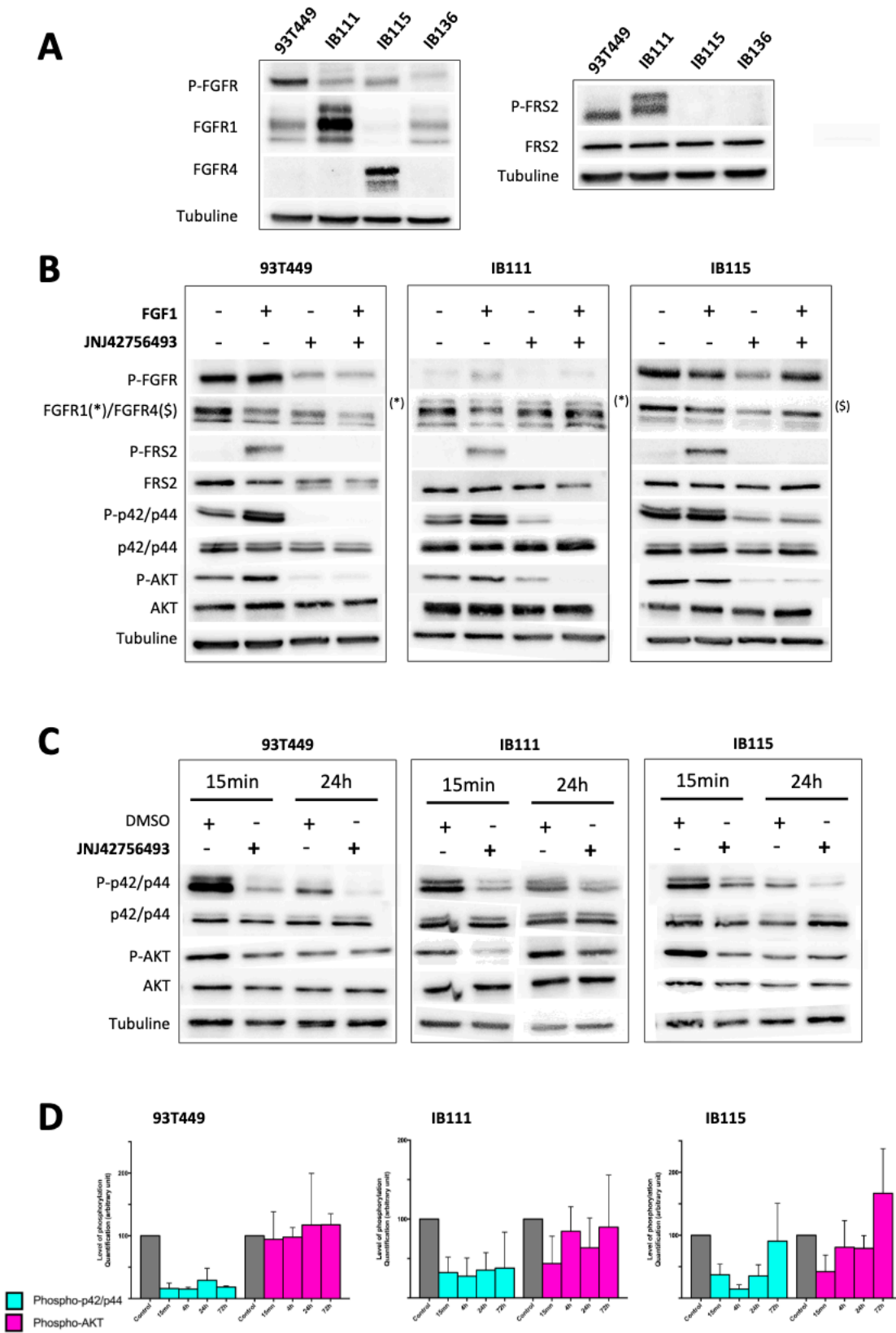


**Figure 1. FGFR1 and FGFR4 expression in WDLPS/DDLPS clinical tumor samples and prognostic values.**

**A-C: Immunohistochemical analysis in our series of 418 tumors.** **A.** Representative illustration of a DDLPS case negative for FGFR1 expression in tumor cells (\*) (0% positive tumor cells x intensity 0 = score 0) and showing a diffuse and high IHC staining for FGFR4 (100% positive tumor cells (\*) x intensity 3 = score 300) (localization: membrane and cytoplasm, magnification x100). **B.** DDLPS case showing a diffuse and strong co-overexpression of FGFR1 and FGFR4 (100% positive tumor cells (\*) x intensity 3 = score 300, for both FGFR1 and FGFR4). **C.** Box plot showing the distribution of IHC scores within the overexpressing cases\* for FGFR1 and FGFR4 in all cases (WDLPS and DDLPS) of the studied cohort. *\*Overexpressing cases were determined by statistical analysis and cut-off was defined as following: for FGFR1 score > or equal to 50 and for FGFR4 score > or equal to 5.* **D-G. Prognostic value of FGFR1 and FGFR4 expression in in our cohort of 358 WDLPS/DDLPS:** Kaplan-Meier survival analyses of FGFR1 and/or FGFR4 expression shows correlation between FGFR1 and/or FGFR4 expression and disease-free survival (DFS, **D** and **F**) and overall survival (OS, **E** and **G**).

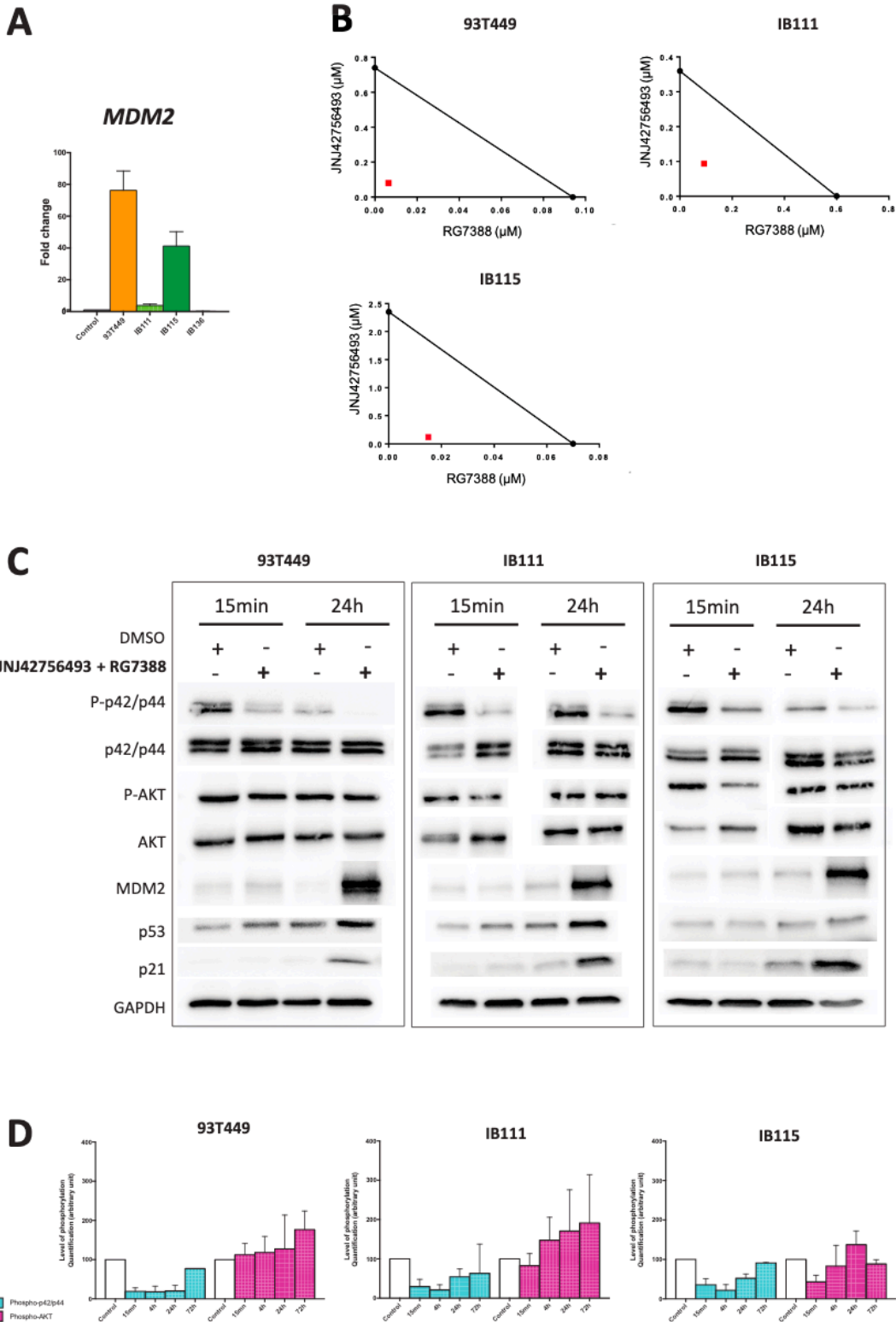


Figure 2.



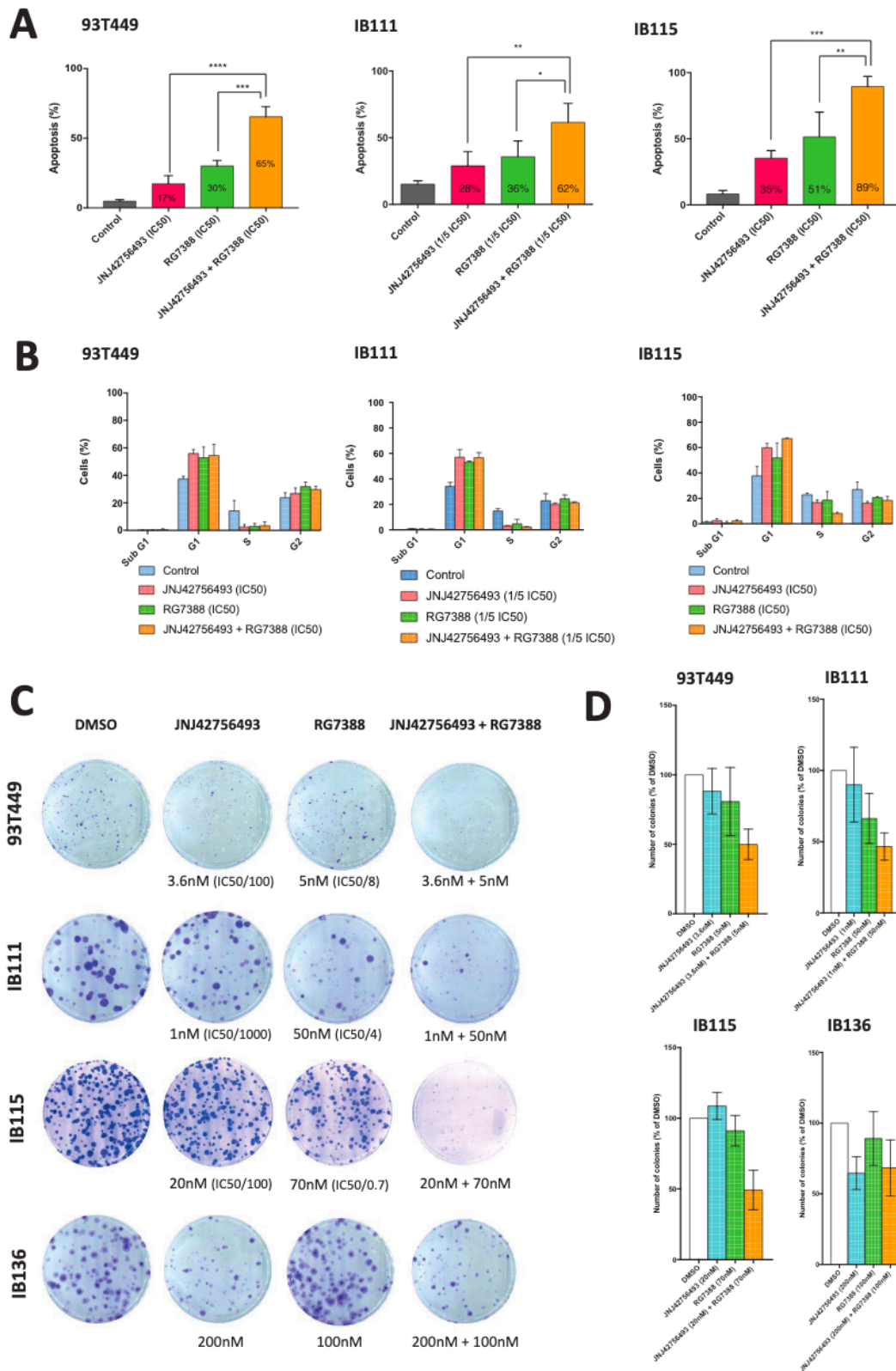
**Figure 2. Analysis of the FGFR/FRS2 signaling pathway after FGFR stimulation and inhibition in WDLPS and DDLPS cell lines.** Western blot analysis showing **A.** The level of phosphorylated and total protein for the indicated proteins in one WDLPS (93T449) and two DDLPS (IB111 and IB115) cell lines as well as in a LMS cell line (IB136) used as a negative control (non-adipose soft tissue sarcoma). **B.** The level of phosphorylated and total protein for the indicated proteins in 93T449, IB111 and IB115 cells treated for 30 min with JNJ42756493 at the IC50 concentrations 0.36  $\mu\text{M}$  (93T449), 1  $\mu\text{M}$  (IB111), and 2  $\mu\text{M}$  (IB115), with or without FGF1 stimulation (10 ng/ml for 15 min) as indicated. **C.** The level of phosphorylated and total protein for the indicated proteins in 93T449, IB111 and IB115 cells treated for 15 min and 24 h with JNJ42756493 at 0.36  $\mu\text{M}$  (93T449), 1  $\mu\text{M}$  (IB111), and 2  $\mu\text{M}$  (IB115). In all western blot experiments,  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. **D.** Quantification of the western blot analyses shown in (C) performed on cells treated with JNJ42756493 for 15 min, 4 h, 24 h, and 72 h.

Figure 3.



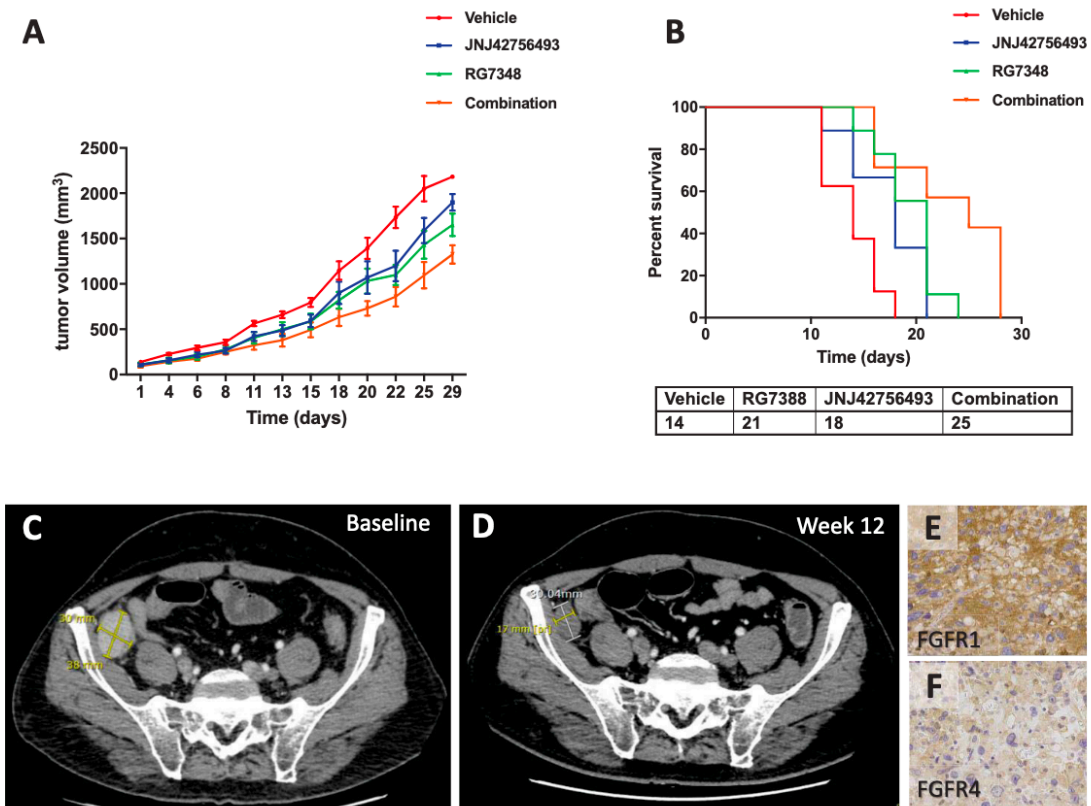
**Figure 3. Effect of JNJ42756493 + RG7388 combination on tumorigenicity and on activation of the downstream FGFR signaling pathways.** **A.** qRT-PCR analysis of *MDM2* mRNA expression in 93T449 (WDLPS), IB111 (DDLPS), IB115 (DDLPS) and IB136 (LMS) cells. Fold changes were calculated relative to dermolipectomy adipose tissue cells (Control) using *RPLP0* as the reference gene. **B.** Isobologram representation for the 93T449, IB111 and IB115 cell lines as in Fig. S3C. The combination index (CI) values for the JNJ42756493 + RG7388 combination were calculated and were the following: 0.18 (93T449), 0.40 (IB111) and 0.26 (IB115) indicating synergy for both WDLPS and DDLPS cells. **C.** Western blot analysis showing the level of phosphorylated and total protein for the indicated proteins in 93T449, IB111 and IB115 cells treated for 15 min and 24 h with JNJ42756493 at 0.36  $\mu$ M (93T449), 1  $\mu$ M (IB111), and 2  $\mu$ M (IB115) and RG7388 at 0.04  $\mu$ M (93T449), 0.2  $\mu$ M (IB111), and 0.05  $\mu$ M (IB115). **D.** Quantification of the western blot analyses shown in (C) performed on cells treated with JNJ42756493 + RG7388 for 15 min, 4 h, 24 h, and 72h.

Figure 4.



**Figure 4. Effects of JNJ42756493 and RG7388, as single agents and in combination on *in vitro* tumorigenicity.** **A. Effects on apoptosis induction.** Quantification of apoptotic cells using annexin V-FITC and propidium iodide staining followed by flow cytometry after 72 h of treatment by JNJ42756493 or RG7388 and in combination. JNJ42756493 and RG7388 concentrations were determined according to IC50 values, respectively: 0.36  $\mu$ M and 0.04  $\mu$ M (93T449), 0.2  $\mu$ M and 0.04  $\mu$ M (for the IB111 cells, because of a high level of apoptosis, concentrations were decreased to 1/5 of IC50 values for each single agent) and 2  $\mu$ M and 0.05  $\mu$ M (IB115) **B. Effects on cell cycle distribution.** Quantification of cell cycle analysis using propidium iodide incorporation and flow cytometry after 48 h of treatment using the same drug concentrations on the same cell lines as in (A) **C-D. Effects on long-term survival.** Clonogenic assays in the WDLPS (93T449) and DDLPS cell lines (IB111, IB115) and in the control soft tissue LMS cell line (IB136), using the indicated JNJ42756493 and RG7388 concentrations. **C.** Representative pictures of the clonogenic assay. **D.** Quantification of the number of colonies obtained in the same experimental conditions as in (C).

Figure 5.



**Figure 5. *In vivo* evaluation of the combination of JNJ42756493 and RG7388.** **A.** Tumor growth in mice injected with DDLPS IB115 cells and treated with either vehicle, RG7388 (idasanutlin), JNJ42756493 (erdafitinib), or a combination of the two drugs (combination). **B.** Kaplan-Meier survival curves for the four cohorts. A log-rank (Mantel-Cox) test was used to calculate P-values comparing the survival rates. **Effects of erdafitinib treatment in a patient with metastatic DDLPS.** CT scan images of a 57-year-old male patient with a metastatic DDLPS before (C) and after erdafitinib treatment (D). The patient was resistant to doxorubicin, regorafenib, high-dose ifosfamide, trabectedin and presented a stable disease during 12 weeks (according to the RECIST criteria) under erdafitinib treatment. This tumor co-expressed FGFR1 (score 120, E) and FGFR4 (score 60, F).

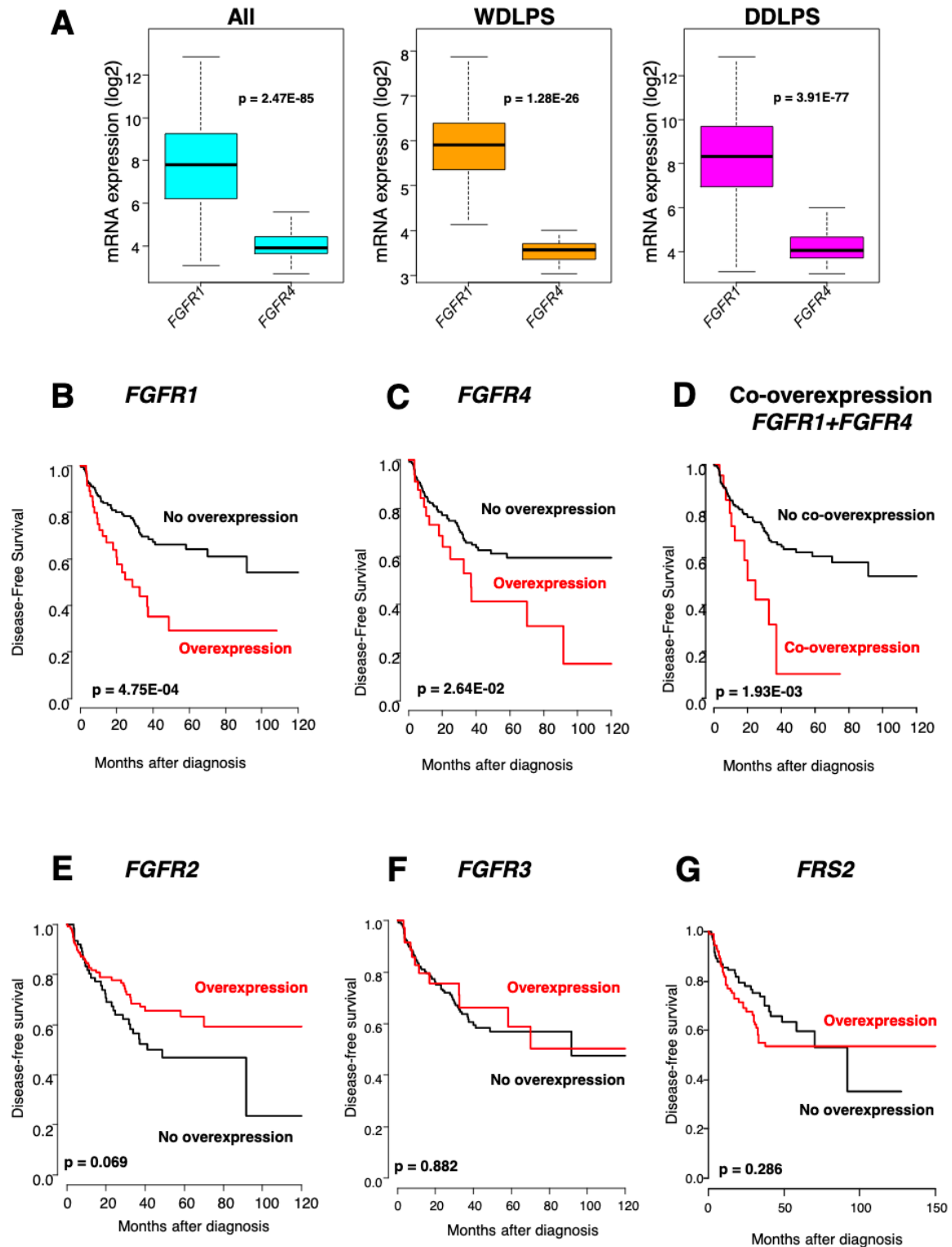
**Table 1. Distribution of FGFR1 and FGFR4 immunohistochemical expression in our series of 418 cases of WD/DDLPS**

	All LPS (n=418)	WDLPS (n=127)	DDLPS (n=291)
FGFR1 expression			
< 50	304 (73%)	113 (89%)	191 (66%)
$\geq 50^*$	114 (27%)	14 (11%)	100 (34%)
FGFR4 expression			
< 5	307 (73%)	109 (86%)	198 (68%)
$\geq 5^*$	111 (27%)	18 (14%)	93 (32%)
FGFR1+FGFR4 co-overexpression			
FGFR1<50 and FGFR4<5	237 (57%)	100 (79%)	137 (47%)
FGFR1<50 and FGFR4 $\geq 5$	67 (16%)	13 (10%)	54 (19%)
FGFR1 $\geq 50$ and FGFR4<5	70 (17%)	9 (7%)	61 (21%)
FGFR1 $\geq 50$ and FGFR4 $\geq 5^{\S}$	44 (11%)	5 (4%)	39 (13%)

\*, overexpression; §, co-overexpression FGFR1 and FGFR4



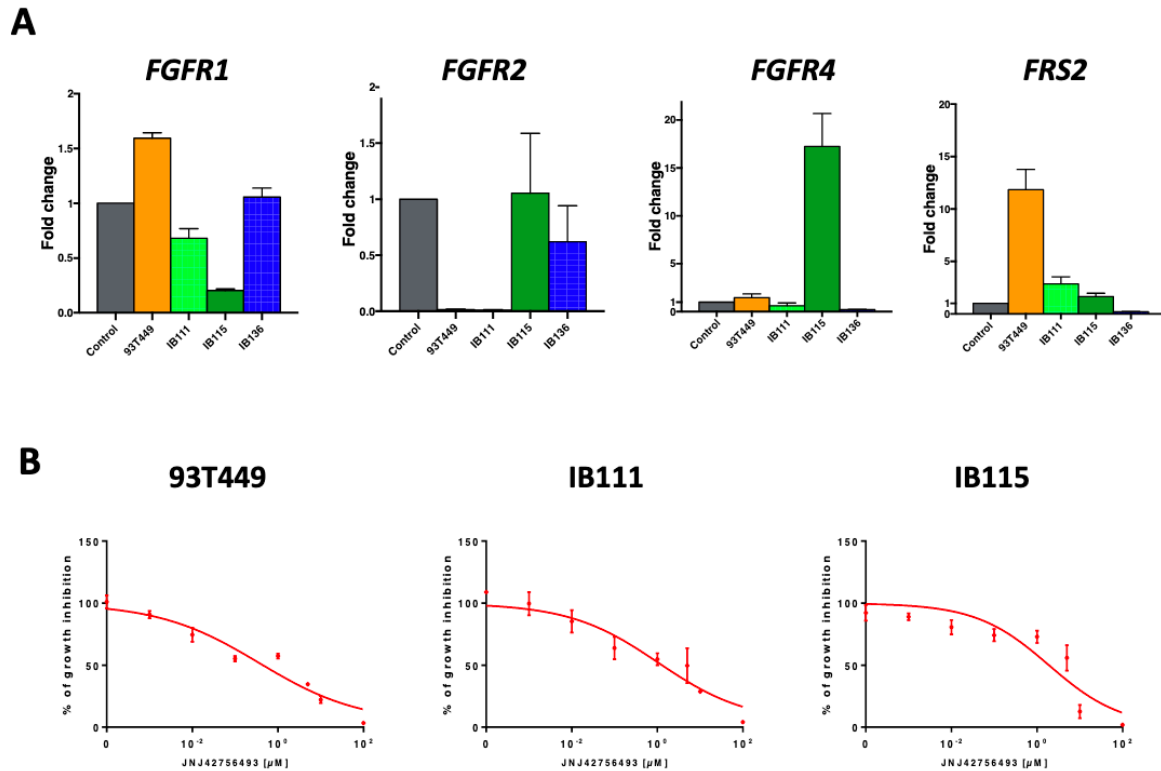
Supplementary Figure S1.



**Supplementary Figure S1. Prognostic value of *FGFR* mRNA expression in WD/DDLPS.**

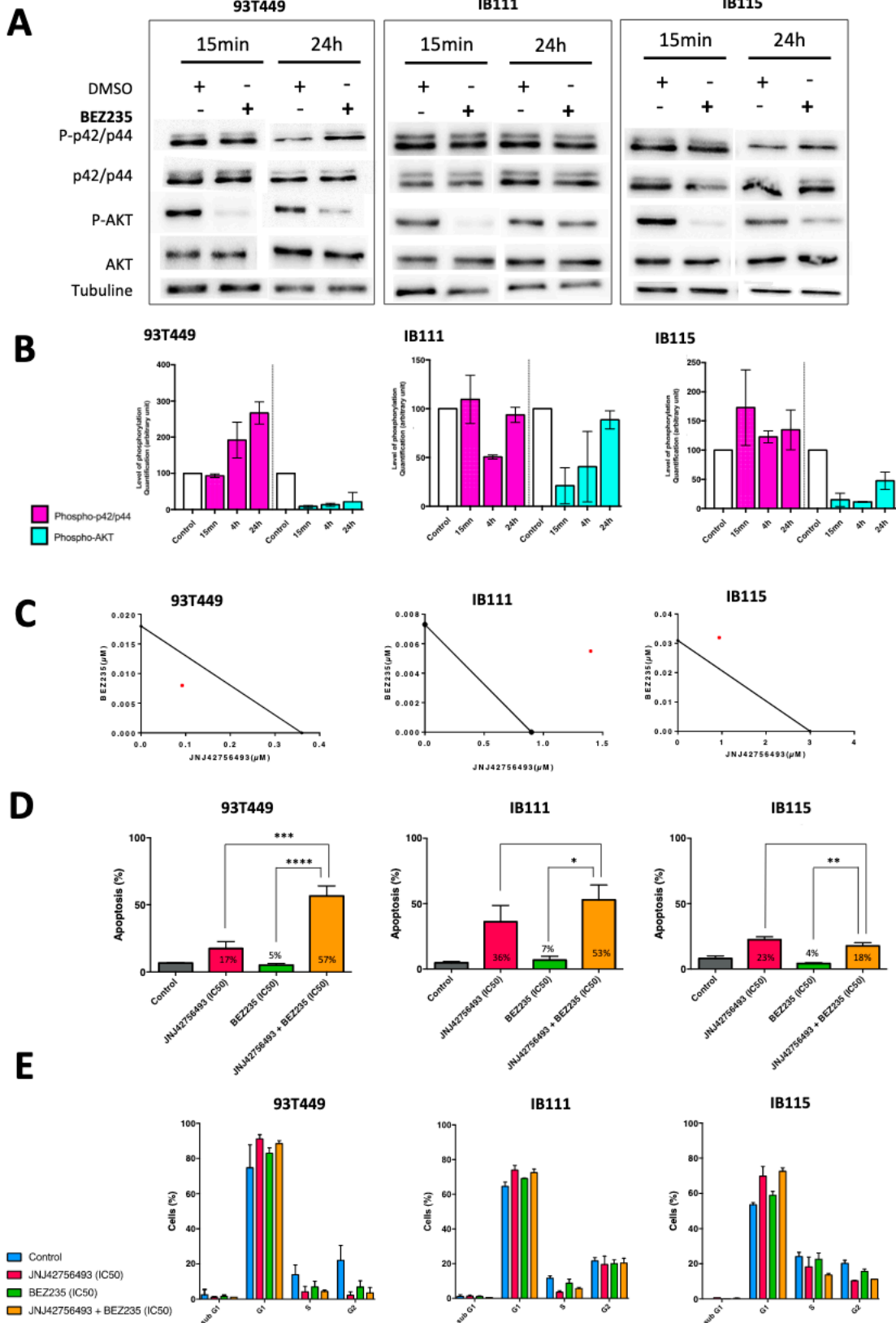
**A.** Box Plots of mRNA expression levels (log<sub>2</sub>) of *FGFR1* and *FGFR4* in all 276 WD/DDLPS samples (blue), in 58 WDLPS (orange) and in 218 DDLPS (pink). Overexpression was defined as exceeding more than 2-fold the mean expression level present in the normal fat samples. The p-values are for the Student t-test. **B-G.** Kaplan-Meier disease-free survival (DFS) curves in 200 patients with WD/DDLPS according to expression status of *FGFR1* (B), *FGFR4* (C), *FGFR1+FGFR4* (D), *FGFR2* (E), *FGFR3* (F), *FRS2* (G). The p-values are for the log-rank test.

Supplementary Figure S2.



**Supplementary Figure S2. A. qRT-PCR analysis of *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4* and *FRS2* mRNA expression in 93T449 (WDLPS), IB111 (DDLPS), IB115 (DDLPS) and IB136 (LMS) cells.** Fold changes were calculated relative to dermolipectomy adipose tissue cells (Control) using *RPLP0* as the reference gene. *FGFR1* was quite abundant in all cell lines ( $\Delta$ Ct values ranging from 3.6 to 6.65) and in control dermolipectomy cells. For *FGFR2*, no expression was detected in IB111 and 93T449 cells and expression in the dermolipectomy cells, IB115 and IB136 cells was very low ( $\Delta$ Ct values around 13). For *FGFR3*, no expression was detected in the control dermolipectomy cells therefore no histogram is presented. No *FGFR3* expression was detected in IB111 and IB136 cells and *FGFR3* expression was very low in IB115 and 93T449 cells ( $\Delta$ Ct values around 14). *FGFR4* expression was very low in all cells ( $\Delta$ Ct values ranging from 12.4 to 15.3) apart from IB115 cells ( $\Delta$ Ct value = 8,9) which overexpress *FGFR4* compared to control dermolipectomy cells. *FRS2* was expressed in all cell lines ( $\Delta$ Ct values ranging from 2.5 to 8.4). **B. Effect of JNJ42756493 on 93T449 (WDLPS), IB111 (DDLPS) and IB115 (DDLPS) cell viability.** The IC50 values, determined using a MTT assay, are 0.36, 1 and 2  $\mu$ M, respectively.

Supplementary Figure S3.



**Supplementary Figure S3. Effect of BEZ235 on activation of the p42/p44 MAPK and PI3K/AKT pathways and effect of the JNJ42756493 and BEZ235 combination on *in vitro* tumorigenicity.** **A.** Western blot analysis showing the level of phosphorylated and total protein for the indicated proteins in 93T449, IB111 and IB115 cells treated for 15 min and 24 h with BEZ235 at 0.05  $\mu$ M (93T449), 0.01  $\mu$ M (IB111), and 0.06  $\mu$ M (IB115). **B.** Quantification of the western blot analyses shown in (A) performed on cells treated with BEZ235 for 15 min, 4 h, and 24 h. **C. Isobologram representation for the 93T449, IB111 and IB115 cell lines.** The *dots* located at the *lower left*, on the *diagonal* line, or at the *upper right* indicate synergism, additivity and antagonism, respectively. The CI values for the JNJ42756493 + BEZ235 combination were calculated and were the following: 0.75, 2.3 and 1.35, respectively indicating synergy for the WDLPS cells (93T449) but antagonism for the DDLPS cells (IB111 and IB115). **D. Effects on apoptosis induction.** Quantification of apoptotic cells using annexin V-FITC and propidium iodide staining followed by flow cytometry after 72 h of treatment by JNJ42756493 or BEZ235 and in combination. JNJ42756493 and BEZ235 concentrations were determined according to IC50 values, respectively: 0.36  $\mu$ M and 0.05  $\mu$ M (93T449), 1  $\mu$ M and 0.01  $\mu$ M and 2  $\mu$ M and 0.06  $\mu$ M (IB115) **E. Effects on cell cycle distribution.** Quantification of cell cycle analysis using propidium iodide incorporation and flow cytometry after 48 h of treatment using the same drug concentrations on the same cell lines as in (D).

**Supplementary Table S1. Patients' clinicopathological characteristics from the cohort analysed at the protein level (n=358)**

Characteristics	N (%)
Median age, years (n=358)	64.2 (22-88) *
Sex (n=358)	
Male	218 (61%)
Female	140 (39%)
Liposarcoma subtypes (n=358)	
Well-differentiated (WDLPS)	106 (30%)
Dedifferentiated (DDLPS)	252 (70%)
Location (n=352)	
Limbs	76 (22%)
Retroperitoneum	221 (62%)
Head and neck	6 (2%)
Other	49 (14%)
Grading (FNCLCC§) (n=297)	
1	76 (26%)
2	152 (51%)
3	69 (23%)
Metastatic liposarcoma at diagnosis (n=358)	
No	350 (98%)
Yes	8 (2%)
Surgery: complete resection (R0) (n=283)	
No	233 (82%)
Yes	50 (18%)
Radiotherapy (n=350)	
No	199 (57%)
Yes	151(43%)
Chemotherapy (n=346)	
No	234 (68%)
Yes	112 (32%)
Targeted therapy (n=350)	
No	337 (96%)
Yes	13 (4%)

\*, median (range)

§, Sarcoma grading according to the « Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer »

**Supplementary Table S2. Survival cox analyses**

	HR†	CI95%	p-Cox
<b>Cox univariate analysis and disease-free survival (DFS)</b>			
Surgery: complete resection (R0)			
Yes	1	REF.	-
No	1.3	[0.8-2.0]	0.317
Liposarcoma subtypes			
Well-differentiated (WDLPS)	1	REF.	-
Dedifferentiated (DDLPS)	2.5	[1.8-3.6]	<0.0001****
Location			
Limbs	1	REF.	-
Other	1.3	[0.9-2.0]	0.141
Grading (FNCLCC§)			
1	1	REF.	-
2	2.3	[1.5-3.5]	<0.001***
3	3.5	[2.1-5.6]	<0.0001****
FGFR1 expression			
<50	1	REF.	-
≥50	1.4	[1.0-2.0]	0.0349 *
FGFR4 expression			
<5	1	REF.	-
≥5	2.2	[1.6-3.1]	<0.0001****
FGFR1+FGFR4 co-overexpression			
FGFR1<50 + FGFR4<5	1	REF.	-
FGFR1≥50 + FGFR4≥5	2.9	[1.8-4.9]	<0.0001****
<b>Cox multivariate analysis and disease-free survival (DFS)‡</b>			
Liposarcoma subtypes			
Well-differentiated (WDLPS)	1	REF.	-
Dedifferentiated (DDLPS)	2.3	[1.6-3.3]	<0.0001
FGFR1 expression			
<50	1	REF.	-
≥50	1.1	[0.8-1.6]	0.48
FGFR4 expression			
<5	1	REF.	-
≥5	1.9	[1.4-2.7]	0.00015
FGFR1+FGFR4 co-overexpression			
No	1	REF.	-
Yes	2.1	[1.3-3.4]	0.0025
<b>Cox univariate analysis and overall survival (OS)‡</b>			
Surgery: complete resection (R0)			
Yes	1	REF.	-
No	2.7	[1.2-5.7]	0.0132 *
Liposarcoma subtypes			
Well-differentiated (WDLPS)	1	REF.	-
Dedifferentiated (DDLPS)	2.8	[1.9-4.3]	<0.0001****
Location			
Limbs	1	REF.	-
Other	1.7	[1.1-2.7]	0.024 *
Grading (FNCLCC§)			
1	1	REF.	-
2	2.4	[1.5-3.9]	<0.001***
3	4	[2.3-7]	<0.0001****

<b>FGFR4 expression</b>			
<5	1	REF.	-
>=5	2.3	[1.6-3.4]	<0.0001****
<b>FGFR1 + FGFR4 co-overexpression</b>			
FGFR1<50 and FGFR4<5	1	REF.	-
FGFR1>=50 and FGFR4>=5	4.7	[2.6-8.4]	<0.0001****
<b>Cox multivariate analysis and overall survival (OS) ‡</b>			
<b>Surgery: complete resection (R0)</b>			
Yes	1	REF.	-
No	2.50	[1.2-5.4]	0.0206
<b>Liposarcoma subtypes</b>			
Well-differentiated (WDLPS)	1	REF.	-
Dedifferentiated (DDLPS)	2.69	[1.5-4.7]	0.00062
<b>Location</b>			
Limbs	1	REF.	-
Other	1.56	[0.91-2.66]	0.099
<b>FGFR1 expression</b>			
<50	1	REF.	-
>=50	1.9	[1.2-3.0]	0.0080
<b>FGFR4 expression</b>			
<5	1	REF.	-
>=5	2.0	[1.2-3.1]	0.00618
<b>FGFR1+FGFR4 co-overexpression</b>			
No	1	REF.	-
Yes	4.0	[2.1-7.8]	<0.0001

**Supplementary Table S2. Survival cox analyses.** †, Hazard ratio; §, Sarcoma grading according to the « Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer »; ‡, FNCLCC grading not included in the model because of correlation with subtypes.



**Supplementary Table S3. Clinicopathological characteristics of 276 samples analysed at the mRNA level.**

Characteristics	N = 276
Age (years)	63 (35-87)*
Sex	
Male	49 (67%)
Female	24 (33%)
Liposarcoma subtypes	
Well-differentiated (WDLPS)	58 (21%)
Dedifferentiated (DDLPS)	218 (79%)
Location	
Limbs	5 (5%)
Internal trunk	88 (87%)
Head and neck	1 (1%)
Superficial trunk	7 (7%)
Grading (FNCLCC§)	
1-2	1(2%)
3	58 (98%)
Pathological tumor size, median (cm)	18.4 (1.2-39.5)
Follow-up median (months)	30 (1-222)
DFS events, number of patients	70 (35%)
5-year DFS % [95%CI]	57% [49-66]

\* , median (range)

§, Sarcoma grading according to the « Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer »

**Supplementary Table S4. Determination of IC50 and Combination Index values**

	<b>93T449 WDLPS</b>	<b>IB111 DDLPS</b>	<b>IB115 DDLPS</b>
<b>JNJ42756493</b> IC50 value*	0.36 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M
<b>RG7388</b> IC50 value*	0.04 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.05 $\mu$ M
<b>JNJ42756493 + RG7388</b> Combination Index§	0.18 <b>Synergy</b>	0.40 <b>Synergy</b>	0.26 <b>Synergy</b>
<b>BEZ235</b> IC50 value*	0.05 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.06 $\mu$ M
<b>JNJ42756493 + BEZ235</b> Combination Index§	0.75 <b>Synergy</b>	2.3 Antagonism	1.35 Antagonism

\*, determined using MTT assay; §, calculated according to the Chou and Talalay method.

RESULTATS NON INCLUS  
DANS LE MANUSCRIT SOUMIS

---

## I. Effets d'un autre inhibiteur sélectif pan FGFRs : le LY2874455

Afin de renforcer les résultats obtenus avec l'erdafitinib, nous avons souhaité étudier les effets d'un autre inhibiteur pan-FGFR, le LY2874455. Le choix de cet inhibiteur est basé d'une part, sur la nécessité d'un inhibiteur pan FGFR avec de faibles IC50, notamment pour les deux FGFRs impliqués dans les LBD/LDD : FGFR1 (IC50 du LY2874455 : 2,8nM) et FGFR4 (IC50 du LY2874455 : 8nM) et d'autre part, sur l'analyse de la littérature et l'étude très récente de Hanes et al. qui a porté sur les effets du LY2874455 sur trois lignées cellulaires issues de LDD (Hanes et al., 2019). Notamment dans cette étude, les effets sur la viabilité cellulaire avec la détermination des valeurs des IC50 (de l'ordre du nanomolaire) semblaient très prometteurs.

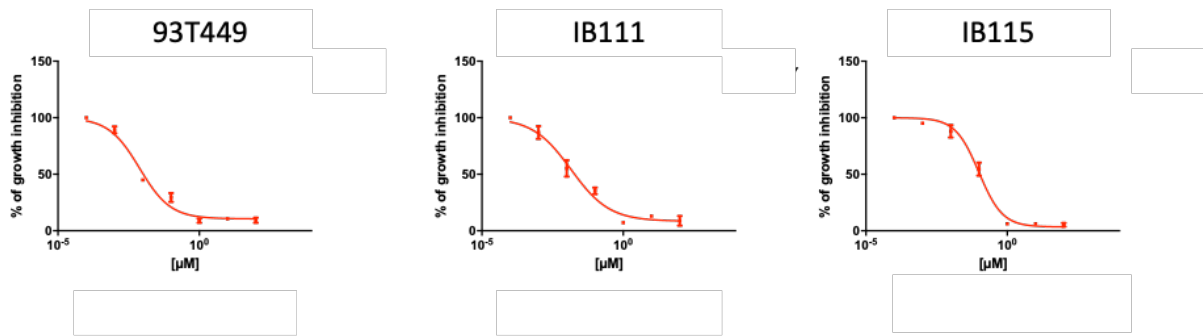
### 1. Effets du LY2874455 sur la viabilité cellulaire

Dans le **Tableau 7** sont listées les valeurs d'IC50 obtenues par technique de MTT (**Figure 33**), ainsi que les valeurs déterminées pour le JNJ42756493, pour comparaison. Ces résultats qui ne sont que préliminaires, sont très intéressants pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces valeurs d'IC50 sont très faibles de l'ordre du nanomolaire et beaucoup plus faibles que celles obtenues pour le JNJ42756493. De plus, on observe un profil de sensibilité similaire à celui du JNJ42756493, dans la mesure où la lignée 93T449 est la plus sensible aux inhibiteurs de FGFR et la lignée IB115, la moins sensible. Ces valeurs d'IC50 sont aussi du même ordre de grandeur que celles obtenues par Hanes et al. sur leurs 3 lignées issues de LDD (Hanes et al., 2019).

**Tableau 7. Comparaison des valeurs d'IC50 obtenues pour le LY2874455 et pour le JNJ42756493.**

	<b>LY2874455</b>	<b>JNJ42756493</b>
93T449	7,7nM	0,36 $\mu$ M
IB111	14nM	1 $\mu$ M
IB115	100nM	2 $\mu$ M

Figure 33. Détermination des valeurs d'IC50 par technique de MTT.



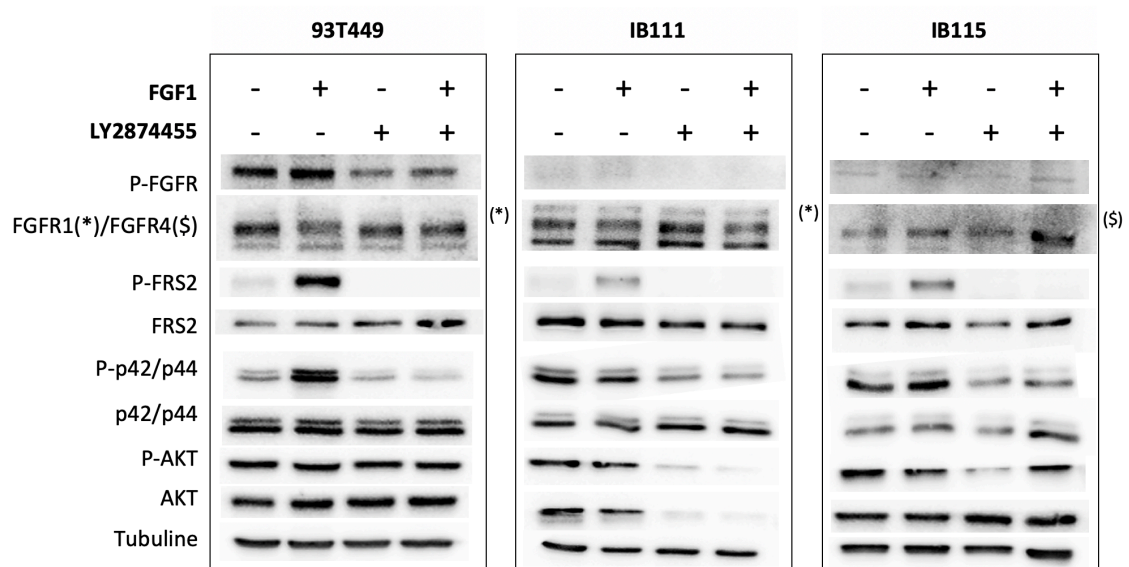
Toutefois, ces résultats préliminaires ont été obtenus à partir de deux expériences et ils nécessitent d'être confirmés.

## 2. Effets du LY2874455 sur la phosphorylation des FGFRs et de FRS2 et sur l'activation des voies en aval

Pour étudier ces effets, nous avons utilisé les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour étudier les effets du JNJ42756493, à savoir un prétraitement par LY2874455 pendant 30 minutes suivi par l'ajout ou non de FGF1 (10ng/mL, en présence de LY2874455) pendant 15 minutes précédant la lyse protéique. Toutefois, contrairement à ce qui avait été réalisé pour le JNJ42756493, nous n'avons pas utilisé les concentrations égales à l'IC50 pour chaque lignée, mais une concentration identique de 100nM pour chaque lignée afin de comparer les effets du LY2874455.

Nous avons mis en évidence une diminution de la phosphorylation de FGFR1 pour la lignée 93T449 et une abolition totale de la phosphorylation de FRS2 pour les 3 lignées sous l'effet du LY2874455. De même, la phosphorylation des MAP Kinases (ERK1/ERK2 ou p42/p44) était significativement réduite (**Figure 34**). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le JNJ42756493.

**Figure 34. Analyse de la voie FGFR/FRS2 après stimulation par FGF1 et/ou inhibition par le LY2874455 dans nos trois lignées issues de LBD/LDD.**



Seul le FGFR surexprimé dans la lignée est représenté : \*, FGFR1 et \$, FGFR4.

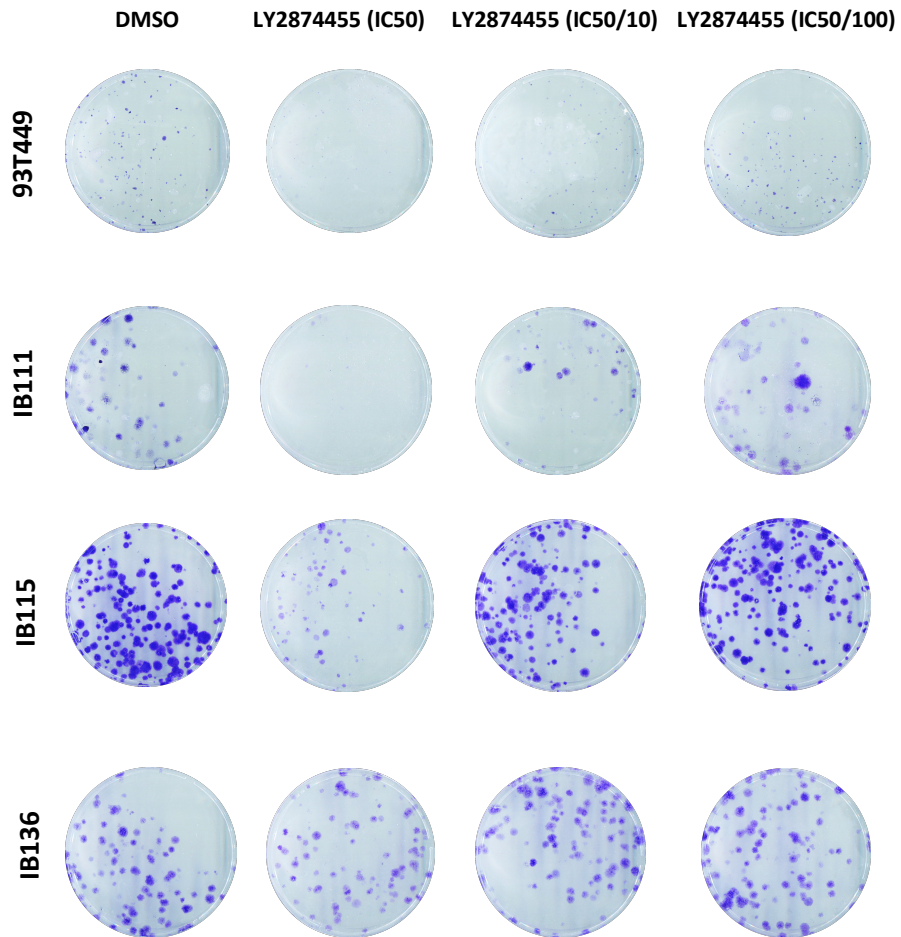
### 3. Effets du LY2874455 sur la survie à long terme

Dans un premier temps, nous avons réalisé une expérimentation préliminaire de type dose-réponse afin d'évaluer les effets du LY2874455 à plusieurs concentrations, en partant de la concentration égale à la valeur de l'IC50 pour chaque lignée, puis des concentrations égales à la valeur de l'IC50/10 et IC50/100. Notre objectif est le même que pour le JNJ42756493 : utiliser des doses bien inférieures à l'IC50 avec la combinaison LY2874455 + RG7388 et mettre en évidence une synergie de cette combinaison.

Les résultats obtenus pour cette expérimentation préliminaire mettent en évidence un effet majeur du LY2874455 aux concentrations égales à l'IC50, dans nos 3 lignées issues de LBD/LDD. Pour la lignée 93T449, le LY2874455 (7nM) inhibe la formation de colonies de l'ordre de 90% ; pour la lignée IB111, le LY2874455 (14nM) inhibe totalement la formation de colonies et pour la lignée IB115, le LY2874455 (98nM) inhibe la formation de colonies de l'ordre de 50% (**Figure 35**). En revanche, il n'est observé aucun effet du LY2874455 (98nM, correspondant à la concentration la plus élevée utilisée pour les lignées issues de LBD/LDD) sur la formation de colonies pour la lignée contrôle IB136. Le LY2874455, aux concentrations égales à l'IC50/10, n'a aucun effet pour la lignée IB115, un effet très

marginal (de l'ordre de 10%) pour la lignée 93T449 et un effet de 60% sur la formation de colonies pour la lignée IB111.

**Figure 35. Effets sur la survie à long terme, déterminés par test de clonogénicité, expérimentation de type dose-réponse.**



Dans un second temps et pour les raisons susmentionnées, nous avons choisi d'utiliser ces concentrations (IC50/10) qui sont très faibles pour les expérimentations de clonogénicité en combinaison avec le RG7388.

Les concentrations utilisées sont donc les suivantes (comparaison avec les concentrations utilisées pour le JNJ42756493) (**Tableau 8**) :

**Tableau 8. Comparaison des concentrations utilisées pour le LY2874455, le RG7388 et le JNJ42756493 pour les tests de clonogénicité.**

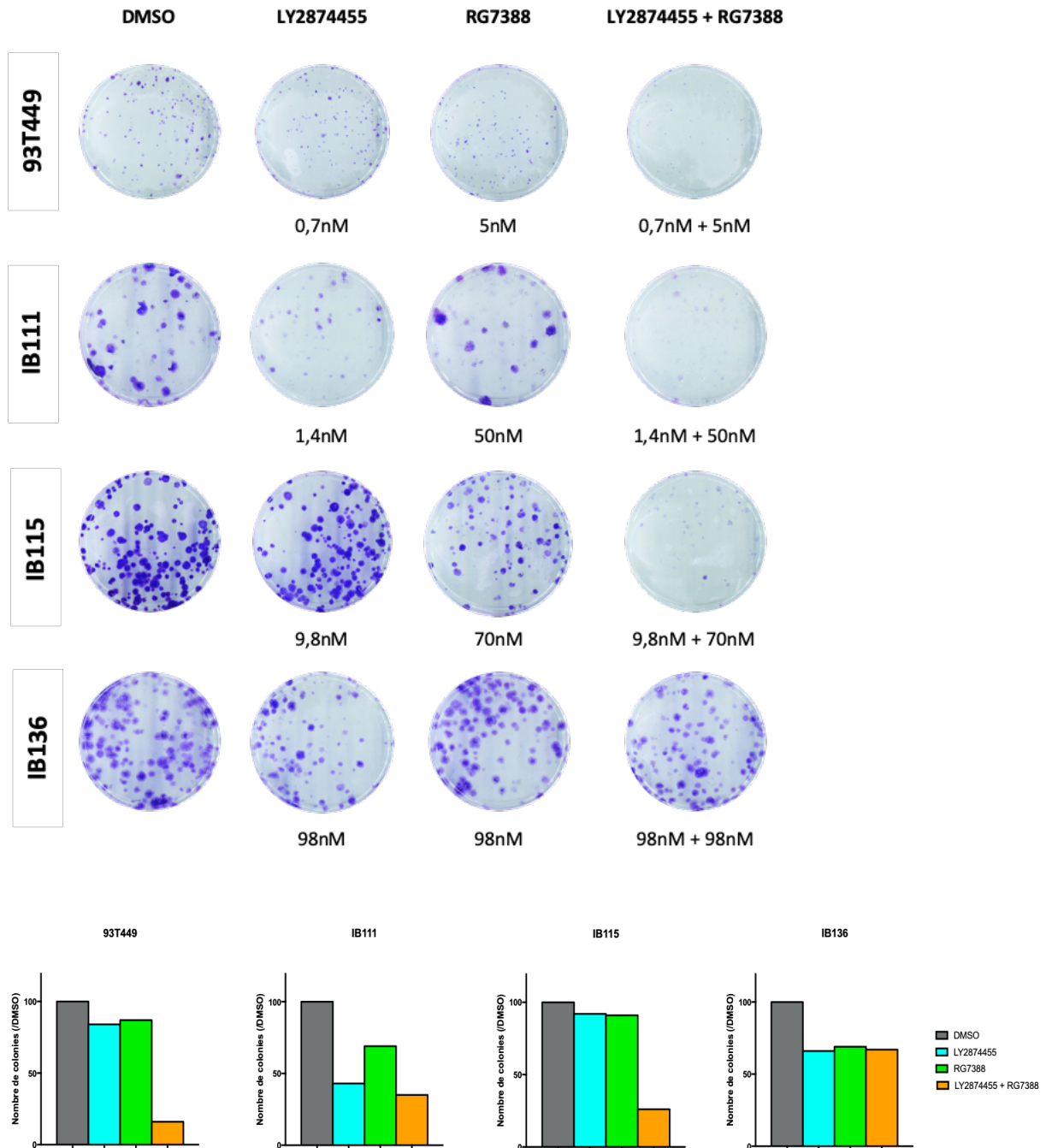
	<b>LY2874455</b>	<b>RG7388</b>	<b>JNJ42756493</b>
93T449	0,7nM	5nM	3,6nM
IB111	1,4nM	50nM	1nM
IB115	9,8nM	70nM	20nM
IB136	98nM	98nM	200nM

Nous avons observé des effets comparables à ceux obtenus avec l'utilisation de JNJ42756493 : avec des concentrations très faibles de LY2874455 (IC50/10, allant de 0,7 à 9,8nM) et en combinaison avec le RG7388, il existait un effet synergique de la combinaison sur la survie à long terme pour les lignées 93T449 et IB115 (**Figure 36**). Pour la lignée IB111, les effets paraissent moins évidents, mais ceci est dû en partie au fait que cette lignée n'est pas un bon modèle pour le test de clonogénicité (manque d'adhérence pour certaines colonies). Quant à la lignée contrôle IB136, on observe un effet marginal de l'ordre de 30% dans les trois conditions de traitement. Ces résultats prometteurs nécessitent d'être confirmés par d'autres expérimentations.

L'effet synergique sur la survie est donc en bonne voie pour être confirmé par deux types de combinaison utilisant un traitement pan-FGFR : le JNJ42756493 + RG7388 et le LY2874455 + RG7388.



Figure 36. Effets sur la survie à long terme après 21 jours de traitement.



*In fine*, ces résultats préliminaires suggèrent que l'efficacité du LY2874455 sur l'inhibition des voies FGFR/FRS2 et sur la survie à long terme serait superposable à celle du JNJ42756493. En revanche, l'effet du LY2874455 sur la viabilité cellulaire serait supérieure à celle du JNJ42756493, notamment avec des valeurs d'IC50 beaucoup plus faibles pour le LY2874455.

Par la suite, nous allons donc étudier les effets de la combinaison LY2874455 + RG7388 afin de déterminer s'il existe une synergie de cette combinaison.

## II. Recherche des mécanismes à l'origine de la synergie entre le JNJ42756493 et le RG7388 sur l'apoptose

Nous avons tenté d'élucider les mécanismes à l'origine de la forte induction de l'apoptose après 72h de traitement par la combinaison JNJ42756493 + RG7388 notamment pour la lignée IB115. Pour rappel, les pourcentages d'apoptose avec la combinaison étaient les suivants : 65% (93T449), 62% (IB111) et 89% (IB115) ; en revanche, les pourcentages d'apoptose avec le JNJ42756493 seul variaient selon les lignées de 17% à 35% et avec le RG7388 seul, de 30% à 51%.

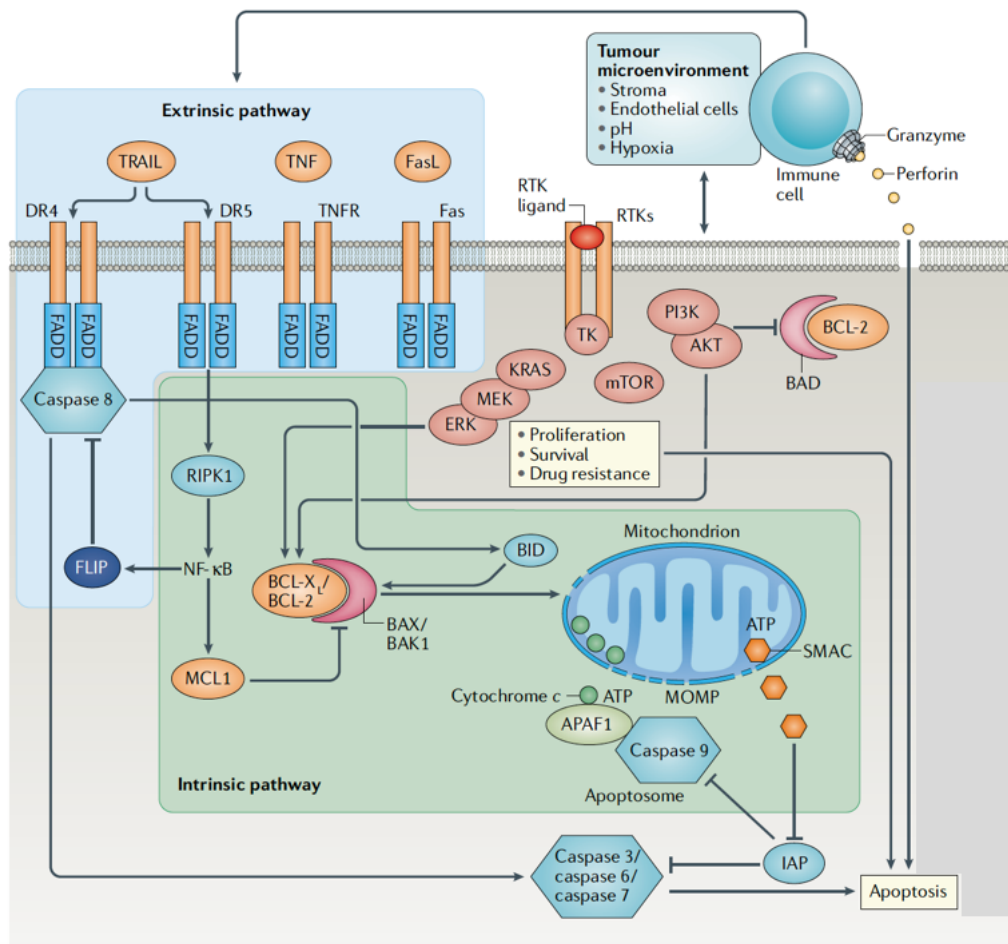
**L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui nécessite une régulation fine. La dérégulation de la machinerie apoptotique constitue une caractéristique cruciale du cancer et concerne à la fois la progression tumorale et la résistance des tumeurs aux thérapies. La plupart des drogues anti-cancer ciblent les voies de signalisation apoptotique des cellules tumorales pour induire leur mort.**

**L'apoptose est un mécanisme complexe** faisant intervenir deux voies principales et de multiples protéines : **la voie dite extrinsèque** impliquant des protéines de la famille des récepteurs de mort « *death receptors* » et **la voie dite intrinsèque** (ou voie mitochondriale) impliquant les protéines de la famille de Bcl-2 (D'Arcy, 2019)(Carneiro and El-Deiry, 2020). Ces deux voies agissent de façon synergique et conduisent à l'activation de caspases effectrices. Par l'intermédiaire des caspases initiateuses (caspases 8 et 10), la voie extrinsèque peut activer la voie intrinsèque via le clivage de BID (**Figure 37**).

La voie extrinsèque est déclenchée par des signaux externes (notamment via l'interaction avec une cellule du système immunitaire) et conduit à l'activation des récepteurs à domaine de mort : FasR (aussi connu sous le nom de CD95), *Tumor Necrosis receptor 1* (TNFR1), des *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1-4* (TRAIL-R1 à TRAIL-R4) (D'Arcy, 2019). L'activation de ces récepteurs entraîne le recrutement de caspases initiateuses qui par auto-clivage vont activer des caspases effectrices (notamment les caspases 3, 6 et 7) (**Figure 37**). Par opposition, la voie intrinsèque est activée par des signaux internes à la cellule et notamment par l'activation de P53 en réponse à des dommages à l'ADN non réparables. L'induction de l'apoptose est la résultante de la surexpression de

**protéines pro-apoptotiques (notamment PUMA (codée par le gène *BBC3*), BIM (codée par le gène *BCL2L1*), BID (codée par le gène *BID*), BAX (codée par le gène *BAX*) et NOXA (codée par le gène *PMAIP1*)) et de la sous-expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 (codée par le gène *BCL2*), Bcl-xl (codée par le gène *BCL2L1*) et Mcl-1 (codée par le gène *MCL1*)) de la famille de Bcl-2 (Figure 37).**

**Figure 37. Représentation des voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.**



D'après Carneiro and El Deiry. Nature Reviews in Clinical Oncology, 2020.

Dans un premier temps, nous avons choisi une approche globale et analysé l'expression de 43 protéines impliquées dans l'apoptose et les voies intrinsèques et extrinsèques avec l'utilisation de membranes de type « arrays », constituées de 43 anticorps dirigés contre des antigènes exprimés par ces protéines de l'apoptose (liste des protéines : Cf Figure 38) (Human apoptosis antibody array, RayBiotech).

**Figure 38. Liste et positionnement des 43 protéines de l'apoptose sur les « Human apoptosis antibody arrays », RayBiotech).**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
Each antibody is spotted in duplicate vertically	1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	BLANK	bad	bax	bcl-2	bcl-w	BID	BIM	Caspase-3	Caspase-8
	2														
	3	CD40 (TNFRSF5)	CD40 Ligand (TNFSF5)	dIAP-2	CytoC	DR6 (TNFRSF21)	Fas (Apo-1)	Fas Ligand (TNFSF6)	BLANK	HSP27	HSP60	HSP70	HTRA2	IGF-1	IGF-2
	4														
	5	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6	IGF-1 R	livin	p21	p27	p53	SMAC	Survivin	TNF RI (TNFRSF1A)
	6														
	7	TNF RII (TNFRSF1B)	TNF alpha	TNF beta	TRAIL R1 (TNFRSF10A)	TRAIL R2 (TNFRSF10B)	TRAIL R3 (TNFRSF10C)	TRAIL R4 (TNFRSF10D)	XIAP	BLANK	BLANK	NEG	NEG	NEG	POS
	8														

Cependant, malgré plusieurs tentatives de mise au point, cette technique s'est révélée non concluante pour déterminer les protéines de l'apoptose impliquées de façon différentielle dans nos lysats de cellules traitées par le JNJ42756493 seul, le RG7388 seul ou la combinaison.

Par conséquent, dans un second temps, **nous avons décidé d'étudier ces mécanismes de l'apoptose par des techniques de qRT-PCR et de WB.** Parmi ces protéines, nous nous sommes donc **focalisés sur les protéines de la voie intrinsèque car p53, cible du RG7388, induit l'apoptose en régulant notamment l'expression et la phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2.** Nous avons donc analysé **certaines protéines de cette famille, les pro-apoptotiques (PUMA, BIM, BID, BAX et NOXA) et les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1).**

A noter que certains inhibiteurs de protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques, en l'occurrence des inhibiteurs de Bcl-xl sont en cours d'études précliniques dans les STS et les sarcomes osseux (ostéosarcomes et chondrosarcomes).

**Nous avons également étudié les protéines suivantes : FOXO3A et FOXM1, pour leurs liens avec les voies des MAP Kinases ERK1/ERK2 et MDM2 et PHLDA3, pour son lien avec les voies PI3K/AKT et P53.** FOXO3A est un gène qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM et son expression est sous la dépendance de la voie des MAP Kinases ERK1/ERK2 et de MDM2 (Yang et al., 2008). FOXM1 est un oncogène favorisant la prolifération cellulaire, régulé positivement notamment par la voie des MAP Kinases ERK1/2 et négativement notamment par P53 ; il est de plus impliqué dans la tumorigenèse de certains sarcomes y compris des LDD (Kelleher and O'Sullivan, 2016). PHLDA3 est un gène suppresseur

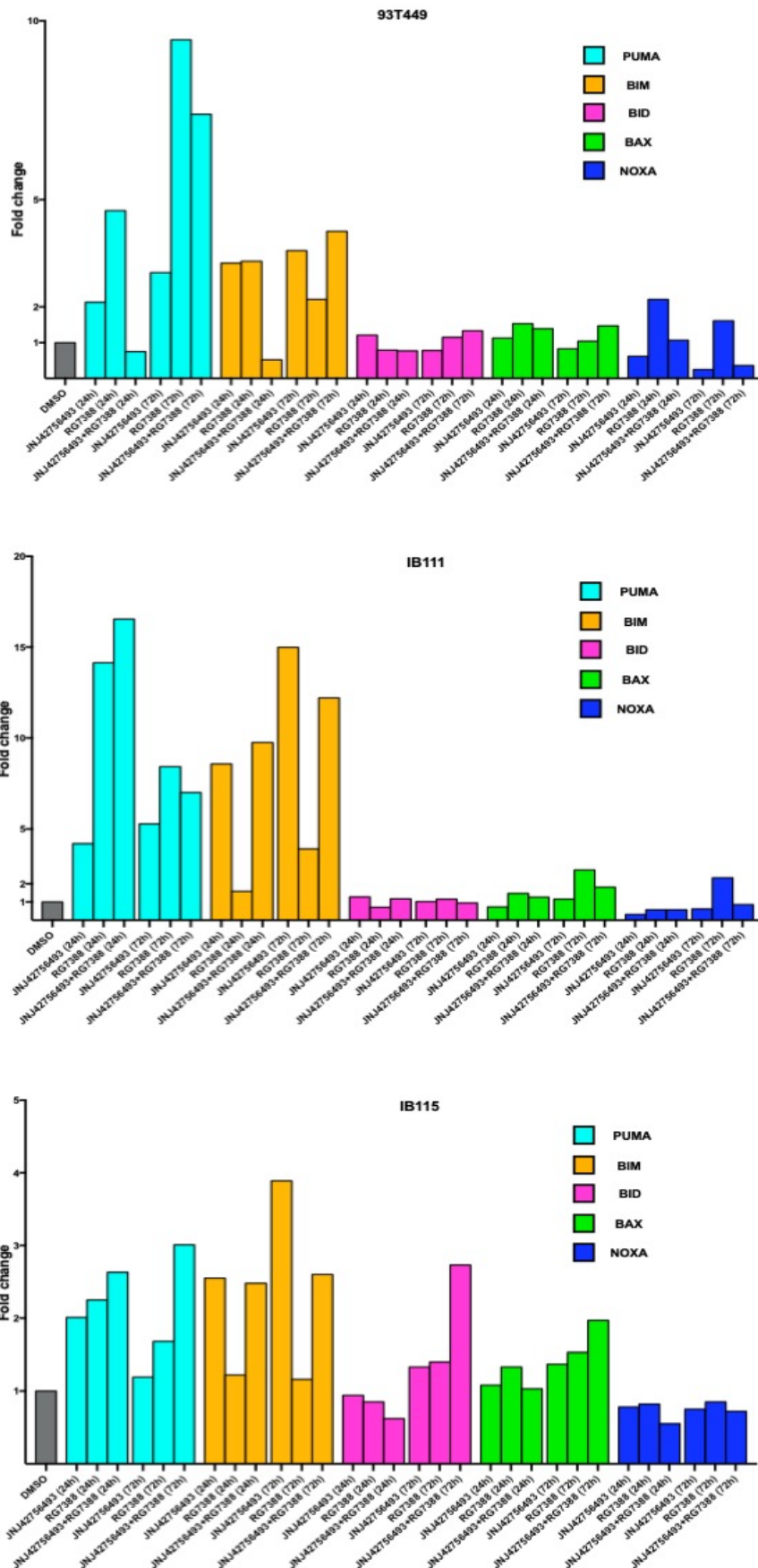
de tumeurs, positivement régulé par P53 ; il agit comme un répresseur d'AKT (Kawase et al., 2009) et serait un biomarqueur de réponse à un inhibiteur de MDM2 (le MK-8242) (Wagner et al., 2017).

Nous avons étudié par qRT-PCR l'expression de l'ARNm de ces gènes et par WB, l'expression de certaines protéines. Les résultats présentés sont encore préliminaires et nécessitent d'être confirmés.

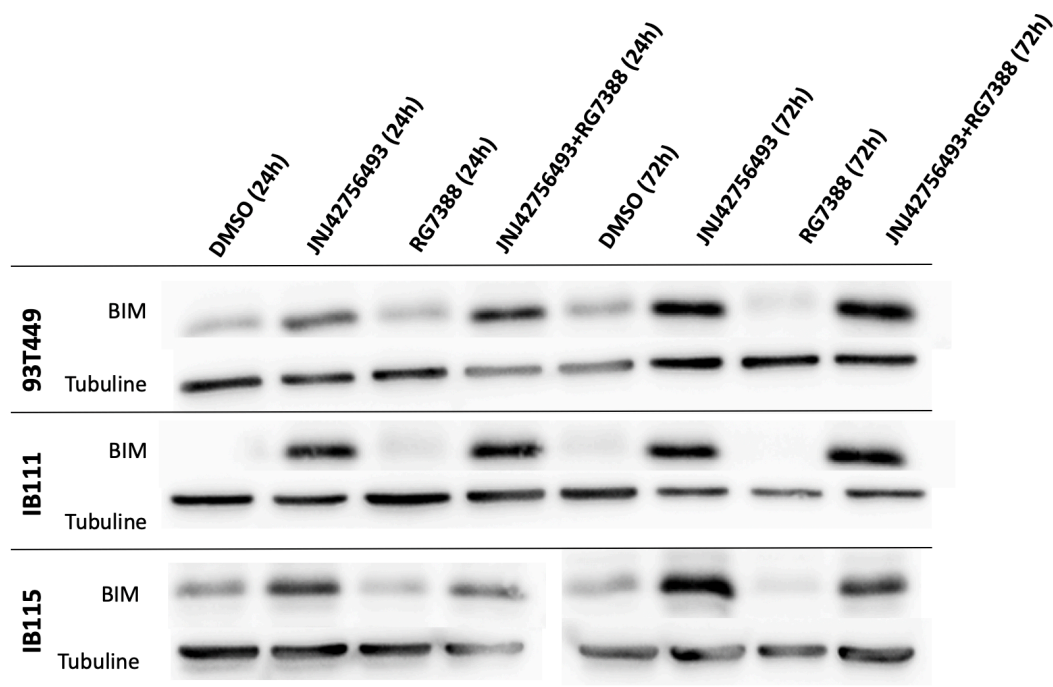
Nos résultats étaient les suivants, à 24h et 72h de traitement par JNJ42756493 seul, RG7388 seul ou en combinaison sur nos 3 lignées cellulaires issues de LBD et LDD :

- Versant pro-apoptotique, l'expression des gènes codant pour Puma et BIM variait de façon significative en fonction des traitements (**Figure 39A**). Notamment pour PUMA, son expression était en nette augmentation dans les cellules de nos trois lignées traitées par JNJ42756493 seul mais surtout par RG7388, seul ou en combinaison. BIM présentait également une importante augmentation d'expression, dans les cellules de nos trois lignées traitées par JNJ42756493 seul ou en combinaison. En revanche l'expression des gènes *BID*, *BAX* et codant pour NOXA, également régulés par P53, ne présentait pas de variation nette. Pour confirmer nos données d'expression d'ARNm, nous avons analysé l'expression des protéines dont l'expression de l'ARNm variait de façon significative. Pour BIM, le profil d'expression protéique était le même que celui observé au niveau ARNm (**Figure 39B**). Après quantification, l'expression de BIM était augmentée d'un facteur 2 à 12 dans les cellules traitées par JNJ42756493 seul ou en combinaison. En revanche pour PUMA, les données d'expression protéique étaient de mauvaise qualité et des ajustements dans la mise au point de l'anticorps sont nécessaires.

Figure 39A. Variations d'expression des gènes pro-apoptotiques après traitement



**Figure 39B. Variations d'expression des protéines pro-apoptotiques après traitement**



- Versant anti-apoptotique, on observait une diminution de l'expression des gènes codant pour Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 de façon plus ou moins marquée dans les cellules issues des lignées 93T449 et IB111 traitées par JNJ42756483 seul ou en combinaison alors que de façon surprenante, l'expression de ces gènes était en augmentation dans les cellules traitées par RG7388 seul (**Figure 40A**). En WB, le même profil d'expression était obtenu pour la protéine Bcl-xl (**Figure 40B**) : à 24h augmentation nette de l'expression de Bcl-xl dans les cellules traitées par RG7388 seul ou en combinaison ; à 72h, diminution de l'expression de Bcl-xl dans les cellules traitées même par RG7388 seul. Cette diminution d'expression de Bcl-xl à 72h pouvait atteindre plus de 75% dans les cellules traitées par JNJ42756493 seul ou en combinaison. En revanche, pour Bcl2 et Mcl-1, la mise au point des anticorps nécessite encore des ajustements. Pour la lignée IB115, au niveau de l'ARNm, les variations d'expression étaient moins nettes et seule l'expression de Bcl-xl était majorée dans les cellules traitées par RG7388 seul ou en combinaison. Ces résultats étaient confirmés par l'analyse protéique de Bcl-xl en WB pour la lignée IB115.



Figure 40A. Variations d'expression des gènes anti-apoptotiques après traitement

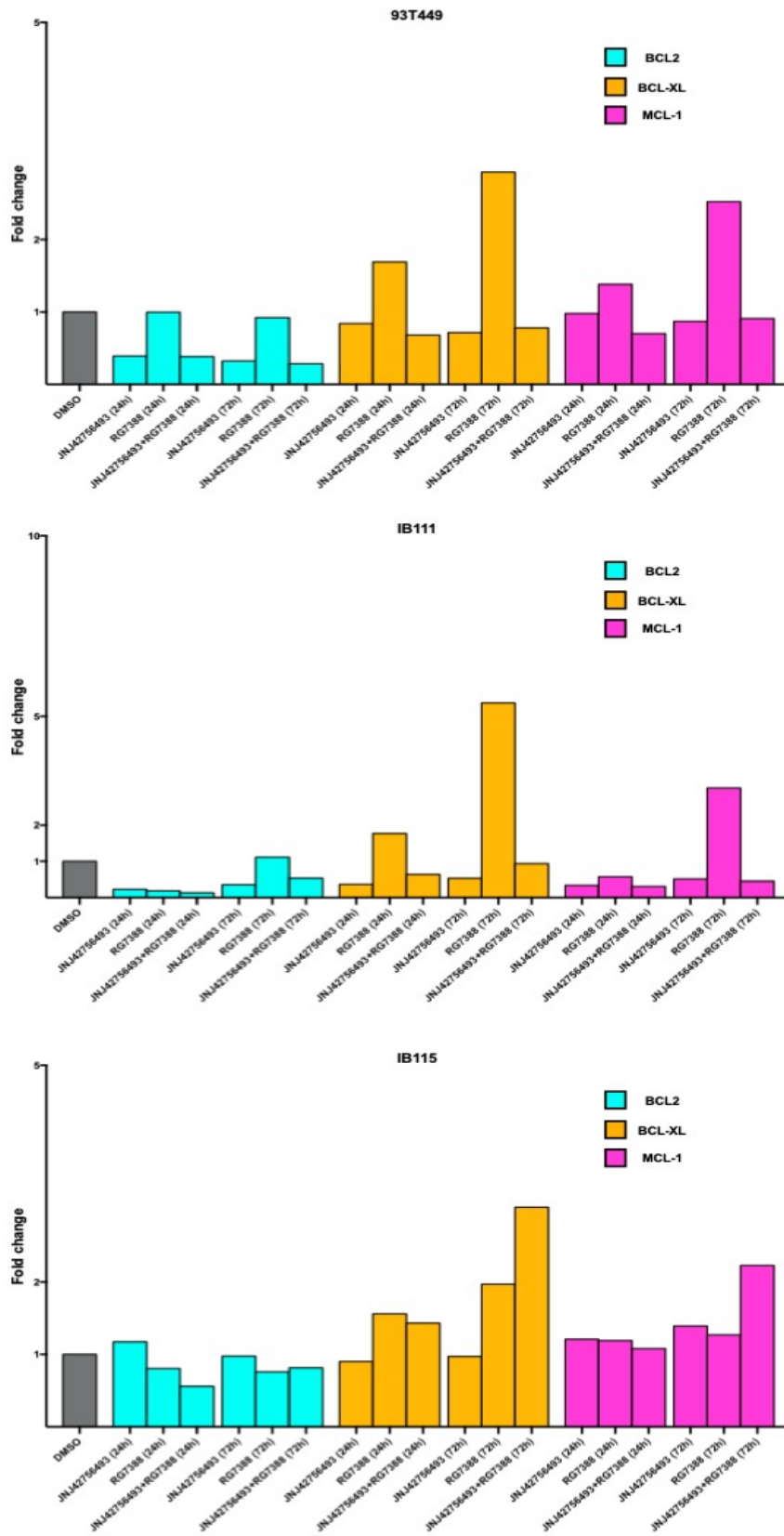
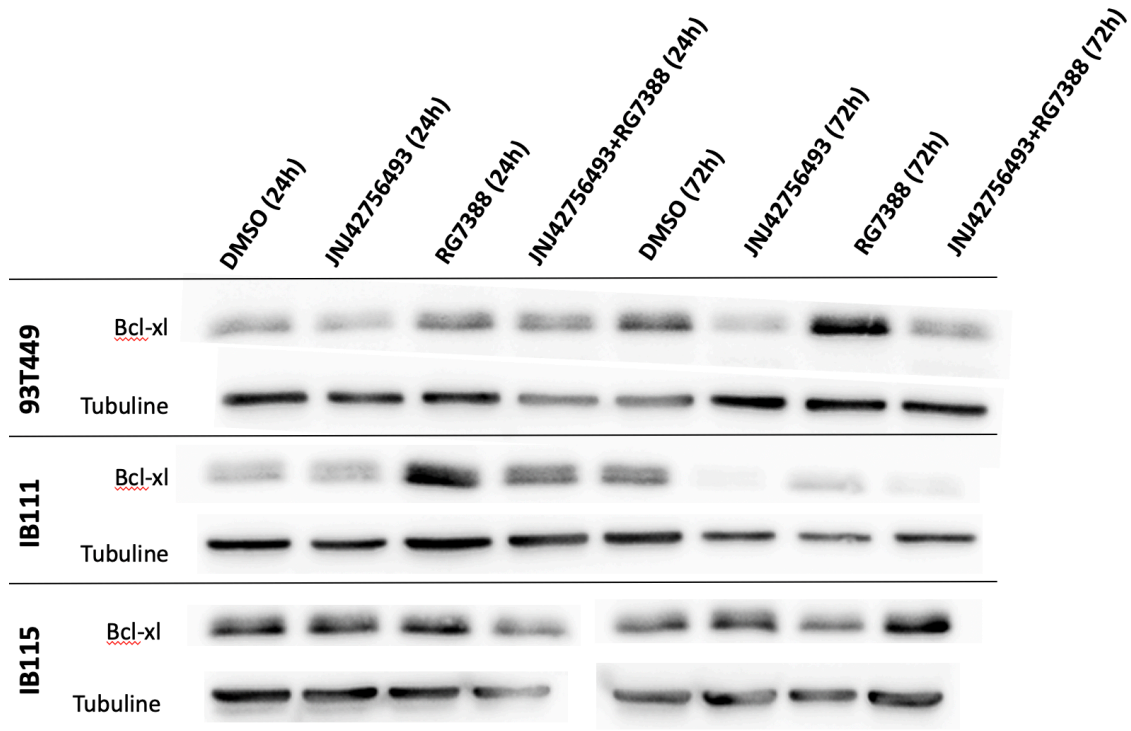


Figure 40B. Variations d'expression des protéines anti-apoptotiques après traitement



- Enfin les variations d'expression des autres gènes d'intérêt étaient les suivantes : l'expression de *FOXM1* était fortement diminuée par les traitements, seuls ou en combinaison surtout dans les cellules issues des lignées 93T449 et IB111 (**Figure 41A**) ; l'expression de *PHLDA3* était augmentée par les traitements dans nos trois lignées ; l'expression de *FOXO3A* ne variait pas de façon significative (en revanche, il serait intéressant d'étudier son niveau de phosphorylation en WB). Au niveau protéique, seule l'expression de FOXM1 a été analysée pour l'instant avec les mêmes profils d'expression (**Figure 41B**) : son expression diminuait de 40% à 90% selon les lignées, après quantification.

Figure 41A. Variations d'expression d'autres gènes d'intérêt dans nos lignées après traitement

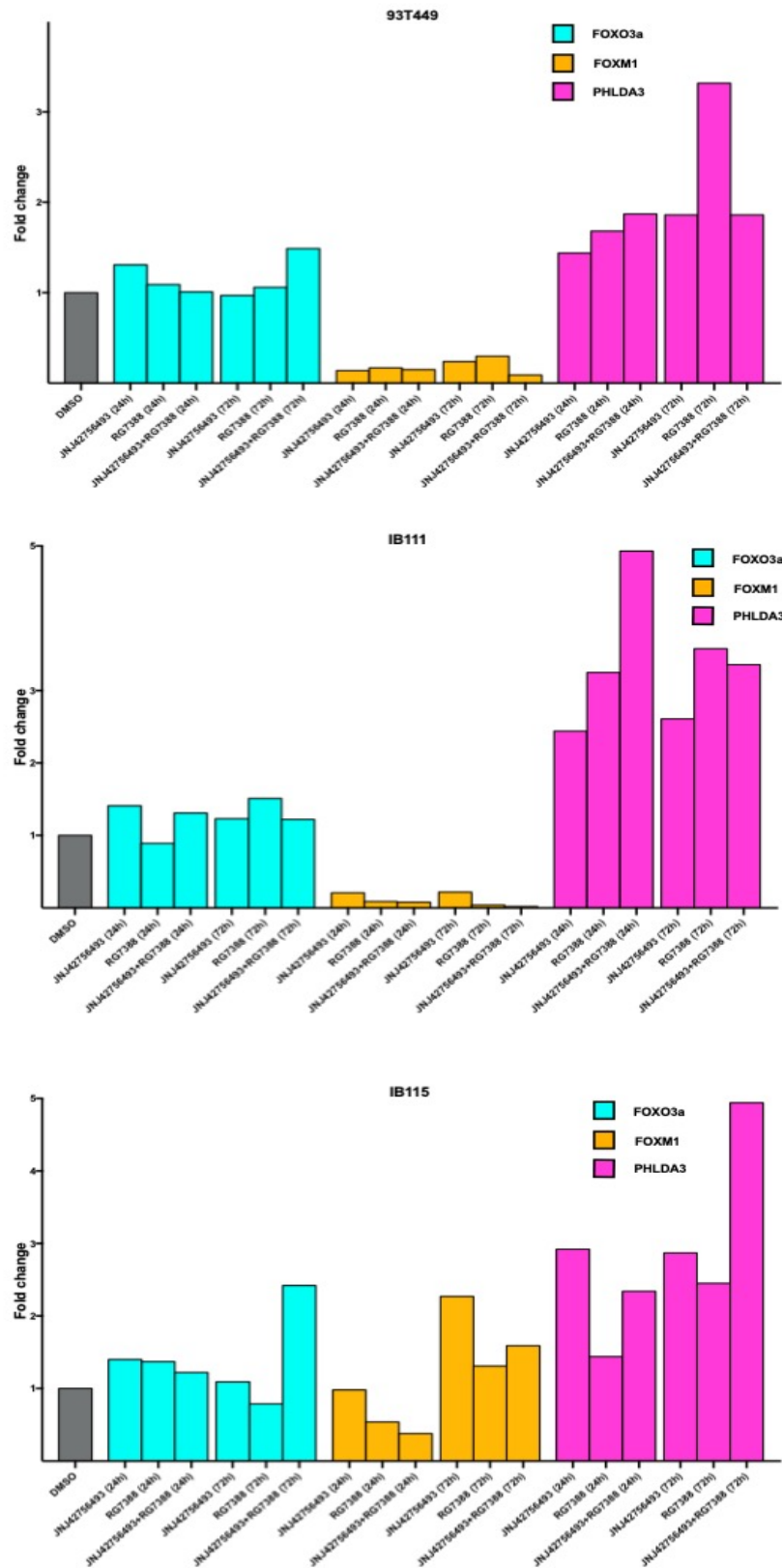
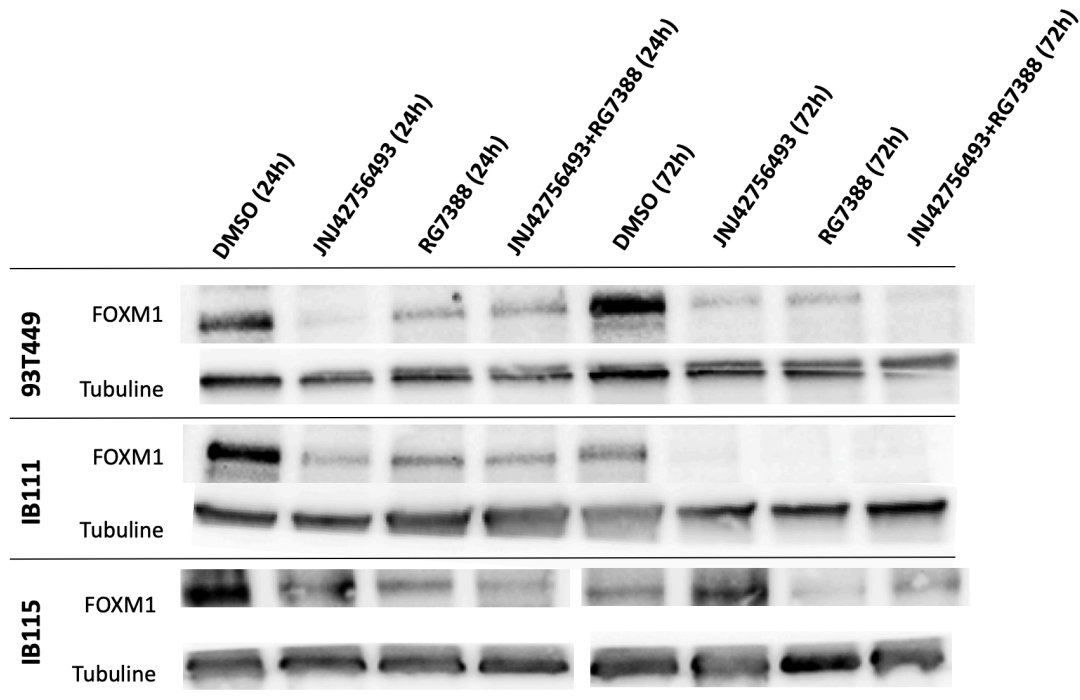


Figure 41B. Variations d'expression des protéines d'intérêt après traitement



En conclusion, concernant nos résultats préliminaires sur les mécanismes d'apoptose, nous avons observé des effets attendus :

- Le traitement par RG7388 avec pour objectif de restaurer l'effet pro-apoptotique de P53 a eu pour effets une augmentation de l'expression des gènes cibles : *CDKN1A* codant pour la protéine p21, *MDM2* et *TP53* codant pour la protéine p53 (par des boucles de rétrocontrôle), l'augmentation d'expression du gène pro-apoptotique cible *BBC3* codant pour la protéine PUMA et du gène suppresseur de tumeur régulé positivement par P53, *PHLDA3* et la diminution d'expression de *FOXM1*.
- Le traitement par JNJ42756493 avec pour objectif d'inhiber les voies de signalisation en aval des FGFRs (notamment la voie des MAP Kinases ERK1/2 a eu pour effets une augmentation d'expression du gène cible pro-apoptotique *BCL2L11* codant pour la protéine BIM et une diminution du gène *FOXM1*.

De plus, nos résultats sont concordants avec les données de la littérature, proposant BIM et PUMA comme les deux acteurs majeurs de l'apoptose induite par la combinaison d'un anti-MEK (en amont des MAP Kinases ERK1/2) et d'un antagoniste de MDM2 (la nutline 3a), dans des lignées cellulaires issues de leucémies aiguës myéloïdes (Zhang et al., 2010).

De nombreuses pistes restent à explorer : les protéines de la famille Bcl-2 sont notamment modulées par la localisation et des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

## I. Principaux résultats de l'étude d'expression

Comme nous l'avons vu en introduction, les données de la littérature sont rares quant à l'implication de la voie de signalisation FGF/FGFR dans les LBD/LDD et se sont plutôt focalisées sur l'amplification récurrente du gène *FRS2*. Or, cibler cette voie dans les LBD/LDD métastatiques nécessite une étude approfondie de ses différents acteurs qui ne peut se cantonner à l'échelle de l'ADN. Les FGFRs étant des RTKs, cibles privilégiées des thérapies ciblées, notre étude d'expression a porté sur des cas tumeurs primaires de LBD/LDD et sur l'expression des quatre FGFRs.

### 1. Expression de FGFR1 et/ou FGFR4 dans un sous-groupe de LBD/LDD

Nous avons réalisé **une analyse exhaustive de l'expression protéique des quatre FGFRs en IHC sur une grande cohorte de 418 cas de LBD/LDD**. Pour collecter un nombre suffisant de cas de LBD/LDD associés aux données cliniques et avoir la puissance statistique nécessaire, **nous avons mis en place une collaboration** entre le Centre Hospitalier Universitaire de Nice et l'Institut Bergonié à Bordeaux, ces deux centres ayant une expertise reconnue dans la prise en charge des sarcomes qui sont, rappelons-le, des tumeurs rares. Dans la mesure où les LDD sont ceux qui présentent un potentiel métastatique et ceux qui nécessitent l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients métastatiques, notre série incluait une majorité de LDD.

**Notre étude est la première à mettre en évidence la surexpression protéique de FGFR1 et/ou FGFR4 dans un sous-groupe de LBD/LDD (environ 30% des cas)**. De plus, dans le cadre d'une collaboration avec F. Bertucci et P. Finetti de l'Institut Paoli Calmettes à Marseille, **nous avons confirmé nos résultats obtenus au niveau protéique par une étude transcriptomique de 276 cas de LBD/LDD issus d'une cohorte de validation**. En effet, dans cette série indépendante issue de données publiques, *FGFR1* ou *FGFR4* était surexprimé dans environ 20% des cas. Ces deux analyses combinées ont permis d'élargir **notre étude d'expression à une série de 694 cas de LBD/LDD**.

**Ces mêmes résultats d'expression sur tumeurs primaires ont été observés sur notre panel de lignées cellulaires, validant leur utilisation pour l'étude fonctionnelle** : deux lignées surexprimaient FGFR1 (93T449 et IB111) et une lignée surexprimait FGFR4 (IB115). Nos données sont en accord avec la littérature : Hanes et al. rapportaient une surexpression de *FGFR1* ou *FGFR4* par analyse transcriptomique sur leurs trois lignées de LDD (Hanes et al., 2019). **De façon intéressante, la**

**lignée la moins sensible au LY2874455 d'après Hanes et al. et notre lignée la moins sensible au JNJ42756493 et au LY2874455 (IB115) étaient dans les deux cas, celles surexprimant FGFR4.**

Toutefois, **il reste à déterminer les mécanismes qui sont à l'origine de cette surexpression protéique.** Cette surexpression observée dans environ 30% des cas ne semble pas résulter d'une altération génomique des *FGFRs* que ce soit une amplification, une mutation ou une translocation. Les CNA étant les anomalies génomiques les plus fréquentes dans les LBD/LDD, nous avons cherché dans un premier temps une amplification des *FGFRs*. D'une part, nos résultats d'analyse pangénomique par CGH-array, technique réalisée en routine diagnostique dans le laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides au CHU de Nice, n'a mis en évidence qu'un seul cas présentant une amplification du gène *FGFR1*, sur 67 cas de LBD/LDD (environ 1% des cas). Nos résultats (non publiés) sont assez proches de ceux publiés dans la littérature. D'après Asano et al. qui ont étudié 56 cas issus de la National Cancer Center BioBank de Tokyo (Japon) et répertoriés des cas issus de données publiques : 50 cas de LDD issus de la base de données du Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) et 58 cas de LDD issus de la base de données du TCGA (The Cancer Genome Atlas), les événements génomiques portant sur les *FGFRs* sont assez rares (Asano et al., 2017). Dans leur série de 56 cas de LBD/LDD analysés par séquençage ciblé avec un Oncopanel incluant les quatre *FGFRs*, deux cas de LDD présentaient une amplification du gène *FGFR3* (3%) et un cas de LDD, une mutation du gène *FGFR1* (2%). De plus, il est important de souligner que cette amplification de *FGFR3* n'aboutissait pas à l'expression de la protéine *FGFR3* étudiée en IHC, dans les deux cas. D'après la base de données du MSKCC, deux cas de LDD étaient amplifiés pour *FGFR3* (4%) et les autres *FGFRs* ne présentaient pas d'anomalie génomique. D'après la base de données du TCGA, trois cas de LDD étaient amplifiés pour *FGFR1* (5%), trois cas de LDD étaient amplifiés pour *FGFR3* (5%) et quatre cas de LDD étaient amplifiés pour *FGFR4* (7%). D'après l'étude de Sanchez-Vega et al. à partir des données du TCGA portant sur 43 cas de LDD, une altération génomique des *FGFRs* (amplification ou mutation) était détectée pour *FGFR1* dans 7 cas (16%), *FGFR3* dans 2 cas (5%) et *FGFR4* dans 7 cas (16%) (Sanchez-Vega et al., 2018). Quant aux translocations impliquant les *FGFRs* dans les LBD/LDD, cela n'a pas été décrit à ce jour.



## 2. Identification de biomarqueurs dans les LBD/LDD

Nos résultats ont mis en évidence que **l'expression de FGFR1 et/ou FGFR4 était un biomarqueur pronostique indépendant en termes de survie globale et de survie sans progression et que la co-expression de FGFR1 + FGFR4 était associée à un plus mauvais pronostic.**

Notre étude pronostique réalisée sur la série de 418 cas étudiés au niveau protéique issus de 358 patients est également renforcée par notre analyse biostatistique portant sur la série de 276 cas étudiés au niveau de l'ARNm, avec des résultats tout à fait concordants.

Si nous avons établi que **l'expression de FGFR1 et FGFR4 était un biomarqueur pronostique, nos données suggèrent également un rôle pour l'expression de FGFR1 et FGFR4 en tant que biomarqueur théranostique**, prédictif d'une réponse à une thérapie ciblant les FGFRs. En effet, les résultats obtenus chez ce patient porteur d'un LDD métastatique réfractaire surexprimant FGFR1 et FGFR4 et traité par erdafitinib sont très encourageants et méritent d'être **confirmés par des essais cliniques avec une stratification des patients inclus en fonction du statut du biomarqueur FGFR1 ou FGFR4. Cela est tout à fait envisageable en routine, où il est nécessaire de disposer d'un biomarqueur fiable, valide et reproductible. Le biomarqueur que nous proposons est de niveau « protéique » analysé par une technique d'IHC, technique fiable, reproductible et robuste, réalisable à partir d'un échantillon fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE). De plus, comme souligné par Hierro et al., le niveau « protéique » analysé par IHC correspond au plus haut niveau de prédiction pour cibler un FGFR, en comparaison des analyses portant sur l'ARNm ou l'ADN (Hierro et al., 2015).**

En outre, la pertinence de l'analyse de l'expression protéique de FGFR1 et FGFR4 dans les LBD/LDD par rapport à l'amplification du gène *FRS2* se vérifie pour d'autres raisons. Tout d'abord, alors que nos données d'analyse par CGH-array sur 67 cas de LBD/LDD ont confirmé l'amplification récurrente de *FRS2* (96%), et que dans notre panel de lignées issues de LBD/LDD, nous avons détecté une surexpression du gène *FRS2*, celle-ci n'était pas corrélée à l'expression protéique de *FRS2* étudiée par WB. Ces résultats, en accord avec les données de la littérature (Wang et al., 2011)(Zhang et al., 2013), suggèrent des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de *FRS2* dans les LBD/LDD. De plus, dans une étude récente, Hanes et al. ont mis en évidence que des lignées issues de LDD, avec un même niveau d'expression de *FRS2*, présentaient une sensibilité différente à l'inhibiteur pan-FGFR testé, le LY2874455 (Hanes et al., 2019). Enfin, à partir de notre analyse biostatistique des 276 cas de LBD/LDD, l'expression du gène *FRS2* n'était pas associée à un mauvais pronostic.

Si FRS2 n'est pas un biomarqueur convaincant, la piste de l'expression des FGFs mérite, elle, d'être explorée. En effet, comme cela a été rappelé dans le chapitre sur la dérégulation de la voie de signalisation FGF/FGFR, cette dérégulation peut être liée à une expression anormale de FGFs. A partir des données d'expression sur les 276 cas de LBD/LDD, les FGFs surexprimés (par rapport au tissu adipeux normal, par ordre décroissant de surexpression) étaient *FGF7*, *FGF10*, *FGF14*, *FGF5*, *FGF12* et *FGF19*. Seule la surexpression de *FGF12* était associée à un mauvais pronostic. Rappelons que FGF12 fait partie de la sous-famille des « homologues FGF » intracellulaires, non sécrétés qui ne se lient pas aux FGFR. Nous avons également étudié certains FGFs par qRT-PCR, dans nos lignées cellulaires et dans des tumeurs primaires (16 cas de LBD et 7 cas de LDD) : *FGF1*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF7*, *FGF12*, *FGF18*, *FGF19*, *FGF21* et *FGF23*. Seule l'expression de *FGF18* était significativement augmentée, en comparaison avec le tissu adipeux non tumoral, dans quelques cas de LBD. Dans l'étude de Hanes et al. l'expression transcriptomique des FGFs a également été étudiée sur les trois lignées issues de LDD, mettant en évidence une surexpression légère à modérée de *FGF2*, *FGF11*, *FGF7*, *FGF5* ou *FGF1* (Hanes et al., 2019). En cas de mise en évidence de la surexpression récurrente d'un FGF sécrété, il pourrait être intéressant d'étudier l'expression des FGFs dans le sérum des patients par technique ELISA et discuter l'intérêt de cette expression en tant que biomarqueur.

## II. Principaux résultats de l'étude fonctionnelle

### 1. Implication de la voie de signalisation FGF/FGFR dans la tumorigenèse des LBD/LDD.

**Nous avons démontré le rôle fonctionnel de la voie de signalisation FGF/FGFR dans les LBD/LDD, *in vitro*.**

**A l'état basal**, nous avons détecté la phosphorylation de FGFR dans nos lignées, témoignant de l'activation constitutive de la voie de signalisation FGF/FGFR. De plus, **la stimulation de la voie par l'ajout d'un ligand pan-FGFR (FGF1)** entraînait un haut niveau de phosphorylation de la protéine FRS2, indiquant que la voie FGF/FGFR était fonctionnelle dans nos lignées.

**La suite de notre étude fonctionnelle a porté sur une approche pharmacologique testant deux inhibiteurs de FGFRs : le JNJ42756493 et le LY2874455.** Nos investigations ont porté sur les effets

du JNJ42756493 le premier ITK anti-FGFR à avoir obtenu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) dans le traitement des carcinomes urothéliaux avec altération des FGFRs. Nous avons démontré les effets de cet inhibiteur sur la diminution de la viabilité cellulaire, sur l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et sur l'induction de l'apoptose. Le JNJ42756493 présentait également un fort effet inhibiteur sur la phosphorylation des MAP Kinases ERK1/2 suggérant que la voie FGF/FGFR joue un rôle majeur dans l'activation de ERK1/2 dans les LBD/LDD. Enfin l'effet du JNJ42756493 sur la survie cellulaire était encore plus important que son effet sur la prolifération si l'on compare les concentrations nécessaires pour obtenir un effet inhibiteur de 50% qui étaient de l'ordre du nanomolaire pour la survie alors qu'elles étaient de l'ordre du micromolaire pour la prolifération. C'est d'ailleurs une des raisons qui nous a conduits à étudier les effets d'un autre ITK pan-FGFR le LY2874455. En effet, conscients que des valeurs d'IC50 de l'ordre du micromolaire pour la viabilité ne témoignaient pas d'une sensibilité suffisante au JNJ42756493, nous avons poursuivi nos expérimentations avec le LY2874455 et obtenu des valeurs d'IC50 de l'ordre du nanomolaire pour la viabilité, nettement plus prometteuses. Toutefois, il est important de noter que le LY2874455 qui est classé comme un ITK sélectif pan-FGFR peut tout de même cibler d'autres RTKs, comme le VEGFR2 (avec des valeurs d'IC50 de l'ordre du nanomolaire) ce qui ne permet pas d'exclure que les résultats encourageants observés soient également le reflet d'une inhibition d'autres RTKs (effets off-target). Il nous reste notamment à étudier les effets de cette drogue sur l'apoptose, seule ou en combinaison.

Ces résultats obtenus par une approche pharmacologique testant deux inhibiteurs de FGFRs constituent une première étape dans la mise en évidence de l'implication de la voie FGF/FGFR dans les LBD/LDD. Nous envisageons de compléter notre étude par une approche d'invalidation des FGFRs par utilisation de siRNA (*short interfering RNA*). Cette technique permettrait d'invalider plus « spécifiquement » les FGFRs (essentiellement *FGFR1* et *FGFR4*) et de s'affranchir d'éventuels effets off-target.

**Nos résultats *in vitro* ont également été confirmés *in vivo* sur modèles murins à partir de xénogreffes par injection de cellules de la lignée IB115.** Toutefois, ce modèle connaît des limites. En effet, pour cette première étude *in vivo* nous avons sélectionné la lignée IB115 car nos collaborateurs avaient démontré que cette lignée induisait la formation de tumeur chez la souris immunodéprimée cependant il s'avère que cette lignée est la moins sensible au JNJ42756493. Dans un premier temps, nous allons débiter une nouvelle expérimentation *in vivo* avec injection des cellules de l'autre lignée LDD de notre panel : IB111 afin de confirmer l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* par le JNJ42756493 et par la combinaison JNJ42756493 + RG7388. La lignée 93T449 ne représente pas un

bon modèle car il s'agit d'une lignée issue de LBD et son potentiel à induire la formation de tumeur chez les souris est incertain. De plus, nos résultats *in vitro* très prometteurs avec le LY2874455 nous incitent à étudier les effets de cet autre inhibiteur pan-FGFR sur la croissance tumorale *in vivo*. Enfin, nous avons envisagé de confirmer nos résultats sur un modèle de PDX mais ceci s'est révélé être trop onéreux pour l'instant.

## 2. Synergie de la combinaison associant un antagoniste de MDM2 et un inhibiteur pan-FGFR

**Dans la mesure où l'utilisation d'une thérapie ciblée conduit de façon quasi-systématique à l'émergence de phénomènes de résistance, nous avons étudié d'emblée les effets de combinaisons de drogues.**

**Dans un premier temps, une combinaison qui paraissait pertinente était celle associant un inhibiteur pan-FGFR et un antagoniste de la voie PI3K/AKT/mTOR.** En effet, étant donné que l'inhibition de la phosphorylation d'AKT dans les cellules traitées par JNJ42756493 seul était inconstante et puisque l'implication de cette voie avait été rapportée dans la tumorigenèse des LBD/LDD (Laroche et al., 2017), nous avons testé *in vitro* les effets de cette combinaison (JNJ42756493 + BEZ235, un inhibiteur spécifique de PI3K et mTOR). Comme attendu, le BEZ235 seul inhibait fortement la phosphorylation d'AKT mais l'effet de la combinaison n'était pas synergique dans les lignées issues de LDD (IB111 et IB115) voire même antagoniste sur la viabilité cellulaire.

**Dans un deuxième temps, nous avons testé une autre combinaison, un inhibiteur pan-FGFR et un antagoniste de la liaison MDM2-p53, le RG7388.** Le choix de cette association résidait dans le fait que l'amplification et la surexpression de MDM2 caractérise 100% des LBD/LDD et que le RG7388 exerce une activité anti-tumorale sur les lignées issues de LDD (Laroche-Clary et al., 2017). Nous avons mis en évidence un effet synergique très significatif sur tous les paramètres anti-tumorigéniques testés dans nos trois lignées cellulaires. Nous avons notamment observé des effets très marqués sur l'induction de l'apoptose laissant entrevoir des pistes à explorer. Pour l'instant, nos résultats préliminaires n'ont pas encore permis d'élucider les mécanismes à l'origine de cette apoptose massive. D'autres pistes restent à explorer pour comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de

ces protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl2 et notamment leur niveau de phosphorylation, leur localisation ou encore leurs interactions qui sont susceptibles de moduler leur expression. Par ailleurs, nous pourrions utiliser une approche globale telle que celle des puces Affymetrix pour identifier les gènes dont l'expression est modifiée de façon spécifique par la combinaison JNJ42756493 + RG7388.

Nous poursuivons nos efforts dans cette voie car l'apoptose et plus particulièrement les membres de la famille Bcl2 représentent une cible thérapeutique intéressante. Notamment, certains inhibiteurs comme le Venetoclax, un inhibiteur sélectif de la protéine anti-apoptotique Bcl2 a déjà l'AMM (Autorisation de Mise sur la Marché) dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques. De plus, des combinaisons associant inhibiteurs de Bcl2 et ITKs (NCT02520778 ; NCT02143401) ou inhibiteurs de Bcl2 et anti-MEK (NCT02079740) sont en cours de développement clinique.

### III. Perspectives

Comme nous venons de le discuter, nous avons pour projets de poursuivre nos investigations pour une meilleure compréhension des mécanismes d'apoptose.

**D'autres perspectives sont également à l'étude. Tout d'abord, l'étude des mécanismes de compensation via l'activation d'autres RTKs.** Pour cela, nous souhaitons utiliser une méthode globale à l'aide de phosphoRTK-arrays (Proteome Profiler Array, kit Human phospho-RTK array, R&D Systems). Cette technique permet l'analyse du niveau de phosphorylation de 49 RTKs. Nous avons déjà réalisé cette technique sur nos trois lignées issues de LBD/LDD et identifié des RTKs phosphorylés. Toutefois, le principal écueil de cette technique est la détection de la phosphorylation des FGFRs, bien présents sur la puce, mais dont la phosphorylation est difficile à mettre en évidence. Hormis ce problème de mise au point, nous avons identifié de façon très nette, la phosphorylation des RTKs suivants : EGFR, AXL, IGF1R et MET, en accord avec les données de la littérature (Peng et al., 2011)(Kanojia et al., 2015)(May et al., 2015). La prochaine étape est l'étude de RTKs activés par compensation après traitement de nos lignées par 72h de JNJ42756493 seul ou en association avec le RG7388. Par la suite,

il serait bien sûr intéressant de générer des lignées résistantes aux inhibiteurs pan-FGFRs et d'identifier les voies de signalisation activées dans ce contexte.

Pour compléter notre approche *in vitro* et tenir compte du micro-environnement tumoral (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules inflammatoires) qui joue un rôle important dans la tumorigenèse, nous souhaitons poursuivre nos expérimentations avec des modèles de cultures tridimensionnelles (3D) de type sphéroïdes. Les sphéroïdes correspondent à des agrégats de cellules dont la croissance est tridimensionnelle, en suspension, en matrigel. Ce modèle permettrait de mieux appréhender les interactions entre la tumeur et son micro-environnement (et notamment pour ce qui nous intéresse, la sécrétion paracrine de FGFs), la néo-angiogenèse tumorale ou encore les interactions avec les cellules du système immunitaire.

Ce dernier point, les interactions entre la tumeur et les cellules du système immunitaire, nous paraît particulièrement intéressant. En effet, une des perspectives est d'étudier le micro-environnement immunitaire et inflammatoire des LBD/LDD.

En effet, il semble qu'un sous-groupe de patients atteint de LBD/LDD pourrait bénéficier d'une immunothérapie. Un des biomarqueurs prédictif de réponse aux anti-PD1 (pembrolizumab, essai SARC028), associé à un meilleur pronostic, est la richesse tumorale en structures lymphoïdes tertiaires, riches en lymphocytes B (Sautès-Fridman et al., 2019) (Petitprez et al., 2020). Ces données d'expression analysées à partir de 608 cas de STS (incluant LDD, UPS et LMS) nécessitent d'être confirmées sur coupes histologiques et analyse protéique par IHC sur une large série de LBD/LDD. Si ces résultats sont validés et effectivement prédictifs de réponse à l'immunothérapie pour les LBD/LDD, cela ouvrirait des perspectives thérapeutiques, notamment en vue d'une combinaison TKI pan-FGFR et immunothérapie.

## IV. Conclusions

En conclusion, le développement de traitements efficaces et bien tolérés pour les patients atteints de LDD avancés ou métastatiques est toujours à l'étude.

Les LDD étant des tumeurs présentant un haut niveau d'expression de MDM2, la piste des antagonistes de MDM2 et notamment celle des nutlines paraît intéressante. Cependant, les rares essais cliniques menés jusqu'à présent ont mis en évidence que seule une minorité de patients atteints de LDD étaient répondeurs, soulevant le problème de l'identification de biomarqueurs théranostiques.

De plus, les phénomènes de compensation et d'échappement mis en œuvre par les cellules tumorales nécessitent souvent le recours à des combinaisons de thérapies pour obtenir des effets anti-tumoraux synergiques tout en évitant l'addition de leurs toxicités.

Dans la mesure où les inhibiteurs de FGFRs présentent des toxicités acceptables, la combinaison que nous proposons, un inhibiteur de FGFR associé à un antagoniste de MDM2 de la classe des nutlines, nous semble être une piste pertinente. Si nos résultats sont confirmés par d'autres études précliniques, nos données pourront être transférées dans le cadre d'essais cliniques de phase précoce.

## Références

- Asano, N., Yoshida, A., Mitani, S., Kobayashi, E., Shiotani, B., Komiyama, M., Fujimoto, H., Chuman, H., Morioka, H., Matsumoto, M., et al. (2017). Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget* *8*, 12941–12952.
- Azam, M., and Daley, G.Q. (2006). Anticipating clinical resistance to target-directed agents: the BCR-ABL paradigm. *Mol. Diagn. Ther.* *10*, 67–76.
- Babina, I.S., and Turner, N.C. (2017). Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 318–332.
- Barretina, J., Taylor, B.S., Banerji, S., Ramos, A.H., Lagos-Quintana, M., Decarolis, P.L., Shah, K., Socci, N.D., Weir, B.A., Ho, A., et al. (2010a). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat. Genet.* *42*, 715–721.
- Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 235–253.
- Belov, A.A., and Mohammadi, M. (2013). Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Bill, K.L.J., Garnett, J., Ma, X., May, C.D., Bolshakov, S., Lazar, A.J., Lev, D.C., and Pollock, R.E. (2015). The hepatocyte growth factor receptor as a potential therapeutic target for dedifferentiated liposarcoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *95*, 951–961.
- Bill, K.L.J., Garnett, J., Meaux, I., Ma, X., Creighton, C.J., Bolshakov, S., Barriere, C., Debussche, L., Lazar, A.J., Prudner, B.C., et al. (2016a). SAR405838: A Novel and Potent Inhibitor of the MDM2:p53 Axis for the Treatment of Dedifferentiated Liposarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 1150–1160.
- Bill, K.L.J., Casadei, L., Prudner, B.C., Iwenofu, H., Strohecker, A.M., and Pollock, R.E. (2016b). Liposarcoma: molecular targets and therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 3711–3718.
- Bonvalot, S., Gronchi, A., Le Pechoux, C., Swallow, C.J., Strauss, D.C., Meeus, P., van Coevorden, F., Stoldt, S., Stoeckle, E., Rutkowski, P., et al. (2019). STRASS (EORTC 62092): A phase III randomized study of preoperative radiotherapy plus surgery versus surgery alone for patients with retroperitoneal sarcoma. *J. Clin. Oncol.* *37*, 11001–11001.
- Bullock, A.N., and Fersht, A.R. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* *1*, 68–76.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2017). Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* *171*, 950-965.e28.
- Carneiro, B.A., and El-Deiry, W.S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *17*, 395–417.
- Chell, V., Balmano, K., Little, A.S., Wilson, M., Andrews, S., Blockley, L., Hampson, M., Gavine, P.R., and Cook, S.J. (2013). Tumour cell responses to new fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and identification of a gatekeeper mutation in FGFR3 as a mechanism of acquired resistance. *Oncogene* *32*, 3059–3070.
- Cortés-Ciriano, I., Lee, J.J.-K., Xi, R., Jain, D., Jung, Y.L., Yang, L., Gordenin, D., Klimczak, L.J., Zhang, C.-Z., Pellman, D.S., et al. (2020). Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* *52*, 331–341.
- Dadone, B., Refae, S., Lemarié-Delaunay, C., Bianchini, L., and Pedeutour, F. (2015). Molecular cytogenetics of pediatric adipocytic tumors. *Cancer Genet.* *208*, 469–481.



Dadone-Montaudié, B., Burel-Vandenbos, F., Soler, C., Rosello, O., Boyer, C., Fabas, T., Bianchini, L., and Pedeutour, F. (2019). Double minute chromosomes harboring MDM2 amplification in a pediatric atypical lipomatous tumor. *Genes. Chromosomes Cancer* 58, 673–679.

D’Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592.

Dei Tos AP and Pedeutour F. Atypical lipomatous tumour. In *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*, (Lyon: IARC), pp. 33–36.

Dei Tos AP, Marino-Enriquez A, and Pedeutour F. Dedifferentiated liposarcoma. In *Soft Tissue and Bone Tumours*, (Lyon: IARC), pp. 39–41.

Demetri, G.D., von Mehren, M., Jones, R.L., Hensley, M.L., Schuetze, S.M., Staddon, A., Milhem, M., Elias, A., Ganjoo, K., Tawbi, H., et al. (2016). Efficacy and Safety of Trabectedin or Dacarbazine for Metastatic Liposarcoma or Leiomyosarcoma After Failure of Conventional Chemotherapy: Results of a Phase III Randomized Multicenter Clinical Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 786–793.

Demetri, G.D., Schöffski, P., Grignani, G., Blay, J.-Y., Maki, R.G., Van Tine, B.A., Alcindor, T., Jones, R.L., D’Adamo, D.R., Guo, M., et al. (2017). Activity of Eribulin in Patients With Advanced Liposarcoma Demonstrated in a Subgroup Analysis From a Randomized Phase III Study of Eribulin Versus Dacarbazine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 3433–3439.

Dickson, M.A., Schwartz, G.K., Keohan, M.L., D’Angelo, S.P., Gounder, M.M., Chi, P., Antonescu, C.R., Landa, J., Qin, L.-X., Crago, A.M., et al. (2016). Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2, 937–940.

Dieci, M.V., Arnedos, M., Andre, F., and Soria, J.C. (2013). Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov.* 3, 264–279.

Ding, Q., Zhang, Z., Liu, J.-J., Jiang, N., Zhang, J., Ross, T.M., Chu, X.-J., Bartkovitz, D., Podlaski, F., Janson, C., et al. (2013). Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J. Med. Chem.* 56, 5979–5983.

Dudka, A.A., Sweet, S.M.M., and Heath, J.K. (2010). Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res.* 70, 3391–3401.

Furdui, C.M., Lew, E.D., Schlessinger, J., and Anderson, K.S. (2006). Autophosphorylation of FGFR1 Kinase Is Mediated by a Sequential and Precisely Ordered Reaction. *Mol. Cell* 21, 711–717.

Garsed, D.W., Marshall, O.J., Corbin, V.D.A., Hsu, A., Di Stefano, L., Schröder, J., Li, J., Feng, Z.-P., Kim, B.W., Kowarsky, M., et al. (2014). The architecture and evolution of cancer neochromosomes. *Cancer Cell* 26, 653–667.

Goetz, R., Ohnishi, M., Ding, X., Kurosu, H., Wang, L., Akiyoshi, J., Ma, J., Gai, W., Sidis, Y., Pitteloud, N., et al. (2012). Klotho coreceptors inhibit signaling by paracrine fibroblast growth factor 8 subfamily ligands. *Mol. Cell Biol.* 32, 1944–1954.

Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., and Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876–880.

Gotoh, N. (2008). Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci.* 99, 1319–1325.

van der Graaf, W.T.A., Blay, J.-Y., Chawla, S.P., Kim, D.-W., Bui-Nguyen, B., Casali, P.G., Schöffski, P., Aglietta, M., Staddon, A.P., Beppu, Y., et al. (2012). Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 379, 1879–1886.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153–158.

- Hallinan, N., Finn, S., Cuffe, S., Rafee, S., O'Byrne, K., and Gately, K. (2016). Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treat. Rev.* *46*, 51–62.
- Hanes, R., Munthe, E., Grad, I., Han, J., Karlsen, I., McCormack, E., Meza-Zepeda, L.A., Stratford, E.W., and Myklebost, O. (2019). Preclinical Evaluation of the Pan-FGFR Inhibitor LY2874455 in FRS2-Amplified Liposarcoma. *Cells* *8*.
- Haugsten, E.M., Sørensen, V., Brech, A., Olsnes, S., and Wesche, J. (2005). Different intracellular trafficking of FGF1 endocytosed by the four homologous FGF receptors. *J. Cell Sci.* *118*, 3869–3881.
- Helsten, T., Schwaederle, M., and Kurzrock, R. (2015). Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biological and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* *34*, 479–496.
- Helsten, T., Elkin, S., Arthur, E., Tomson, B.N., Carter, J., and Kurzrock, R. (2016). The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 259–267.
- Hierro, C., Rodon, J., and Tabernero, J. (2015). Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor/FGF Inhibitors: Novel Targets and Strategies for Optimization of Response of Solid Tumors. *Semin. Oncol.* *42*, 801–819.
- Hirata, M., Asano, N., Katayama, K., Yoshida, A., Tsuda, Y., Sekimizu, M., Mitani, S., Kobayashi, E., Komiyama, M., Fujimoto, H., et al. (2019). Integrated exome and RNA sequencing of dedifferentiated liposarcoma. *Nat. Commun.* *10*, 5683.
- Infante, J.R., Cassier, P.A., Gerecitano, J.F., Witteveen, P.O., Chugh, R., Ribrag, V., Chakraborty, A., Matano, A., Dobson, J.R., Crystal, A.S., et al. (2016). A Phase I Study of the Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) in Patients with Advanced Solid Tumors and Lymphomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 5696–5705.
- Italiano, A., Bianchini, L., Keslair, F., Bonnafous, S., Cardot-Leccia, N., Coindre, J.-M., Dumollard, J.-M., Hofman, P., Leroux, A., Mainguéné, C., et al. (2008). HMGGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int. J. Cancer* *122*, 2233–2241.
- Italiano, A., Maire, G., Sirvent, N., Nuin, P.A.S., Keslair, F., Foa, C., Louis, C., Aurias, A., and Pedeutour, F. (2009). Variability of origin for the neocentromeric sequences in anaphoid supernumerary marker chromosomes of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Lett.* *273*, 323–330.
- Johnson, D.E., and Williams, L.T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* *60*, 1–41.
- Johnson, D.E., Lu, J., Chen, H., Werner, S., and Williams, L.T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 4627–4634.
- Kalinina, J., Dutta, K., Ilghari, D., Beenken, A., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Cowburn, D., and Mohammadi, M. (2012). The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *20*, 77–88.
- Kanojia, D., Nagata, Y., Garg, M., Lee, D.H., Sato, A., Yoshida, K., Sato, Y., Sanada, M., Mayakonda, A., Bartenhagen, C., et al. (2015). Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* *6*, 42429–42444.
- Kanojia, D., Garg, M., Martinez, J., M T, A., Luty, S.B., Doan, N.B., Said, J.W., Forscher, C., Tyner, J.W., and Koeffler, H.P. (2017). Kinase profiling of liposarcomas using RNAi and drug screening assays identified druggable targets. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* *10*, 173.
- Karavasilis, V., Seddon, B.M., Ashley, S., Al-Muderis, O., Fisher, C., and Judson, I. (2008). Significant clinical benefit of first-line palliative chemotherapy in advanced soft-tissue sarcoma. *Cancer* *112*, 1585–1591.

- Katoh, M. (2016a). FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). *Int. J. Mol. Med.* *38*, 3–15.
- Katoh, M. (2016b). Therapeutics Targeting FGF Signaling Network in Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 1081–1096.
- Katoh, M. (2019). Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *16*, 105–122.
- Kawase, T., Ohki, R., Shibata, T., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Inazawa, J., Ohta, T., Ichikawa, H., Aburatani, H., Tashiro, F., et al. (2009). PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* *136*, 535–550.
- Kelleher, F.C., and O’Sullivan, H. (2016). FOXM1 in sarcoma: role in cell cycle, pluripotency genes and stem cell pathways. *Oncotarget* *7*, 42792–42804.
- Laroche, A., Chaire, V., Algeo, M.-P., Karanian, M., Fourneau, B., and Italiano, A. (2017). MDM2 antagonists synergize with PI3K/mTOR inhibition in well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas. *Oncotarget* *8*, 53968–53977.
- Laroche-Clary, A., Chaire, V., Algeo, M.-P., Derieppe, M.-A., Loarer, F.L., and Italiano, A. (2017). Combined targeting of MDM2 and CDK4 is synergistic in dedifferentiated liposarcomas. *J. Hematol. Oncol.* *10*, 123.
- Lee, A.T.J., Thway, K., Huang, P.H., and Jones, R.L. (2018). Clinical and Molecular Spectrum of Liposarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *36*, 151–159.
- Lew, E.D., Furdui, C.M., Anderson, K.S., and Schlessinger, J. (2009). The Precise Sequence of FGF Receptor Autophosphorylation Is Kinetically Driven and Is Disrupted by Oncogenic Mutations. *Sci. Signal.* *2*, ra6.
- Loriot, Y., Necchi, A., Park, S.H., Garcia-Donas, J., Huddart, R., Burgess, E., Fleming, M., Rezazadeh, A., Mellado, B., Varlamov, S., et al. (2019). Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *381*, 338–348.
- Luo, L.Y., and Hahn, W.C. (2015). Oncogenic Signaling Adaptor Proteins. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* *42*, 521–529.
- Mahmood, S.T., Agresta, S., Vigil, C.E., Zhao, X., Han, G., D’Amato, G., Calitri, C.E., Dean, M., Garrett, C., Schell, M.J., et al. (2011). Phase II study of sunitinib malate, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor in patients with relapsed or refractory soft tissue sarcomas. Focus on three prevalent histologies: leiomyosarcoma, liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Int. J. Cancer* *129*, 1963–1969.
- Malkin D, Ballinger ML, Bond GL, and Thomas DM Li-Fraumeni syndrome. In *Soft Tissue and Bone Tumours*, (Lyon: IARC), pp. 510–513.
- May, C.D., Garnett, J., Ma, X., Landers, S.M., Ingram, D.R., Demicco, E.G., Al Sanna, G.A., Vu, T., Han, L., Zhang, Y., et al. (2015). AXL is a potential therapeutic target in dedifferentiated and pleomorphic liposarcomas. *BMC Cancer* *15*, 901.
- von Mehren, M., Rankin, C., Goldblum, J.R., Demetri, G.D., Bramwell, V., Ryan, C.W., and Borden, E. (2012). Phase 2 Southwest Oncology Group-directed intergroup trial (S0505) of sorafenib in advanced soft tissue sarcomas. *Cancer* *118*, 770–776.
- Mir, O., Brodowicz, T., Italiano, A., Wallet, J., Blay, J.-Y., Bertucci, F., Chevreau, C., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Salas, S., et al. (2016). Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* *17*, 1732–1742.
- Mohammadi, M., Honegger, A.M., Rotin, D., Fischer, R., Bellot, F., Li, W., Dionne, C.A., Jaye, M., Rubinstein, M., and Schlessinger, J. (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Fg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 5068.

- Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., Burgess, W.H., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1996). Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 977.
- Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *4*, 215–266.
- Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* *271*, 15292–15297.
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M.T., Burakova, T., Arman, E., Zimmer, Y., Yayon, A., Givol, D., and Lonai, P. (1993). Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* *158*, 475–486.
- Patnaik, A., Rosen, L.S., Tolaney, S.M., Tolcher, A.W., Goldman, J.W., Gandhi, L., Papadopoulos, K.P., Beeram, M., Rasco, D.W., Hilton, J.F., et al. (2016). Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discov.* *6*, 740–753.
- Pedeutour, F., Suijkerbuijk, R.F., Van Gaal, J., Van de Klundert, W., Coindre, J.M., Van Haelst, A., Collin, F., Huffermann, K., and Turc-Carel, C. (1993). Chromosome 12 origin in rings and giant markers in well-differentiated liposarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *66*, 133–134.
- Pedeutour, F., Suijkerbuijk, R.F., Forus, A., Van Gaal, J., Van de Klundert, W., Coindre, J.M., Nicolo, G., Collin, F., Van Haelst, U., and Huffermann, K. (1994). Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *10*, 85–94.
- Peng, T., Zhang, P., Liu, J., Nguyen, T., Bolshakov, S., Belousov, R., Young, E.D., Wang, X., Brewer, K., López-Terrada, D.H., et al. (2011). An experimental model for the study of well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma; deregulation of targetable tyrosine kinase receptors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *91*, 392–403.
- Perera, T.P.S., Jovcheva, E., Mevellec, L., Vialard, J., De Lange, D., Verhulst, T., Paulussen, C., Van De Ven, K., King, P., Freyne, E., et al. (2017). Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* *16*, 1010–1020.
- Persson, F., Olofsson, A., Sjögren, H., Chebbo, N., Nilsson, B., Stenman, G., and Aman, P. (2008). Characterization of the 12q amplicons by high-resolution, oligonucleotide array CGH and expression analyses of a novel liposarcoma cell line. *Cancer Lett.* *260*, 37–47.
- Petitprez, F., de Reyniès, A., Keung, E.Z., Chen, T.W.-W., Sun, C.-M., Calderaro, J., Jeng, Y.-M., Hsiao, L.-P., Lacroix, L., Bougouïn, A., et al. (2020). B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* *577*, 556–560.
- Ratan, R., and Patel, S.R. (2016). Chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Cancer* *122*, 2952–2960.
- Ray-Coquard, I., Blay, J.-Y., Italiano, A., Le Cesne, A., Penel, N., Zhi, J., Heil, F., Rueger, R., Graves, B., Ding, M., et al. (2012). Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol.* *13*, 1133–1140.
- Roskoski, R. (2020). The role of fibroblast growth factor receptor (FGFR) protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of cancers including those of the urinary bladder. *Pharmacol. Res.* *151*, 104567.
- Ryan, M.R., Sohl, C.D., Luo, B., and Anderson, K.S. (2019). The FGFR1 V561M Gatekeeper Mutation Drives AZD4547 Resistance through STAT3 Activation and EMT. *Mol. Cancer Res. MCR* *17*, 532–543.
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafeina, S., et al. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* *173*, 321-337.e10.

- Sandberg, A.A. (2004). Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 155, 1–24.
- Sato, T., and Gotoh, N. (2009). The FRS2 family of docking/scaffolding adaptor proteins as therapeutic targets of cancer treatment. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 689–700.
- Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W.H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 19, 307–325.
- Sbaraglia M, Dei Tos AP, and Pedeutour F Atypical lipomatous tumour/well-differentiated liposarcoma. In *Soft Tissue and Bone Tumours*, (Lyon: IARC), pp. 36–38.
- Schöffski, P., Chawla, S., Maki, R.G., Italiano, A., Gelderblom, H., Choy, E., Grignani, G., Camargo, V., Bauer, S., Rha, S.Y., et al. (2016). Eribulin versus dacarbazine in previously treated patients with advanced liposarcoma or leiomyosarcoma: a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1629–1637.
- Singer, S., Socci, N.D., Ambrosini, G., Sambol, E., Decarolis, P., Wu, Y., O’Connor, R., Maki, R., Viale, A., Sander, C., et al. (2007). Gene Expression Profiling of Liposarcoma Identifies Distinct Biological Types/Subtypes and Potential Therapeutic Targets in Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma. *Cancer Res.* 67, 6626–6636.
- Strimbu, K., and Tavel, J.A. (2010). What are biomarkers? *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 463–466.
- Tap, W.D., Eilber, F.C., Ginther, C., Dry, S.M., Reese, N., Barzan-Smith, K., Chen, H.-W., Wu, H., Eilber, F.R., Slamon, D.J., et al. (2011). Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization. *Genes. Chromosomes Cancer* 50, 95–112.
- Tawbi, H.A., Burgess, M., Bolejack, V., Van Tine, B.A., Schuetze, S.M., Hu, J., D’Angelo, S., Attia, S., Riedel, R.F., Priebat, D.A., et al. (2017). Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 18, 1493–1501.
- Touat, M., Ileana, E., Postel-Vinay, S., André, F., and Soria, J.-C. (2015). Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 2684–2694.
- Turner, N., Pearson, A., Sharpe, R., Lambros, M., Geyer, F., Lopez-Garcia, M.A., Natrajan, R., Marchio, C., Iorns, E., Mackay, A., et al. (2010). FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 70, 2085–2094.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Wagner, A.J., Banerji, U., Mahipal, A., Somaiah, N., Hirsch, H., Fancourt, C., Johnson-Levonas, A.O., Lam, R., Meister, A.K., Russo, G., et al. (2017). Phase I Trial of the Human Double Minute 2 Inhibitor MK-8242 in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 1304–1311.
- Wang, X., Asmann, Y.W., Erickson-Johnson, M.R., Oliveira, J.L., Zhang, H., Moura, R.D., Lazar, A.J., Lev, D., Bill, K., Lloyd, R.V., et al. (2011). High-resolution genomic mapping reveals consistent amplification of the fibroblast growth factor receptor substrate 2 gene in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 50, 849–858.
- Ware, K.E., Hinz, T.K., Kleczko, E., Singleton, K.R., Marek, L.A., Helfrich, B.A., Cummings, C.T., Graham, D.K., Astling, D., Tan, A.-C., et al. (2013). A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop. *Oncogenesis* 2, e39.
- Wesche, J., Haglund, K., and Haugsten, E.M. (2011). Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem. J.* 437, 199–213.

Yan, G., Fukabori, Y., McBride, G., Nikolaropolous, S., and McKeegan, W.L. (1993). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4513–4522.

Yang, W., Dolloff, N.G., and El-Deiry, W.S. (2008). ERK and MDM2 prey on FOXO3a. *Nat. Cell Biol.* *10*, 125–126.

Young, R.J., Litière, S., Lia, M., Hogendoorn, P.C.W., Fisher, C., Mechtersheimer, G., Daugaard, S., Sciot, R., Collin, F., Messiou, C., et al. (2017). Predictive and prognostic factors associated with soft tissue sarcoma response to chemotherapy: a subgroup analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 62012 study. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *56*, 1013–1020.

Zhang, K., Chu, K., Wu, X., Gao, H., Wang, J., Yuan, Y.-C., Loera, S., Ho, K., Wang, Y., Chow, W., et al. (2013). Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res.* *73*, 1298–1307.

Zhang, W., Konopleva, M., Burks, J.K., Dywer, K.C., Schober, W.D., Yang, J.-Y., McQueen, T.J., Hung, M.-C., and Andreeff, M. (2010). Blockade of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase and murine double minute synergistically induces Apoptosis in acute myeloid leukemia via BH3-only proteins Puma and Bim. *Cancer Res.* *70*, 2424–2434.

Zhao, G., Li, W.-Y., Chen, D., Henry, J.R., Li, H.-Y., Chen, Z., Zia-Ebrahimi, M., Bloem, L., Zhai, Y., Huss, K., et al. (2011). A novel, selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors that shows a potent broad spectrum of antitumor activity in several tumor xenograft models. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 2200–2210.

Zhou, W.-Y., Zheng, H., Du, X.-L., and Yang, J.-L. (2016). Characterization of FGFR signaling pathway as therapeutic targets for sarcoma patients. *Cancer Biol. Med.* *13*, 260–268.

Zhou, Y., Wu, C., Lu, G., Hu, Z., Chen, Q., and Du, X. (2020). FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types. *J. Cancer* *11*, 2000–2007.