

# UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER

## FACULTÉS DE MÉDECINE

---

ANNÉE 2019

2019 TOU3 1579

### THÈSE

#### POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

#### MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

**Claire ROMARY**

le 25 septembre 2019

**CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE, IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET  
MOLECULAIRE DES SARCOMES FIBROMYXOÏDES DE BAS GRADE ET  
DES FIBROSARCOMES EPITHELIOÏDES SCLEROSANTS, DE LA BASE  
NATIONALE DU GROUPE SARCOMME FRANÇAIS**

Directrice de thèse : Dr Sophie LE GUELLEC

### JURY

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET  
Madame la Professeure Anne BROUCHET  
Monsieur le Professeur Nicolas REINA  
Madame le Docteur Sophie LE GUELLEC  
Madame le Docteur Christine CHEVREAU

Président  
Assesseur  
Assesseur  
Assesseur  
Suppléant



## REMERCIEMENTS

---

**A Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Président du jury

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie. Je vous suis en outre reconnaissante de m'offrir de poursuivre ma formation en tant qu'assistante dans votre service.

**A Madame le Docteur Sophie LE GUELLEC**

Praticien Spécialiste des Centres de Lutte Contre le Cancer

Directrice de thèse

Parce qu'en plus d'être une excellente anapath et pédagogue qui nous donne goût aux sarcomes (monotone-> génomique simple, polymorphe-> génomique complexe), tu es une personne adorable. Je te remercie de m'avoir encadrée et supportée (!) tout au long de ce projet. J'ai adoré travailler avec toi, chef, et espère en avoir encore l'occasion à l'avenir.

**A Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Je suis heureuse de te compter parmi les membres de mon jury. Je te remercie pour ton enseignement et tes qualités humaines.

**A Monsieur le Professeur REINA**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Département de Chirurgie Orthopédique et Traumatologie-Pierre Paul Riquet

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos nouveaux projets toulousains.

**A Madame le Docteur Christine CHEVREAU**

Praticien Hospitalier

Oncologie Médicale

Je n'ai pas eu le plaisir de travailler directement avec vous mais votre excellence dans le domaine des sarcomes est reconnue par tous. Je suis honorée que vous ayez accepté de juger mon travail.

## **Aux personnes qui m'ont aidée à réaliser ce travail :**

A l'équipe du poulet Gaston Gérard et des œufs en meurette:

**Fred**, merci pour ta patience et ton aide dans cette thèse. J'espère que tu accepteras de travailler sur de nouveaux projets avec moi.

**Laura, Noémie et Gaëlle**, merci pour votre aide, votre gentillesse et votre disponibilité face à toutes mes interrogations. Candice et Lucie, je vous souhaite le meilleur pour votre postdoc; j'espère qu'on aura encore l'occasion d'aller boire des verres ensemble.

**Ange et Léonor**, c'est grâce à vous que la base de données a pris forme.

**Yvan**, c'est un plaisir de travailler avec toi, tu es toujours de bonne humeur et plein d'enthousiasme.

A l'équipe de FISH : **Gabrielle, Eveline et Stéphanie**. Merci pour votre aide et votre infinie patience (lames HE non cerclées, non déposées, cercles trop grands...) 😊

## A ma famille

A ma grand-mère, **Grande**, qui nous a quittés récemment. Pour toutes les valeurs que tu nous as inculquées et pour ton affection sans bornes.

A **mes parents**, à qui je dois ce que je suis aujourd'hui. A ma maman, une femme exceptionnelle dont je suis la plus grande fan. A mon super papa carabin qui a finalement retrouvé ses premières amours de médecin de famille et nous a involontairement transmis le virus de la médecine.

A mon grand frère **Emeric**, qui n'a de cesse de viser les étoiles et qui atteindra bientôt la lune.

Au 2ème de la fratrie, **Xavier**, un concentré de sensibilité dans un excellent médecin. Ma référence sportive depuis toujours.

A mon petit frère **Pierre**, mon confident et mon alter ego. Rendez-vous à la Reun !

A ma belle-soeur **Mary Mary**, ou devrais-je dire à mon clown de belle-sœur, avec laquelle on ne peut voir la vie qu'en rose.

A ma belle-soeur **Audrey**, la douceur incarnée et une maman dévouée.

Dédicace à **Laure**, la charmante nouvelle recrue du clan.

A mes petits neveux et nièces, **Gauthier, Julie, Clément** (mon lutin) et **Mathias**.

A **Flash**, alias Piwi, Pimousse, Rikiki, le « poti chien »... la boule de poils qui me suit dans mes aventures depuis plus de 9 ans.

## Aux amis

A **Bassam**, mon meilleur ami: "réviser, c'est douter de son talent". Merci de me supporter au quotidien, d'être toujours dispo pour m'écouter entre deux parties de console, de me prêter tes caleçons, me laisser dévorer tes Belvita... Bref : <3

Au futur Docteur Nicolai ( **Vincent** ) : merci pour ton soutien pendant la dernière ligne droite de cette thèse, à faire des tête-à-tête d'ordinateur et à m'écouter pester sur Word. J'espère que je saurai t'encourager aussi bien que tu l'as fait. Je ne te souhaite que du bonheur pour la suite.

A la bande des Parigots, les copains de fac : **Marion, Kathy, Stéphane**. Parce que chacun trace sa route mais que les amis c'est pour la vie.

Aux copains toulousains : **Angéline et Fabien** (aux soirées plancha/piscine et au vin portugais !), **Flo, Laura, Lucie, Alpha** (mon super partenaire de semi-marathon), **Pierre, Béa, Quoc Phi**.

Aux copains de la Réunion et en particulier à **Nico** pour nos aventures en canyon, nos week-ends bivouac et cette semaine d'alpinisme inoubliable depuis la barre des Ecrins au sommet du Mont Blanc. A très vite pour de nouvelles aventures !

Au club de canyon Jacuzzi et à nos futures escapades : dédicace à **Nicolas**

### A mes co-internes :

Parce que chacun de vous est un rayon de soleil dans notre bande de gais lurons! **Justine, Lisa, Gabrielle, Guillaume**, la **Margot(te)**, **Anna, Pauline, Anne-Cé, Elise**, la belle **Charlotte**, et les p'tits derniers, **Marine** et **Vincent**, mes deux acolytes avec lesquels on refait le monde. Dédicace obligée à ma poulette **Cécile** (Zézile Hartog), pour nos crapahuts des Pyrénées à l'île de la Réunion et pour notre amour commun pour la montagne. Tu vas me manquer mais je sais que tu feras des merveilles à Bordeaux! Ne nous oublie pas !

A nos hors-filières de compèt' : Timila, Guillaume, Marion, Aris, Philippe et les autres.

## **A l'équipe du service d'anapath:**

Aux médecins : **Jacqueline, Philippe, Laurence, Eliane, Emmanuelle, Isabelle Duga, Isabelle Rouquette, Marie, Béatrice, Raphaëlle, Véronique, Janick, Camille, Philippe, Monique, Céline, Solène, Chantal, Nada, Martine, Audrey.** Je vous remercie pour votre enseignement et votre bonne humeur.

Un merci particulier à **Dominique**, pour votre gentillesse et votre investissement dans notre formation.

A **Flo** et **Emilie**, pour votre joie de vivre et tous les moments passés à rigoler.

Aux assistants et assistantes qui m'ont formée : **Romain**, parce que tu as été de ceux qui nous ont le plus appris à nos débuts. **Thibaut, Max, Camille, Fabrice** (ex-assistant), **Claire** (encore merci de m'avoir aidée pour la mise en forme de ma thèse!), **Gwendo**, la douce **Oriane, Julie, Laure, Sarah** (notre machine !). A notre maman d'anapath, **Aurore**, pour ta gentillesse, ta pédagogie et tous ces moments où tu sais nous reconforter. A l'équipe de choc des futurs co-assistants, **Alix, Charlotte S., Seb, Quentin, Charlotte D.** : j'ai hâte !

Aux techniciens, cadres et secrétaires du service : **Alice, Eva, Marie-Jo, Chantal, Séverine, Thomas, Sophie** la sportive, **Juju, Charley, Sylvie, Coco, Mélanie, Dévy, Blandine, PJ, Julian, Marine, Laura, Justine, Novela, Anaïs** et **Virginie** (à tous les bons moments qu'on passe à Ranguel) et tous les autres. Dédicace aux techniciens des « MAC1 » à « MAC4 », parce que sans vous la macro serait moins drôle !

Aux équipes des services d'anapath du CHU de Saint Pierre à la Réunion et de Tarbes avec lesquelles j'ai passé d'excellents moments.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Etat des connaissances sur les sarcomes fibromyxoïdes de bas grade (SFMBG)</b> .....	<b>15</b>
1.1 Caractéristiques cliniques.....	15
1.2 Caractéristiques radiologiques.....	15
1.3 Caractéristiques histologiques .....	15
1.4 Caractéristiques immunohistochimiques .....	17
1.5 Caractéristiques moléculaires .....	18
1.6 Evolution et prise en charge thérapeutique.....	18
<b>2. Etat des connaissances sur les fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants (FES)</b> 20	
2.1 Caractéristiques cliniques.....	20
2.2 Caractéristiques radiologiques.....	20
2.3 Caractéristiques histologiques .....	20
2.4 Caractéristiques immunohistochimiques .....	22
2.5 Caractéristiques moléculaires .....	22
2.6 Evolution et prise en charge thérapeutique.....	23
<b>3. Etat des connaissances sur les tumeurs hybrides (TH)</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>26</b>
1. Sélection des patients et du matériel tumoral.....	26
2. Relecture histologique et analyse immunohistochimique .....	27
3. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH) .....	29
3.1 Généralités.....	30
3.2 Conception des sondes fluorescentes.....	31
3.3 Protocole FISH d'hybridation et révélation .....	33
3.4 Détection des réarrangements des gènes FUS, CREB3L1 et CREB3L2.....	33
4. Etude moléculaire.....	34
4.1 Extraction de l'ARN (digestion et déparaffinage) .....	35
4.2 Evaluation de la qualité et de la quantité d'ARN extrait.....	35
5. RNA-Sequencing.....	35
6. Analyse statistique .....	37

<b>RESULTATS .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Flow chart de l'étude et répartition des cas en fonction des centres .....</b>	<b>38</b>
<b>2. Données cliniques .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 SFMBG .....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 FES .....</b>	<b>42</b>
<b>2.3 TH .....</b>	<b>42</b>
<b>2.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4 .....</b>	<b>43</b>
<b>3. Caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 SFMBG .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 FES .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 TH .....</b>	<b>49</b>
<b>3.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4 .....</b>	<b>50</b>
<b>4. Caractéristiques moléculaires (FISH et RNA-Seq).....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 SFMBG .....</b>	<b>55</b>
4.1.1 Données de FISH .....	55
4.1.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique .....	57
<b>4.2 FES .....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Données de FISH .....	58
4.2.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique .....	60
<b>4.3 TH .....</b>	<b>61</b>
4.3.1 Données de FISH.....	61
4.3.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique .....	64
<b>4.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4 .....</b>	<b>66</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>75</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>82</b>

# INTRODUCTION

Les sarcomes des tissus mous de l'adulte sont des tumeurs hétérogènes d'origine conjonctive représentant environ 1 à 2% des tumeurs malignes de l'adulte (1). La grande diversité des sous-types histologiques (plus de 100 dans la dernière classification OMS 2013), la variabilité morphologique de ces tumeurs, leur rareté, le démembrement et l'identification depuis ces 10 dernières années de nombreuses entités nouvelles rendent le diagnostic et la classification de ces tumeurs de plus en plus complexes. Les sarcomes fibromyxoïdes de bas grade (SFMBG) sont des tumeurs malignes conjonctives rares (moins de 1% des sarcomes des tissus mous) qui présentent un potentiel métastatique variable et souvent tardif. Du fait de leur aspect histologique rassurant (pouvant aisément être pris à tort pour une tumeur bénigne), de leur rareté et de leur identification récente (première description en 1987 par Evans (2)), leur diagnostic et leur caractérisation constituent un véritable challenge. En 2001, Antonescu *et al.*(3) suggèrent qu'un lien étroit existe entre les SFMBG et les fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants (FES). Le FES est un sarcome fibroblastique rare (moins fréquent que le SFMBG), agressif, de mauvais pronostic, initialement décrit en 1995 par Meis-Kindblom (4). En 2011, l'identification de la protéine MUC4 comme marqueur immunohistochimique presque constamment exprimé dans les SFMBG et dans 70% des FES a, d'une part, renforcé les arguments pour un lien étroit entre ces deux tumeurs et permis, d'autre part, une identification plus aisée par le pathologiste de ces deux entités. Toutefois, les données de la littérature sur ces deux tumeurs restent peu nombreuses avec comme principal écueil le nombre réduit de cas dans les séries rétrospectives. Ainsi, concernant les SFMBG, la plus importante série porte sur 73 cas mais ne s'appuie en terme diagnostique que sur une analyse morphologique (5), laissant suspecter qu'un certain nombre de cas ait été placé de manière incorrecte dans cette catégorie. Les quelques rares autres séries s'appuyant sur une analyse morphologique (parfois immunohistochimique) et moléculaire comportent moins de 50 cas de tumeurs primaires (6,7). Pour les FES, la série la plus importante repose sur l'analyse morphologique, immunohistochimique et moléculaire de 29 cas de FES « purs » (8). Par ailleurs, l'identification des tumeurs dites « hybrides » (mêlant les caractéristiques des SFMBG et des FES au sein d'une même tumeur) étant récente (2011), très peu de

données exhaustives sont rapportées (12 cas de formes hybrides SFMBG/FES par *Doyle et al. en 2012*)(8), tout comme leur caractérisation morphologique, immunohistochimique et moléculaire précise.

Dans le cadre du Groupe Sarcome Français (GSF), un projet d'étude des sarcomes dits « rares » (représentant moins de 1% des sarcomes des tissus mous) intitulé projet SARRA (SARcomes RAres) a été initié en 2017. Partant du constat clinique de l'absence de standards de prise en charge thérapeutique de ces « sarcomes rares » dans la littérature mais également de la difficulté de diagnostic de ces tumeurs, un projet spécifique a été élaboré dans le cadre du GSF.

Ce travail de thèse constitue la première étape de ce projet avec pour objectif de construire une cohorte conséquente entièrement caractérisée d'un point de vue morphologique, immunohistochimique et moléculaire. Le diagnostic pathologique précis dans le cadre des tumeurs des tissus mous étant fondamental pour la prise en charge thérapeutique adaptée des patients (9,10) la caractérisation exhaustive de ces entités constitue un enjeu majeur.

Par la suite, cette cohorte constituera le point de départ de nombreuses analyses, parmi lesquelles deux axes du projet SARRA :

-le premier, que nous réalisons actuellement, est l'évaluation de l'intérêt de la signature moléculaire CINSARC (Complexity Index-In-SARComas) sur l'ensemble de notre cohorte. Cette signature transcriptomique, composée de 67 gènes impliqués dans le contrôle de la division cellulaire et de l'intégrité chromosomique, permet de prédire l'évolution métastatique des patients de manière plus fiable que le grade histologique de la FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer; actuellement le gold standard)(*annexe 3*) dans un certain nombre de sarcomes (10–12).

-le second, dans le cadre du Programme de Recherche Translationnelle en Cancérologie (PRT-K) «Caractérisation de l'environnement immunitaire des Sarcomes rares – Projet MIRAS (Multimodal Immune characterization of RAre soft tissue Sarcoma)», sera d'évaluer l'intérêt d'un traitement immunothérapeutique (notamment des inhibiteurs de PD1/ PD-L1) dans les SFMBG, FES et TH, en partant de l'analyse de l'environnement immunitaire de ces sarcomes. (14,15)

# **1. Etat des connaissances sur les sarcomes fibromyxoïdes de bas grade (SFMBG)**

## **1.1 Caractéristiques cliniques**

Décrits pour la première fois en 1987 par Evans (2), les SFMBG sont des tumeurs rares (<1% des sarcomes des tissus mous) avec une incidence de 0,18 par million d'habitants (9) se présentant cliniquement comme une masse à croissance lente, indolore, se développant au niveau des tissus mous profonds des membres et du tronc (classiquement cuisse, épaule et région inguinale) (16) le plus souvent chez des adultes jeunes (moyenne d'âge : 33 ans)(5,17) mais pouvant toucher des patients de tous âges (18) sans prédominance de sexe (17,19). D'autres localisations anecdotiques sont décrites telles que la région de la tête et du cou, le péritoine ou certains viscères (20–25) . Une localisation superficielle est plus souvent décrite chez les enfants (26).

## **1.2 Caractéristiques radiologiques**

En IRM, les aspects des SFMBG sont peu spécifiques. La composante myxoïde est suspectée devant un hypersignal en séquence T2. Les remaniements calciques, kystiques ou nécrotiques peuvent également être visualisés, sans spécificité. (27,28)

## **1.3 Caractéristiques histologiques**

Sur le plan macroscopique (*figure 1*), les SFMBG se présentent comme des tumeurs de taille variable, allant de 1,5 à 22 cm. A la coupe, elles apparaissent blanchâtres, bien limitée, le plus souvent non encapsulées, d'aspect fibreux mêlé à des zones myxoïdes (26,29–31).

Sur le plan microscopique, les SFMBG se présentent sous la forme d'une alternance de plages myxoïdes et fibreuses en proportions variables, peu à moyennement cellulaires, comportant des cellules fusiformes ou étoilées, non atypiques, d'origine fibroblastique (3,5), avec de rares figures de mitose (10,26,30,31). Rarement, les SFMBG peuvent pré-

senter des remaniements kystiques ou calciques voire des foyers d'ostéogénèse. De par leur aspect histologiquement « bénin », les SFMBG peuvent être confondus avec de nombreuses tumeurs bénignes telles que le fibrome desmoplastique, le neurofibrome, le myxome cellulaire, le périneuriome ou la tumeur desmoïde (7). Dans les cas comportant des zones hypercellulaires, des foyers de cellules épithélioïdes ou des rosettes collagéniques géantes, le diagnostic différentiel avec des sarcomes de bas grade peut également se poser (myxofibrosarcome de bas grade, dermatofibrosarcome protuberans, liposarcome dédifférencié etc.).

Anciennement considérée comme une entité distincte, la tumeur hyalinisante à cellules fusiformes et rosettes géantes a été reclassée en « sarcome fibromyxoïde de bas grade avec rosettes collagéniques géantes » (5,17,33–37)



*Figure 1. Aspects macroscopiques d'un SFMBG (NI=8)*

## **1.4 Caractéristiques immunohistochimiques**

Récemment, l'expression en immunohistochimie de la protéine MUC4 a été rapportée comme un marqueur sensible et spécifique pour le diagnostic des SFMBG (7). Même si jusqu'à présent les études montraient un marquage de 100% des SFMBG, une récente étude a rapporté un cas de SFMBG avec translocation *FUS-CREB3L2* négatif pour MUC4 en immunohistochimie (34). D'autres tumeurs à cellules fusiformes peuvent également présenter un marquage focal avec l'anticorps anti-MUC4 notamment dans 90% des synoviosarcomes biphasiques (8,30). MUC4 est une glycoprotéine transmembranaire de haut poids moléculaire exprimée par de nombreuses cellules épithéliales, initialement décrite dans un adénocarcinome mammaire métastatique chez le rat. Elle joue un rôle dans la lubrification des surfaces épithéliales, empêchant l'adhésion des microbes et cellules cancéreuses aux tissus sains (tissu respiratoire, muqueuse vaginale etc.) (35,37,38) et dans la prolifération, la survie et l'apoptose cellulaires en interaction avec les facteurs de croissance de la famille HER2, HER3 (31–35).

Une surexpression de la protéine MUC4 a été rapportée dans certains carcinomes (pancréas, côlon, sein, ovaire, poumon) (39–45).

La « découverte » de l'hyperexpression de la protéine MUC4 dans les SFMBG provient de l'analyse de données de puces micro-array comparant les profils d'expression de SFMBG à une série d'autres sarcomes des tissus mous (46). Le gène *MUC4*, localisé sur le bras long du chromosome 3 (3q29), est dérégulé dans les SFMBG (profil d'expression génique micro-array) (46), conduisant à une surexpression de la protéine MUC4 dans ces tumeurs et utilisée en immunohistochimie à des fins diagnostiques. Le rôle de MUC4 dans les cellules mésenchymateuses normales, dans la tumorigenèse des SFMBG et le lien éventuel entre la surexpression de MUC4 et la translocation spécifique des SFMBG ne sont pas connus à ce jour. Il semblerait que MUC4 induise la transformation oncogénique des fibroblastes *in vitro* (14,40,41).

Avant l'identification de MUC4 en 2011, aucun marqueur immunohistochimique n'était positif ou relevant. On notait toutefois un marquage variable et non spécifique avec les anticorps anti-EMA (Epithelial Membrane Antigen) et parfois le CD99.

## **1.5 Caractéristiques moléculaires**

D'un point de vue moléculaire, deux types de translocations sont rapportées dans les SFMBG : la grande majorité des SFMBG (80 à 96% des cas) (6,9,39–41) présentent la translocation t(7;16)(q34;p11) impliquant le gène *FUS* (*fused in sarcoma*) de la bande chromosomique 16p11 et le gène *CREB3L2* (cAMP responsive element-binding protein 3-like 2, aussi nommé BBF2H7) de la bande chromosomique 7q33 (6,30) avec un point de cassure le plus souvent localisé dans les exons 6 ou 7 ou l'intron 7 du gène *FUS* et dans l'exon 5 du gène *CREB3L2* (6,47,48,48–50). Une minorité de SFMBG arborent la translocation t(11,16) (p11;p11) impliquant les gènes *FUS* et *CREB3L1* (6,16,19). Le gène *CREB3L2*, localisé sur le bras long du chromosome 7, code pour une protéine de liaison à l'ADN de la famille des basic leucine zipper. Le gène *FUS*, localisé sur le bras court du chromosome 16, code pour une protéine de liaison à l'ARN de la famille FET.

A partir du transcrit de fusion *FUS-CREB3L2*, le domaine B-ZIP codant du gène *CREB3L2* passe sous le contrôle du promoteur du gène *FUS* qui, en retour, dérégule des gènes normalement sous le contrôle de *CREB3L2* (ex. *MUC4*, *FOXL1*, *CD24* etc.). La fusion des deux gènes leur confère également des propriétés transactivatrices et oncogéniques (47,48).

## **1.6 Evolution et prise en charge thérapeutique**

Les SFMBG ont un potentiel de récurrence locale et métastatique tardif élevé (respectivement de 9 à 64% et de 6 à 50% à 5 ans) mais très variable selon les études (5,6,31), nécessitant un suivi à long terme. Les SFMBG métastasent préférentiellement au poumon (5,51) avec quelques cas décrits de métastases à la prostate et au foie (52,53). Du fait de leur faible activité mitotique et de leur bas grade de malignité (par définition), les SFMBG sont peu radio et chimiosensibles (54). Le traitement curatif de référence actuel, chez les patients présentant une tumeur localisée, non métastatique, correspond au traitement standard des sarcomes des tissus mous sous la forme d'une résection chirurgicale monobloc avec marges saines (« R0 » : absence de résidu tumoral microscopique sur les berges d'exérèse, selon la classification de l'UICC), sans traitement adjuvant (9). En cas de marges positives, une reprise chirurgicale afin

d'obtenir des marges saines est proposée en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). En cas d'impossibilité de reprise chirurgicale, une radiothérapie complémentaire peut être effectuée (*annexe 1*). Comme pour les autres sarcomes des tissus mous, la qualité de l'exérèse constitue un facteur pronostic majeur de récurrence locale (55). Jusqu'à présent, aucune caractéristique clinique, moléculaire ou histologique, notamment le grade de la FNCLCC, ne permet de prédire le risque métastatique. Une localisation superficielle (26,56) et une taille tumorale inférieure à 3.5 cm (31) ont été toutefois rapportées comme associées à un meilleur pronostic.

## **2. Etat des connaissances sur les fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants (FES)**

### **2.1 Caractéristiques cliniques**

Initialement décrit en 1995 par Meis-Kindblom (4), le FES est une tumeur rare (incidence inférieure à celle des SFMBG), agressive, se présentant comme une masse des tissus mous profonds des membres (le plus souvent inférieurs) et du tronc chez des adultes le plus souvent d'âge moyen (moyenne d'âge entre 40 et 50 ans) (49,57), mais visible à tout âge (8). Bien que les séries les plus importantes ne rapportent pas de prédominance de sexe (4,8,57), une tendance féminine (3) et récemment une différence significative entre les deux sexes ont été mises en évidence (90% femmes, (49)). D'autres localisations telles que le rétropéritoine, la région paravertébrale, le cou, la cavité abdominale (8,58), l'os (59) ou encore le rein (60,61) ont été décrites. Les FES infiltrant de manière classique les structures adjacentes, notamment le périoste.

### **2.2 Caractéristiques radiologiques**

Les caractéristiques radiologiques sont peu spécifiques (27,62).

### **2.3 Caractéristiques histologiques**

Sur le plan macroscopique (*figure 2*), les FES se présentent comme des tumeurs de taille variable, allant de 1 à 25 cm (3,6,30). A la coupe, elles apparaissent assez bien limitées, plus ou moins encapsulées, lobulées avec une surface blanchâtre. Des remaniements calciques ou kystiques sont possibles, rarement nécrotiques (49,57,63).

Sur le plan microscopique, les FES se présentent sous forme de cordons ou nids se disposant dans un stroma collagénique fibreux ou hyalin. Les cellules tumorales sont de taille petite à moyenne, épithélioïdes avec un cytoplasme peu abondant (3,4). Un contingent à cellules fusiformes pauci-cellulaire peut être observé, rappelant morphologiquement un SFMBG, posant la problématique d'une tumeur hybride (49).

Le nombre de mitoses est variable (allant jusqu'à plus de 10 mitoses pour 10 HPF) et la nécrose est observée dans moins de 50% des cas (3,49).

Dans les études antérieures, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre la présence d'un contingent de SFMBG, le nombre de mitoses, la présence de nécrose, l'invasion vasculaire ou osseuse et l'évolution clinique (3).



*Figure 2. Aspects macroscopiques d'un FES (cas du Dr Cristi Marin, service d'anatomie et cytologie pathologiques, Ambroise Paré)*

## **2.4 Caractéristiques immunohistochimiques**

Tout comme dans les SFMBG, l'anticorps anti-MUC4 constitue un marqueur sensible et spécifique des FES, allant de 70% (64) à 86% selon les séries (48). Aucun autre marqueur immunohistochimique pertinent n'est rapporté pour le diagnostic de ces tumeurs.

## **2.5 Caractéristiques moléculaires**

Sur le plan moléculaire, la majorité des FES (90%) présente un réarrangement du gène *EWSR1* (64,65) avec un point de cassure situé dans l'intron 11 (6,10,41). La proportion des rares cas montrant un réarrangement du gène *FUS* (~10% selon les études, (6,17,49) est difficile à évaluer du fait de critères histologiques variables pour la sélection des FES. Des difficultés liées notamment au manque de reconnaissance des zones de SFMBG (échantillonnage limité, caractère focal du contingent de SFMBG au moment du diagnostic du fait d'une possible propension du contingent fibrosarcoma-like à s'étendre plus rapidement) pourraient expliquer que certains SFMBG soient classés à tort comme des FES (57). Le partenaire de fusion le plus fréquent est représenté par *CREB3L1* (cAMP Response Element Binding Protein 3-Like 1) aussi connu sous le nom OASIS (40 à 71% selon les études ; (49,64,64) avec un point de cassure situé dans l'intron 5 (65) tandis que *CREB3L2* est rarement impliqué (49).

Comme le gène *FUS*, avec lequel il présente une forte homologie (66), le gène *EWSR1* code pour une protéine de liaison à l'ARN de la famille FET (pour Fus, Ews et Taf15, famille nommée initialement TET) (67,68), jouant un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome et la régulation de l'expression des gènes (30,68). Comme le montrent Lau *et al.* (67) et comme le soulignent Doyle *et al.* (8) le gène *EWSR1* est un partenaire de fusion alternatif au gène *FUS* dans un certain nombre de tumeurs des tissus mous telles que le liposarcome myxoïde qui présente un transcrite de fusion *DDIT3-EWSR1* dans 10% des cas alors que les 90% restants impliquent les gènes *DDIT3* et *FUS*. A l'inverse, le gène *FUS* est un partenaire de fusion alternatif à *EWSR1* dans de très rares cas notamment dans certains sarcomes d'Ewing ou histiocytomes fibreux angiomatoïdes.

Le gène *CREB3L1*, comme *CREB3L2*, est un facteur de transcription de la famille CREB contenant un domaine de liaison à l'ADN basic leucine zipper qui agit en réponse

à un stress du réticulum endoplasmique. Le rôle de *CREB3L1* est peu connu. Dans les ostéoblastes, *OASIS* active la transcription du gène *COL1A1* pour augmenter la production des fibres de collagène de type I durant l'ostéoformation (69,70). Dans les cellules infectées par le virus de l'hépatite C, le clivage du domaine de liaison à l'ADN entraîne la transcription de gènes inhibant la prolifération cellulaire. (65,71).

Récemment, trois nouveaux transcrits de fusion ont été décrits impliquant les gènes *EWSR1* et *CREB3L3* (72), *FUS* et *CREM* et *PAX5* et *CREB3L1*(73). Le gène *CREM* (*cAMP-responsive element modulator*) appartient à la famille *CREB*, à l'instar des gènes *CREB3L1* et *CREB3L2*, codant pour une protéine contenant un domaine basic leucine zipper.

Une proportion difficilement évaluable de ces tumeurs n'a toutefois pas d'anomalie moléculaire identifiée.

## **2.6 Evolution et prise en charge thérapeutique**

Les FES sont des tumeurs agressives et de mauvais pronostic avec cependant une évolution clinique très variable ; le taux de récurrence locale est d'environ 50% (à 5 ans) avec un risque de métastase de 43 à 86% (à 5 ans) et un taux de mortalité de 25 à 57% (à 5 ans) selon les études (3,4,49,57). De par leur pattern de cellules épithélioïdes/rondes dans un stroma fibreux, les FES font discuter de nombreux diagnostics différentiels, à la fois des tumeurs d'origine mésenchymateuse (sarcome alvéolaire des parties molles, tumeur fibromyxoïde ossifiante,...) et non mésenchymateuse (carcinome lobulaire mammaire, lymphome, carcinome peu différencié, ostéosarcome) (49,59).

Le traitement de référence chez les patients présentant une tumeur localisée, non métastatique, est semblable au traitement standard des sarcomes des tissus mous sous la forme d'une résection chirurgicale monobloc avec marges saines. En fonction de caractéristiques cliniques (taille > 5 cm, localisation profonde, cinétique de croissance rapide) et histologiques (« haut grade » selon la FNCLCC), un traitement (néo)-adjuvant (à base d'anthracyclines et d'ifosfamide) pouvant être couplé à une radiothérapie concomitante peut être proposé en Réunion de Concertation pluridisciplinaire (RCP) (option thérapeutique selon le référentiel de l'ESMO 2018 (*annexe 1*)). Chez les patients métastatiques au diagnostic, le traitement repose sur la chimiothérapie (à base

d'anthracyclines) (*annexe 2*).

### **3. Etat des connaissances sur les tumeurs hybrides (TH)**

Les tumeurs dites “hybrides”, décrites initialement par Reid en 2003, correspondent à des tumeurs présentant les caractéristiques morphologiques à la fois des SFMBG et des FES, en proportions variables, sans seuil établi (33,49,74). Sur le plan clinique, les tumeurs hybrides partageraient le pronostic des FES (73,75) avec un taux de mortalité légèrement plus bas que celui des FES (44% contre 37%(49)).

Sur le plan immunohistochimique, toutes les TH décrites sont positives avec l'anticorps anti-MUC4 (7,8,49,58,64,75).

Sur le plan moléculaire, elles impliquent un réarrangement du gène *FUS* (le plus souvent avec le gène *CREB3L2*) dans plus de 90% des cas (49,59,64,73) et la translocation *EWSR1-CREB3L1* dans les autres cas (75). En 2017, Arbajian et al.(73) mettent en évidence les mêmes types d'altérations génomiques entre les FES et les tumeurs hybrides avec un profil génomique plus complexe que celui des SFMBG en SNP array.

La prise en charge thérapeutique n'est pas spécifique et semblable à celle des FES.

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de ce travail de thèse, au sein d'un projet plus vaste, est de constituer et caractériser, sur les plans morphologique, immunohistochimique et moléculaire, une cohorte rétrospective de tous les cas de SFMBG, FES et TH disponibles et inclus dans la base RRePS et la Conticabase jusqu'au 31 décembre 2017.

Pour ce faire, l'ensemble des cas colligés a fait l'objet :

- d'une relecture histologique descriptive et exhaustive
- d'une analyse immunohistochimique détaillée et adaptée à l'histologie de chaque tumeur
- d'une analyse moléculaire (permettant d'exclure les diagnostics différentiels, d'identifier le(s) transcrit(s) spécifique(s) connu(s) et de nouveaux transcrits non encore décrits).

Le second objectif, actuellement en cours de réalisation, est d'évaluer l'intérêt de la signature moléculaire CINSARC dans la cohorte constituée.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Sélection des patients et du matériel tumoral

Entre le 1<sup>er</sup> janvier 1990 et le 31 décembre 2017, 325 patients présentant un diagnostic de SFMBG ou FES, traités au sein de 16 centres de référence (Centres anti-cancéreux ou Centres Hospitalo-Universitaires), ont été enregistrés dans la base de données nationale du réseau RRePS (Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes ; <https://rreps.sarcomabcb.org>) et dans la Conticabase (base de données européenne des sarcomes ; <https://conticabase.sarcomabcb.org>).

Les SFMBG représentent respectivement 1.1% (264 cas) et 0.8% (118 cas) de tous les sarcomes enregistrés dans la base nationale française RRePS et dans la Conticabase.

Les FES représentent respectivement 0.3% (61 cas) et 0.3% (42 cas) de tous les sarcomes enregistrés dans la base nationale française RRePS et dans la Conticabase.

N'étant pas encore été décrites, les TH n'ont pu être identifiées à ce stade de la sélection des cas.

Ont été inclus uniquement les cas pour lesquels un ou plusieurs bloc(s) de tumeur primitive (biopsie ou pièce opératoire), vierge de tout traitement (radio ou chimiothérapie), fixée en formol (ou Bouin) et incluse en paraffine (FFPE-*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) étaient disponibles dans un des 16 centres de référence.

Sur la base de ces critères et sur les 325 cas enregistrés, 160 cas (49%) ont été inclus dans l'étude.

Les données cliniques des patients et les caractéristiques tumorales suivantes ont été obtenues par l'examen rétrospectif des dossiers médicaux: date de naissance, sexe, date du diagnostic, localisation de la tumeur (côté, profondeur et taille tumorale). Tous les cas de sarcome sont enregistrés dans la base de données nationale RRePS, approuvée par le Comité national de protection des données personnelles (CNIL, n ° 910390), en conformité avec les principes éthiques de la charte d'Helsinki.

## 2. Relecture histologique et analyse immunohistochimique

Les lames histologiques (Hémalun-Eosine, H&E) des 160 cas (pour lesquels un bloc tumoral était disponible) diagnostiqués comme SFMBG ou FES ont été revues de manière collégiale par deux pathologistes (CR et SLG, membre référent du Groupe Sarcome Français). Le diagnostic de ces deux entités se base sur les données de la dernière classification OMS 2013 des « Tumeurs des Tissus Mous et de l'Os ». Les critères histologiques typiques du SFMBG comprennent une alternance de zones fibreuses hypocellulaires et de nodules myxoïdes plus cellulaires, une architecture en courts faisceaux avec un pattern d'enroulement, une vascularisation en arcades et une sclérose péri-artériolaire. Les cellules sont monotones et fusiformes, parfois focalement hyperchromatiques; dans 10% des cas, il existe des zones où la cellularité et les atypies nucléaires sont augmentées ou dans lesquelles les cellules prennent un aspect épithélioïde. Rarement la tumeur peut présenter un aspect de cellules rondes indifférenciées ou une différenciation ostéoblastique. Dans 30% des cas, il existe des rosettes géantes collagéniques. Les figures de mitoses sont rares. Les critères histologiques typiques du FES comprennent un abondant stroma collagénique hyalinisé dans lequel se disposent de petites cellules épithélioïdes monotones, organisées en cordons, nids ou grappes, occasionnellement en pseudo-alvéoles ou pseudo-glandes ; des zones pauci-cellulaires, myxoïdes ou scléreuses (fibrome-like) sont fréquentes ; des foyers de différenciation chondro-osseuse ou de calcifications peuvent se voir. L'index mitotique est le plus souvent faible. Les SEF peuvent rarement présenter des zones aux atypies plus marquées, de la nécrose focale ou d'assez nombreuses mitoses. Les tumeurs hybrides ne sont pas décrites dans la dernière classification OMS 2013 des « Tumeurs des Tissus Mous et de l'Os » comme une entité distincte, même si les auteurs précisent que certains SFMBG peuvent présenter des zones avec une morphologie typique de FES et certains FES présenter des petits foyers de SFMBG ou de morphologie très proche de celle des SFMBG. Toutefois, plusieurs données de la littérature depuis la dernière édition de l'OMS 2013 définissent la tumeur hybride comme la présence au sein d'une même tumeur des deux composantes décrites ci-dessus (absence de seuil défini pour chaque composante). Ainsi dans notre étude, la présence des deux composantes (indépendamment de leurs proportions respectives) au sein d'une même tumeur nous a fait classer la prolifération dans la catégorie des « tumeurs

hybrides » (TH).

Morphologiquement, pour chaque tumeur, les critères suivants ont été colligés :

- limitation de la tumeur : bien limitée, mal limitée, non évaluable,
- architecture : cordons/nids, enroulements/faisceaux, autre,
- stroma : myxoïde, fibreux/desmoplasique/hyalin, mixte (myxoïde et fibreux), autre,
- cellularité globale : élevée, hétérogène, faible,
- morphologie cellulaire : ronde/épithélioïde, fusiforme, mixte, autre,
- aspect nucléaire : régulier/atypies modérées, très pléomorphe/anaplasique,
- présence d'autres caractéristiques : métaplasie osseuse, métaplasie chondroïde, formations kystiques, calcifications, rosettes géantes collagéniques, autre.

Toutefois, ces aspects morphologiques ne sont pas spécifiques et le diagnostic de ces tumeurs est ardu. Ainsi, le diagnostic différentiel peut inclure une variété de tumeurs bénignes conjonctives (neurofibrome, péri-neuriome, fibrome, myxome pour les SFMBG), de sarcome/tumeur conjonctive à malignité intermédiaire (myxofibrosarcome, dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand pour les SFMBG, ostéosarcome pour les FES), de tumeurs malignes non sarcomateuses (carcinome lobulaire mammaire pour les FES). C'est la raison pour laquelle nous avons effectué de manière systématique une étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-MUC4 (clone 8G7, dilution 1 :500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Selon la classification OMS 2013 des « Tumeurs des Tissus Mous et de l'Os », le diagnostic de SFMBG et de FES est basé sur la conjonction des données morphologiques et de l'expression par les cellules tumorales de MUC4 en immunohistochimie (marquage cytoplasmique fort et diffus). Toutefois pour les FES, les auteurs précisent qu'uniquement 70% des FES présentent une expression de MUC4, laissant supposer que cette entité n'est pas encore totalement caractérisée. Pour cette raison, pour les cas morphologiquement typiques (prolifération à cellules fusiformes monotones pour les SFMBG et prolifération à cellules épithélioïdes monotones pour les FES) mais où les cellules tumorales n'exprimaient pas MUC4 en immunohistochimie, des analyses immunohistochimiques complémentaires

ont été effectuées afin de dédouanner d'autres diagnostics différentiels: protéine S100 (clone Z311, 1:500; Dako, Glostrup, Denmark), EMA (clone E29, prediluted, Dako), desmine (clone D33, dilution 1:100; Dako), MDM2 (clone IF2, dilution 1:100; Invitrogen, Camarillo, CA), myogenine (clone LO26 dilution 1:20; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) si la desmine (clone AE1/AE3/PCK26, prediluted; Ventana, Tucson, AZ) était positive, h-caldesmon (clone h-CD, dilution 1:50; Dako), INI-1 (clone BAF47, dilution 1:30; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), HMB45 (clone HMB45, prediluted; Dako), SOX10 (clone EP268, dilution 1:100; BioSB, Santa Barbara, CA), MelanA (clone A103, prediluted; Ventana, Ventana Media Systems, Tucson, AZ) et CD34 (clone QBEND10, prediluted; Ventana).

Les tumeurs d'aspect morphologique non compatible (notamment les proliférations tumorales constituées de cellules pléomorphes) ont été exclues de l'étude.

Le grade tumoral a été évalué en fonction du système de la « FNCLCC » (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer), recommandé par la classification OMS 2013 des « Tumeurs des Tissus Mous et de l'Os ». Ce grading est basé sur la différenciation tumorale, le compte mitotique et le pourcentage de nécrose tumorale (*annexe 3*)

### **3. Hybridation in situ en fluorescence (FISH)**

Dans notre cohorte, des analyses FISH ont été réalisées pour tous les cas pour lesquels nous ne disposons pas de données moléculaires complètes (connaissance des deux partenaires du point de cassure). Ainsi pour les cas où nous n'avons pas connaissance des gènes impliqués ou du partenaire de fusion (absence de partenaire identifié ou présence d'un réarrangement des seuls gènes *FUS* ou *EWSR1*), une recherche systématique du gène d'intérêt ou du partenaire par ordre de fréquence épidémiologique a été réalisée (recherche d'un réarrangement des gènes *FUS* puis *CREB3L2* puis *CREB3L1* dans les SFMBG et les TH dans un premier temps et, si le gène *FUS* n'était pas réarrangé, recherche d'un réarrangement du gène *EWSR1*; à l'inverse recherche d'un réarrangement des gènes *EWSR1* puis *CREB3L1* dans les FES en première intention, et secondairement du gène *FUS* si le gène *EWSR1* n'était pas réarrangé).

Les analyses FISH concernant les gènes *FUS* et *EWSR1* ont été réalisées sur des sections de blocs FFPE de 4 µm en utilisant les sondes commerciales de « séparation » (*break-apart*) suivantes (seuil de positivité: 10% de cellules positives), selon le protocole du fournisseur (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) :

\_ *FUS* : sonde Agilent Technologies, Sure FISH 16p11.2 FUS 5' BA 457 kb, Green, Human Chr16 :30731376-31188501; Sure FISH 16p11.2 FUS 3' BA 365 kb, Orange-red, Human Chr16 :31204526-31569981

\_ *EWSR1*: sonde Agilent Technologies, Sure FISH EWSR1 5' BA 564 kb Green, Human Chr22 :29100656-29664246 ; Sure FISH EWSR1 3' BA 263 kb, Orange-red, Human Chr22 :29695821-29958416 (Dako);

Des sondes commerciales pour analyses FISH couvrant les points de cassure des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1* n'étant pas disponibles, nous avons conçu des sondes « maison ».

Les prélèvements fixés au liquide de Bouin ont été exclus (incompatible avec la technique de FISH).

### **3.1 Généralités**

La FISH a pour but d'étudier l'organisation du génome à l'aide de sondes venant s'hybrider sur des chromosomes cibles. Elle se décompose en trois étapes:

- conception des sondes fluorescentes
- hybridation des sondes aux chromosomes
- observation des résultats au microscope à fluorescence.

Les sondes correspondent à des fragments d'ADN contenant des nucléotides marqués par un fluorochrome. Après dénaturation, et lorsque leurs séquences sont complémentaires, les sondes viennent s'hybrider sur la molécule d'ADN simple brin cible pour former une molécule d'ADN double brin. La fluorescence émise est alors observée à l'aide d'un microscope à fluorescence et capturée par image pour être visualisée sur ordinateur.

Il existe plusieurs types de sondes en fonction des résultats attendus. Dans notre cas, nous avons utilisé des sondes dites de « séparation » (*break-apart*) venant s'hybrider de part et d'autre de la zone de cassure au niveau du gène étudié (*FUS*, *EWSR1*, *CREB3L2* ou *CREB3L1*). Pour les gènes *CRB3L2* et *CREB3L1* à analyser, nous avons confectionné un couple de sondes, une sonde centromérique spécifique (CEP : « Chromosome Enumeration Probe, sonde qui sera la plus proche du centromère) et une sonde spécifique d'un locus id est du gène à étudier (LSI : Locus Specific Identifier, sonde la plus éloignée du centromère).

### **3.2 Conception des sondes fluorescentes**

La première étape consiste, à partir des données de la littérature (6,8,48–50,64,65) à déterminer les coordonnées génomiques (« NM ») du ou des point(s) de cassure déjà décrits impliquant les transcrits de fusion *FUS-CREB3L2*, *FUS-CREB3L1* et *EWSR1-CREB3L1* retrouvés dans les SFMBG et les FES. Pour ce faire, nous avons eu recours aux logiciels COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) et ENSEMBL répertoriant l'ensemble des données génomiques de la littérature à partir de la version GRCh37 du génome humain.

A partir de ces coordonnées génomiques, nous avons borné la séquence d'ADN dans laquelle se situait habituellement le point de cassure en prenant comme extrémités le premier et le dernier exon de la séquence. La séquence d'ADN se trouvant entre les deux bornes choisies correspond à un nombre de nucléotides. A partir de cette suite de nucléotides, nous avons calculé ce qu'on appelle « le point de référence ». Ce dernier correspond à la position du nucléotide se trouvant au milieu de la séquence d'ADN bornée.

Une fois le point de référence calculé, nous avons commandé des sondes SureDesign en utilisant l'outil « Custom FISH » du fournisseur (Agilent) qui permet, à partir des coordonnées que nous avons établies, de réaliser deux sondes de « séparation » qui viendront s'hybrider de part et d'autre du point de cassure recherché sur les chromosomes en métaphase. A notre demande, lors de la confection des sondes par le fournisseur, le fluorochrome vert (isothiocyanate de fluorescéine) est fixé sur la sonde télomérique et le fluorochrome rouge (rhodamine B) sur la sonde centromérique.

Ci-dessous (*figure 3*), le schéma du design de la sonde CREB3L1 à partir des coordonnées génomiques de la zone de cassure sur le gène *CREB3L1* (11p11.2)

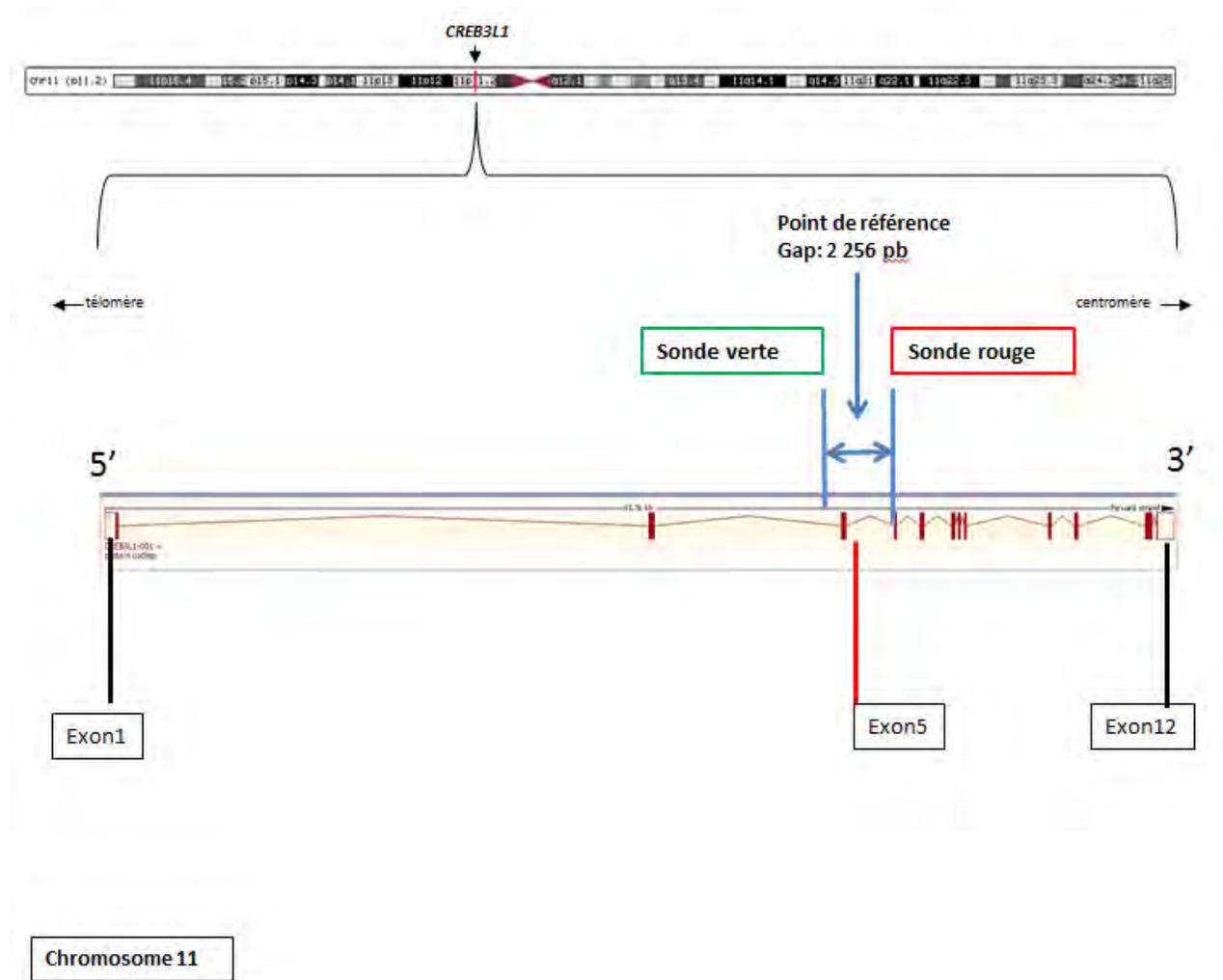


Figure 3. Schéma de la sonde CREB3L1

### 3.3 Protocole FISH d'hybridation et révélation (annexe 4)

### 3.4 Détection des réarrangements des gènes *FUS*, *CREB3L1* et *CREB3L2*

Pour chaque cas, les lames ont été scannées avec le microscope Panoramic 250 (3DHISTECH, Budapest, Hongrie) en utilisant des filtres appropriés. Un minimum de 100 cellules a été analysé par cas. Un réarrangement du gène correspondant était constaté (*figures 4a et 4b*) lorsqu'au moins 10% des noyaux contenaient un signal de séparation (deux signaux rouge et vert juxtaposés et deux signaux rouge et vert séparés ; distance de séparation supérieure à la taille d'un point fluorescent). La perte d'un signal vert avec conservation d'un signal rouge (dérivé oncogène) et des deux autres signaux vert et rouge juxtaposés pouvait correspondre soit à un réarrangement déséquilibré du gène cible, soit à une perte chromosomique sans effet oncogène; ces cas de figure ont bénéficié d'une validation par une autre technique moléculaire.

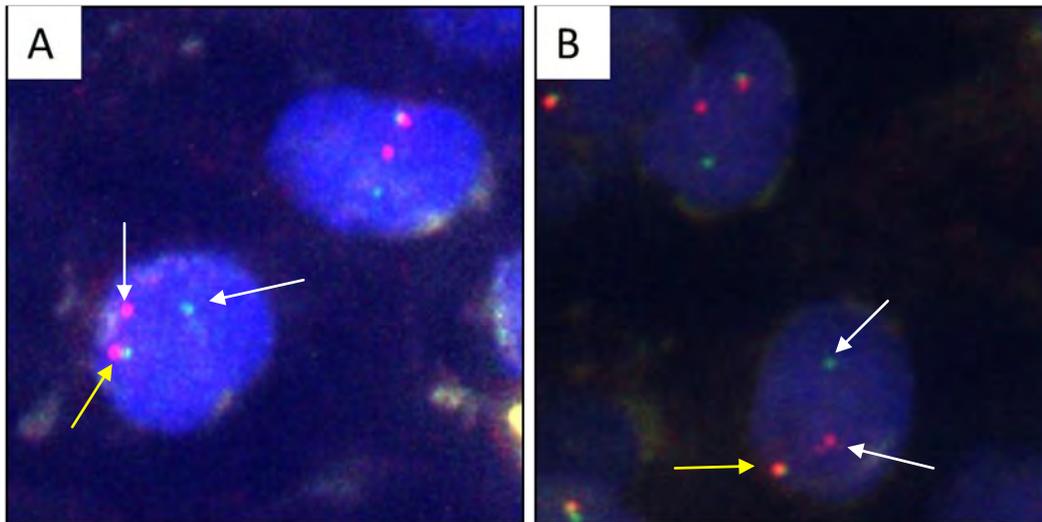


Figure 4a. Réarrangement des gènes *FUS* (A) et *EWSR1*(B) avec deux signaux rouge et vert séparés (flèches blanches) et deux signaux rouge et vert juxtaposés (flèche jaune)

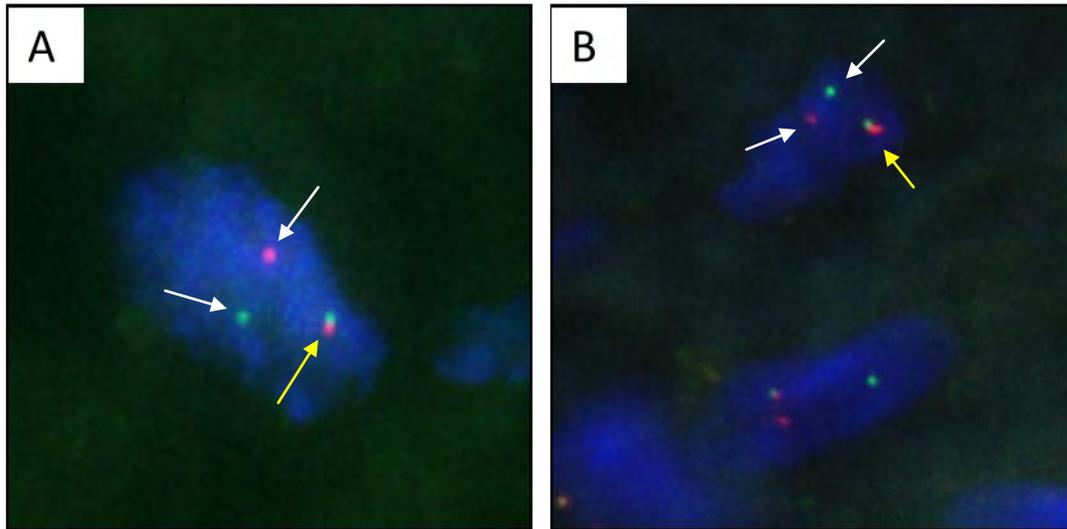


Figure 4b. Réarrangement des gènes *CREB3L2* (A) et *CREB3L1* (B) avec deux signaux rouge et vert séparés (flèches blanches) et deux signaux rouge et vert juxtaposés (flèche jaune)

#### 4. Etude moléculaire

A l'issue de l'analyse en FISH, pour les cas où nous ne disposons pas de données moléculaires complètes (absence de transcrite de fusion spécifique, absence de réarrangement des gènes *FUS* ou *EWSR1*, absence de partenaire de fusion identifié), des analyses moléculaires complémentaires ont été effectuées à partir des blocs tumoraux fixés en formol (FFPE) :

- Transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) : pour les cas où l'analyse FISH montrait un réarrangement des gènes *FUS* ou *EWSR1* associé à un réarrangement déséquilibré ou une FISH non interprétable pour les gènes *CREB3L1* et *CREB3L2* (analyse en cours de réalisation).
- RNA-Sequencing : pour les cas où l'analyse FISH n'avait pas mis en évidence de réarrangement des gènes *FUS* ou *EWSR1* et les cas non-interprétables en FISH.

#### **4.1 Extraction de l'ARN (digestion et déparaffinage)**

Sur chaque bloc de tissu inclus en paraffine a été sélectionnée une zone riche en cellules tumorales. Pour le cas des SFMBG, la cellularité était le plus souvent inférieure à 2%. A partir de cette zone d'intérêt, deux à quinze coupes de tissu tumoral de 10µm d'épaisseur ont été réalisées et déposées dans un tube.

Lorsque le matériel était de petite taille, un punch (Laboderm) a été utilisé pour réaliser des carottes directement dans le bloc de paraffine.

A partir de ces échantillons, l'ARN tumoral a été extrait en utilisant le kit RNeasy FFPE (Qiagen), comportant les étapes de déparaffinage, digestion enzymatique par DNase et purification des ARN extraits (*annexe 5*).

#### **4.2 Evaluation de la qualité et de la quantité d'ARN extrait**

Une fois extrait, l'ARN tumoral de chaque échantillon a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Nanodrop 1000, Thermo Scientific) en mesurant son absorbance à 260 nm, et qualifié à l'aide d'un bioanalyseur (bioanalyseur Agilent 2100 et kit ARN 6000, Agilent) en évaluant la DV200 (valeur qui correspond au pourcentage de fragments d'ARN d'un échantillon dont la taille est supérieure à 200 nucléotides). Une DV200 inférieure à 30% correspondait à un ARN trop dégradé pour être correctement séquencé.

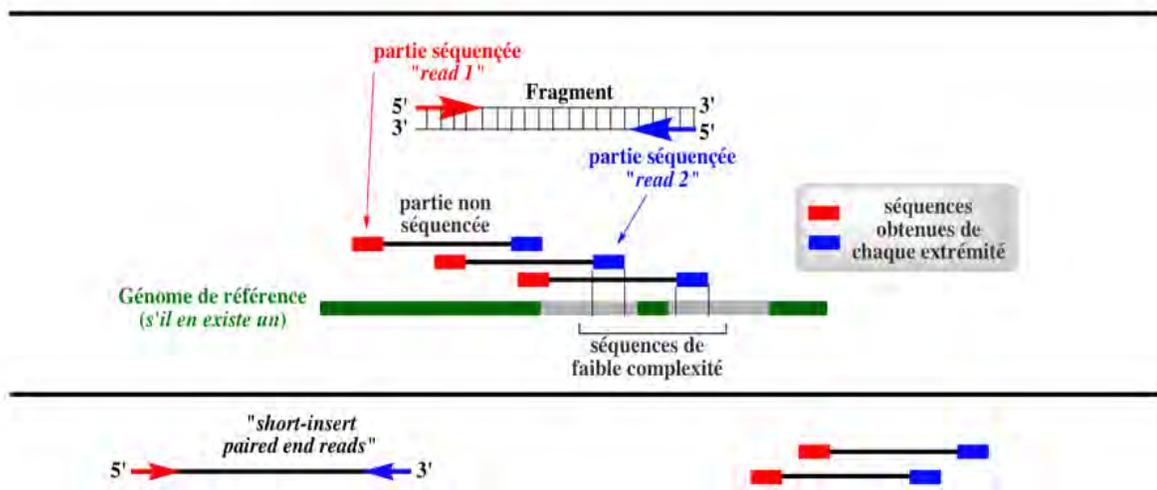
Les ARN extraits ont été stockés à -80°C avant poursuite des analyses.

### **5. RNA-Sequencing (RNA-Seq)**

Les cas non ou partiellement caractérisés d'un point de vue moléculaire par technique FISH, et dont l'ARN tumoral était de qualité satisfaisante, ont été envoyés au CNAG (Centre National d'Analyse Génomique, Barcelone) pour analyse en RNA-Seq « whole genome ».

Pour rappel, le RNA-Seq est une méthode de séquençage du transcriptome entier, c'est-à-dire de tous les ARN matures issus de la transcription du génome. Le séquençage a été effectué en paired-end (séquençage du fragment d'ARN à partir de

ses deux extrémités, *figure 5*) sur un séquenceur HiSeq 2000 (Illumina, Inc). Dans notre étude, le séquençage de l'ARN a pour objectif de mettre en évidence de nouveaux transcrits de fusion spécifiques aux sarcomes étudiés; un transcrite de fusion correspond à un ARN messenger codé par un gène de fusion lui-même produit de l'accolement de deux fragments de gènes différents.



*Figure 5. Séquençage paired-end d'une séquence ARN (E.Jaspard 2014)*

Les résultats obtenus nous ont été transmis sous forme de fichier informatique brut appelé « FASTQ ». Le fichier FASTQ contient l'ensemble des *reads* (lectures) d'un échantillon donné, c'est-à-dire une suite de nucléotides issue du séquençage de l'ARN par une machine appelée séquenceur. Les reads sont de petites séquences de fragments d'ARN reproduites par centaines de millions. Lors de l'analyse bioinformatique, le fichier FASTQ aboutit à un fichier BAM (Binary Aligement Map, version binaire compressée du SAM : Sequence Aligement Map) qui correspond au bon aligement (« mapping ») des *reads* sur un génome de référence (version GRCh37 du génome humain ; sources : NCBI, Ensembl...). A partir de ce fichier BAM et à l'aide de l'algorithme Defuse et du logiciel TopHat, les variants par rapport à la séquence de référence sont listés et comparés à des bases de données pour aboutir à un fichier VCF annoté. Ce dernier répertorie les variants d'intérêt pour chaque échantillon d'ADN tumoral, dans notre cas les nouveaux transcrits de fusion.

## 6. Analyse statistique

L'ensemble des données récoltées et des analyses effectuées a été consigné sur la base de données en ligne CSOnline. Une fois nettoyées et vérifiées par le data manager de la base, les données ont fait l'objet d'une analyse statistique.

Les caractéristiques de la population sont décrites par les statistiques usuelles : fréquences, pourcentages et nombre de données manquantes de chaque modalité pour les variables qualitatives et médiane, minimum, maximum et nombre de données manquantes pour les variables quantitatives. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées à l'aide du test du  $\chi^2$  ou du test exact de Fisher pour les variables qualitatives et par le test de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives.

Le seuil de significativité est fixé à 5%. Toutes les statistiques ont été réalisées sous le logiciel STATA version 13 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

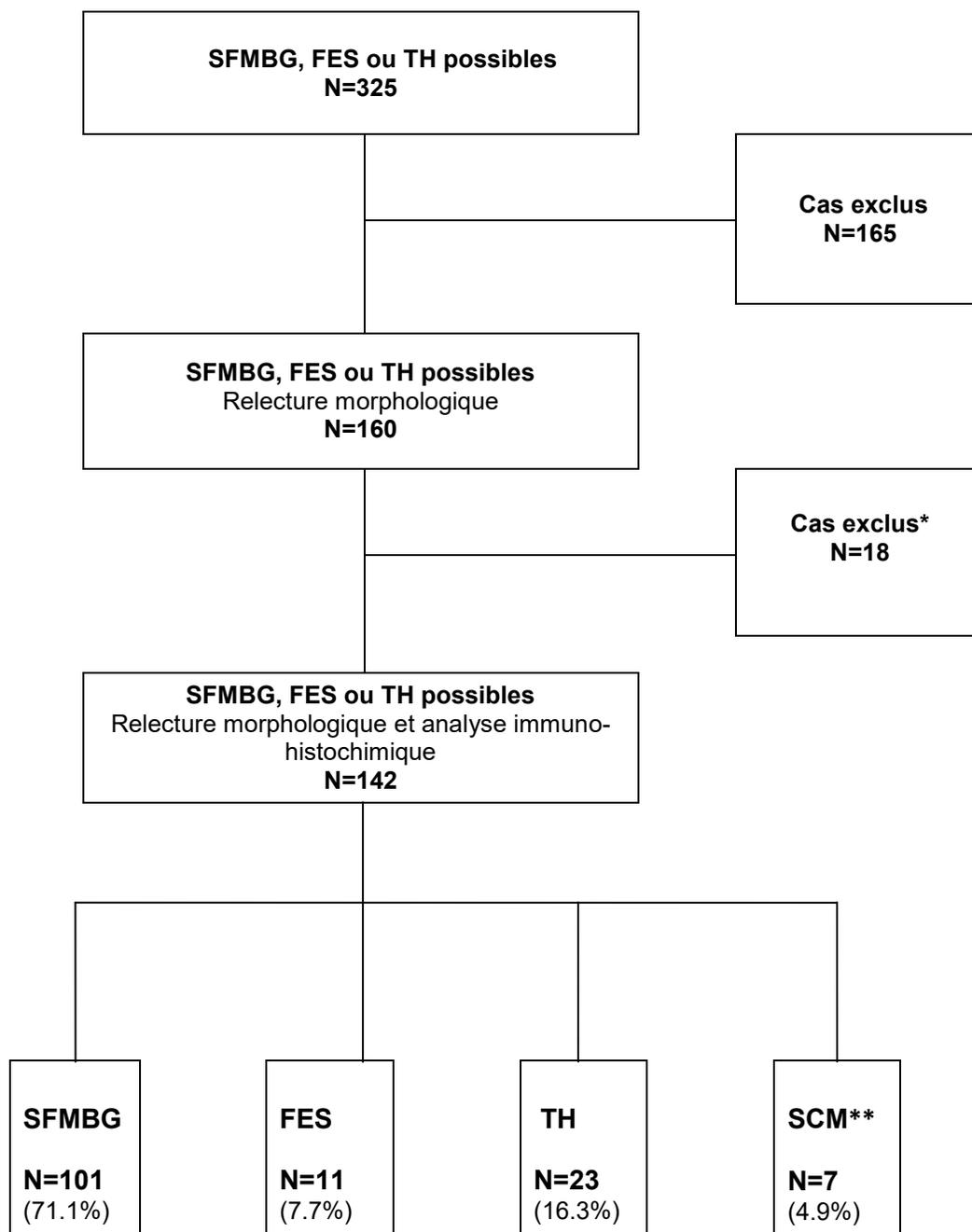
# RESULTATS

## 1. Flow chart de l'étude et répartition des cas en fonction des centres (figure 6 et tableau 1)

Au total, sur les 325 cas théoriques, du matériel tumoral était disponible pour 160 cas, provenant de 16 centres de référence (Centres anti-cancéreux ou Centre Hospitalo-Universitaires).

Sur les 160 cas, 18 ont été exclus: 2 cas de métastases, 5 cas de diagnostic erroné (un chondrosarcome mésoenchymateux, un liposarcome dédifférencié, un neurofibrome, une tumeur fibreuse à malignité intermédiaire inclassée, une tumeur fibreuse bénigne), 10 cas dont le matériel était épuisé et 1 cas fixé en Bouin vert.

Au final, 142 cas ont été inclus: 101 cas de SFMBG, 11 cas de FES, 23 cas de TH et 7 cas de sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes non marqués avec l'anticorps anti-MUC4 (SCM MUC4-). Ces 7 cas, morphologiquement compatibles avec l'une des trois entités étudiées (2 cas « SFMBG-like », 3 cas « FES-like » et 2 cas de « TH-like ») ont bénéficié d'un examen immunohistochimique exhaustif afin d'éliminer les diagnostics différentiels.



\* métastases (N=2), diagnostics erronés (N=5 ; un chondrosarcome mésenchymateux, un liposarcome dédifférencié, un neurofibrome, une tumeur fibreuse à malignité intermédiaire inclassée, une tumeur fibreuse solitaire), matériel épuisé ou non tumoral (N=11), fixation Bouin vert (N=1)

\*\* SCM = SCM MUC4- : sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes non marqués avec l'anticorps anti-MUC4, SFMBG : sarcomes fibromyxoides de bas grade, FES : fibrosarcomes épithélioïdes sclérosant, TH : tumeurs hybrides

Figure 6. Flow chart de l'étude

*Tableau 1. Répartition des 142 cas inclus en fonction du centre d'origine*

	CAS INCLUS (N=142)
CLCC LEON BERARD LYON	26 (18.3%)
INSTITUT BERGONIE BORDEAUX	22 (15.5%)
ICR TOULOUSE	16 (11.3%)
CHRU TOURS	16 (11.3%)
CHU TIMONE MARSEILLE	12 (8.5%)
NANCY	10 (7%)
IGR VILLEJUIF	10 (7%)
CHRU LILLE	7 (4.9%)
COCHIN PARIS	5 (3.5%)
INSTITUT CURIE	5 (3.5%)
CHU RENNES	4 (2.8%)
ICO PAUL PAPIN ANGERS	3 (2.1%)
CGFL DIJON	2 (1.4%)
ICM MONTPELLIER	2 (1.4%)
CLCC CAEN	1 (0.7%)
CHU CLERMONT-FERRAND	1 (0.7%)

## 2. Données cliniques

Après relecture histologique et immunohistochimique, 142 cas ont été inclus dont 101 cas de SFMBG, 11 cas de FES et 23 cas de TH et 7 cas de SCM MUC4- (*figure 7*). L'ensemble des données cliniques sont colligées dans le tableau 2.

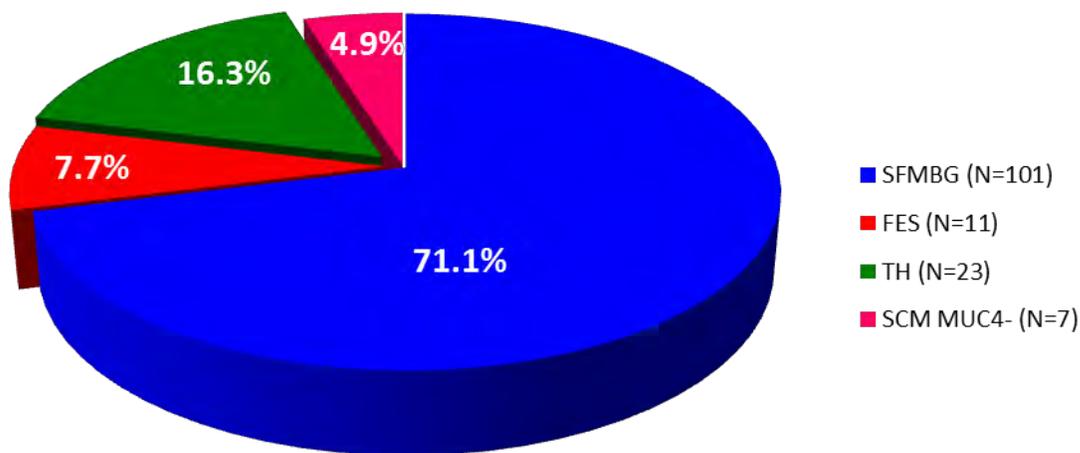


Figure 7. Répartition des cas en fonction des types histologiques

### 2.1 SFMBG

Parmi les 101 patients ayant un SFMBG, 54 (52.5%) concernent des hommes et 49 (47.5%) des femmes. L'âge au diagnostic est compris entre 4 et 70 ans avec une médiane de 40 ans.

49 cas (48.5%) se développent dans les membres inférieurs dont 61% dans la cuisse, 26 cas (25.7%) dans la paroi thoracique ou abdominale, 11 cas (10.9%) dans les membres supérieurs, 6 cas (5.9%) dans les viscères (4 localisations pulmonaires, 1 lo-

calisation hépatique), 3 cas (3.0%) dans la cavité thoracique ou abdominale et 3 cas (3.0%) dans la tête et le cou. Pour 3 cas, la localisation n'était pas précisée. Les tumeurs sont de localisation exclusivement profonde (sous-aponévrotique). La taille tumorale varie de 1.7 à 28 cm de grand axe avec une médiane de 5.6 cm.

## **2.2 FES**

Parmi les 11 patients ayant un FES, 6 (57.1%) concernent des femmes et 5 (42.9%) des hommes. L'âge au diagnostic est compris entre 13 et 79 ans avec une médiane de 56.5 ans.

3 cas (27.3%) se développent dans la paroi thoracique ou abdominale, 3 cas (27.3%) dans les membres inférieurs dont 33% dans la cuisse, 2 cas (18.2%) dans la cavité thoracique ou abdominale et 1 cas (9.1%) dans la tête et le cou. Pour 2 cas, la localisation n'était pas précisée. Les tumeurs sont de localisation exclusivement profonde (sous-aponévrotique). La taille tumorale varie de 3.7 à 15 cm de grand axe avec une médiane de 7.8 cm.

## **2.3 TH**

Parmi les 23 patients ayant une TH, 16 cas (68.0%) concernent des hommes et 7 cas (32.0%) des femmes. L'âge au diagnostic est compris entre 12 et 83 ans avec une médiane de 38 ans.

7 cas (30.4%) se développent dans la paroi thoracique ou abdominale, 6 cas (26.1%) dans les membres inférieurs dont 40% dans la cuisse, 4 cas (17.4%) dans les membres supérieurs, 2 cas (8.7%) dans la cavité thoracique ou abdominale, 2 cas (8.7%) dans les viscères (foie, vessie) et 1 cas (4.3%) dans la tête et le cou. Pour 1 cas, la localisation n'était pas précisée. Les tumeurs sont de localisation exclusivement profonde (sous-aponévrotique). La taille tumorale varie de 1.7 à 30 cm de grand axe avec une médiane de 5.5 cm.

#### **2.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4**

Parmi les 7 patients ayant un SCM MUC4 -, 3 cas (42.9%) concernent des hommes et 4 cas (57.1%) des femmes. L'âge au diagnostic est compris entre 12 et 57 ans avec une médiane de 32 ans.

4 cas (57.1%) se développent dans les membres inférieurs dont 50% dans la cuisse, 1cas (14.3%) dans la paroi thoracique ou abdominale et 2 cas (28.6%) dans les membres supérieurs. Les tumeurs sont de localisation exclusivement profonde (sous-aponévrotique). La taille tumorale varie de 3.2 à 9.5 cm de grand axe avec une médiane de 6.5 cm.

La comparaison de l'ensemble des données cliniques entre les quatre groupes de sarcomes ne met pas en évidence de différence clinique significative entre ces groupes ( $p>0.05$ ) (*tableau 2*).

Tableau 2. Caractéristiques cliniques des 142 cas confirmés après analyse morphologique et immunohistochimique

Type histologique	SFMBG	FES	TH	SCM* MUC4-	P
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<b>N</b>	101 (71.1)	11 (7.7)	23 (16.3)	7 (4.9)	
<b>Sexe</b>					0.3907
Homme	53 (52.5)	5 (42.9)	16 (68.0)	3 (42.9)	
Femme	48 (47.5)	6 (57.1)	7 (32.0%)	4 (57.1)	
<b>Age au diagnostic (années)</b>					0.2125
Médiane (range)	40 (4-70)	56 (13-79)	38 (12-83)	32 (12-57)	
<b>Localisation anatomique</b>					0.4442
Membre supérieur	11 (10.9)	0	4 (17.4)	2 (28.6)	
Membre inférieur	49 (48.5)	3 (27.3)	6 (26.1)	2 (28.6)	
Paroi thoracique/abdominale	26 (25.7)	3 (27.3)	7 (30.4)	2 (28.6)	
Intra-thoracique/abdominale	3 (3.0)	2 (18.2)	2 (8.3)	1 (14.3)	
Viscéral	6 (5.9)	0	2 (8.3)	0	
Tête et cou	3 (3.0)	1 (9.1)	1 (4.2)	0	
Non communiquée	3 (3.0)	2 (18.2)	1 (4.2)	0	
<b>Taille tumorale (cm)</b>					0.2095
Médiane	5.6	7.8	5.5	6.5	
(range)	(1.7-28.0)	(3.7-15.0)	(1.7-30)	(3.2-9.5)	

SCM MUC4- : sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes non marqués avec l'anticorps anti-MUC4, SFMBG : sarcomes fibromyoïdes de bas grade, FES : fibrosarcomes épithélioïdes sclérosant, TH : tumeurs hybrides

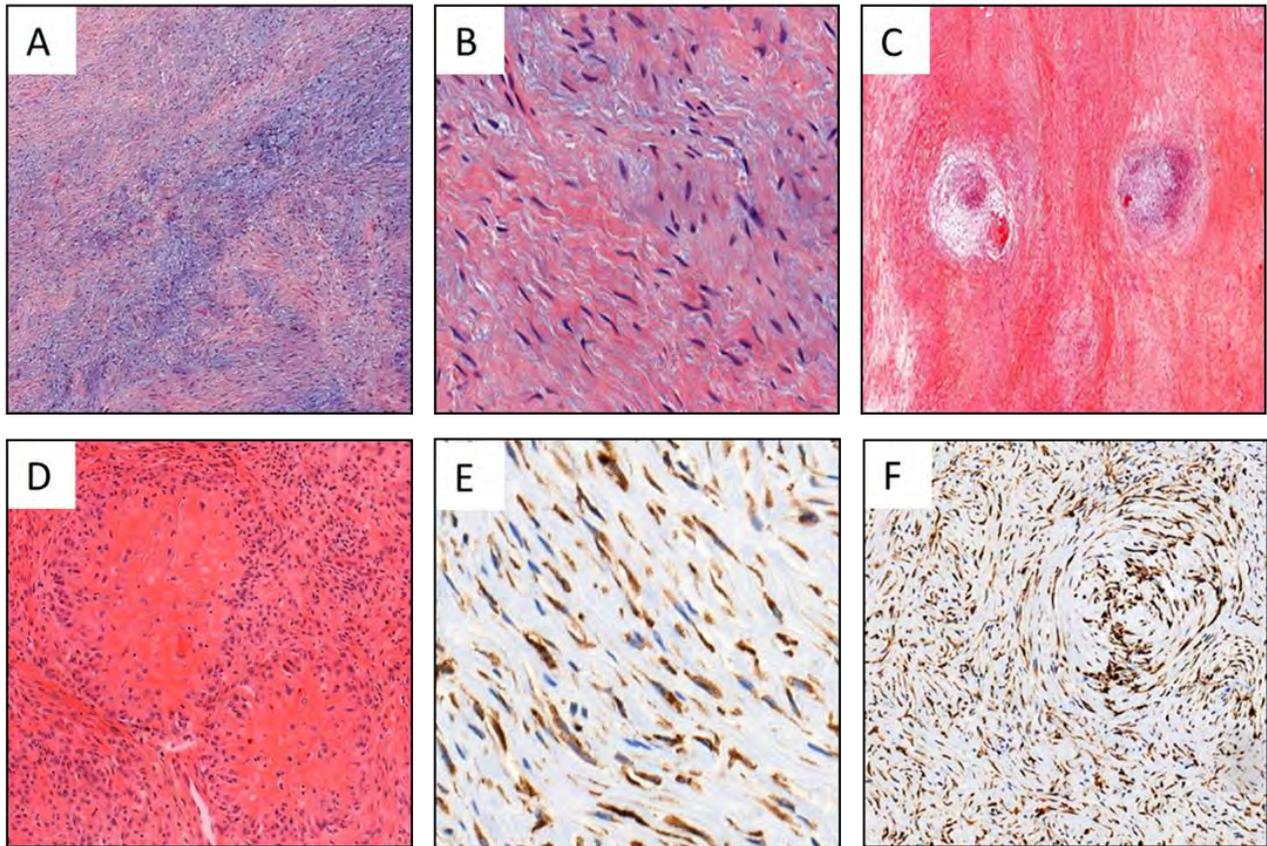
### **3. Caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques**

#### **3.1 SFMBG (figure 8)**

Parmi les 101 cas de SFMBG, la tumeur apparaît bien limitée dans 65 cas (64.4%) et mal limitée dans 18 cas (17.8%). L'architecture est faite de faisceaux ou enroulements dans 94 cas (93.0%), de cordons/nids dans 3 cas (3.0%) et d'architecture mixte (faisceaux et cordons) dans 4 cas (4.0%).

Le stroma apparaît myxoïde dans 23 cas (22.8%), fibreux dans 50 cas (49.5%) et mixte dans 28 cas (27.7%). La cellularité globale est élevée dans 9 cas (8.9%), modérée dans 70 cas (69.3%) et faible dans 22 cas (21.8%). Les cellules sont fusiformes dans 98 cas (97.0%), rondes/épithélioïdes dans 2 cas (2.0%) et mixtes dans 1 cas (1.0%). Les noyaux sont réguliers avec des atypies modérées dans les 101 cas (100%). Parmi les autres caractéristiques morphologiques notables, 4 cas (4.0%) présentent des calcifications, 3 cas (3.0%) des formations kystiques, 2 cas (2.0%) de la métaplasie osseuse et 2 cas (2.0%) des rosettes géantes collagéniques.

La totalité (100%) des SFMBG est de grade tumoral 1 (FNCLCC), avec un score 1 pour la différenciation, un score 1 pour les mitoses (90.3% des cas entre 0 et 1 mitose pour 10 champs au G40) et l'absence de nécrose tumorale (score 1).



(A), (B) : prolifération de cellules fusiformes monotones arrangées en faisceaux dans un stroma fibreux et myxoïde, (C) : alternance de zones fibreuses hypocellulaires et de nodules myxoïdes plus cellulaires, (D) : rosettes collagéniques géantes, (D) et (E) : expression cytoplasmique forte et diffuse avec l'anticorps anti-MUC4

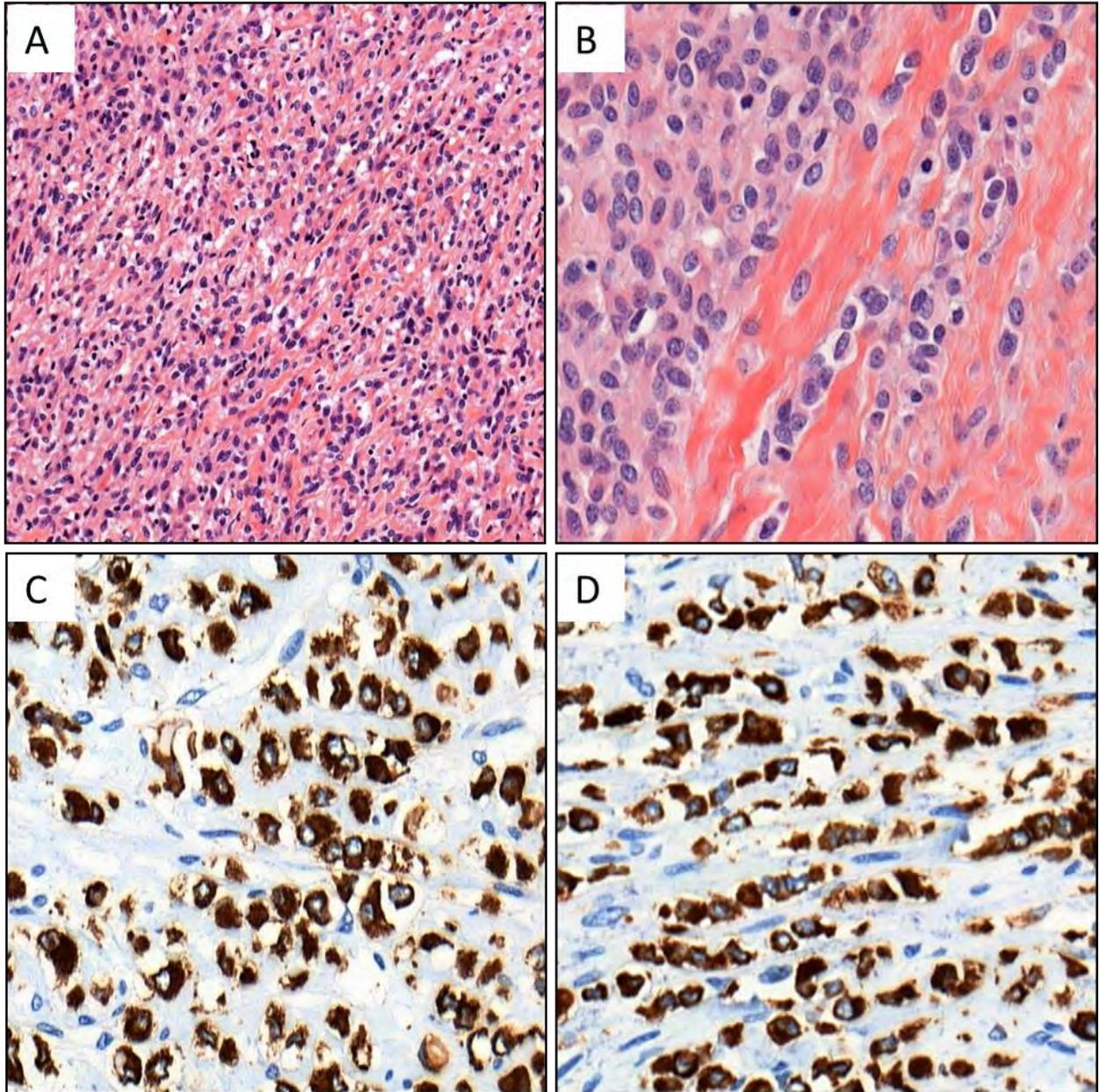
*Figure 8. Aspects morphologiques et immunohistochimique (anticorps anti-MUC4) des SFMBG*

### **3.2 FES (figure 9)**

Parmi les 11 cas de FES, la tumeur apparaît bien limitée dans 8 cas (72.7%) et mal limitée dans 1 cas (9.1%). L'architecture est faite de cordons/nids dans 9 cas (81.8%) et de faisceaux ou enroulements dans 2 cas (18%).

Le stroma apparaît fibreux dans 10 cas (90.9%) et myxoïde dans 1 cas (9.1%). La cellularité globale est élevée dans 9 cas (81.8%) et modérée dans 2 cas (18.2%). Les cellules sont rondes ou épithélioïdes dans 10 cas (90.9%) et fusiformes dans 1 cas (9.1%). Les noyaux sont réguliers avec des atypies modérées dans les 11 cas (100%). Parmi les autres caractéristiques morphologiques, 1 cas (9.1%) présente de la métaplasie osseuse.

Les FES sont de grade tumoral 2 (FNCLCC) dans 8 cas (72.7%) et de grade 3 dans 2 cas (18.2%), avec un score 3 de différenciation (100%). Le score de mitose est de 1 dans 7 cas (63.6%), de 2 dans 1 cas (9.1%) et de 3 dans 2 cas (18.2%). La nécrose tumorale (score 1, nécrose <50%) n'est présente que dans 1 cas (9.1%).



(A) :prolifération de cellules épithélioïdes monotones arrangées dans un stroma fibreux, (B) : agencement des cellules en cordons dans un stroma fibreux, mimant un carcinome lobulaire mammaire, (C) et (D) : expression cytoplasmique forte et diffuse avec l'anticorps anti-MUC4

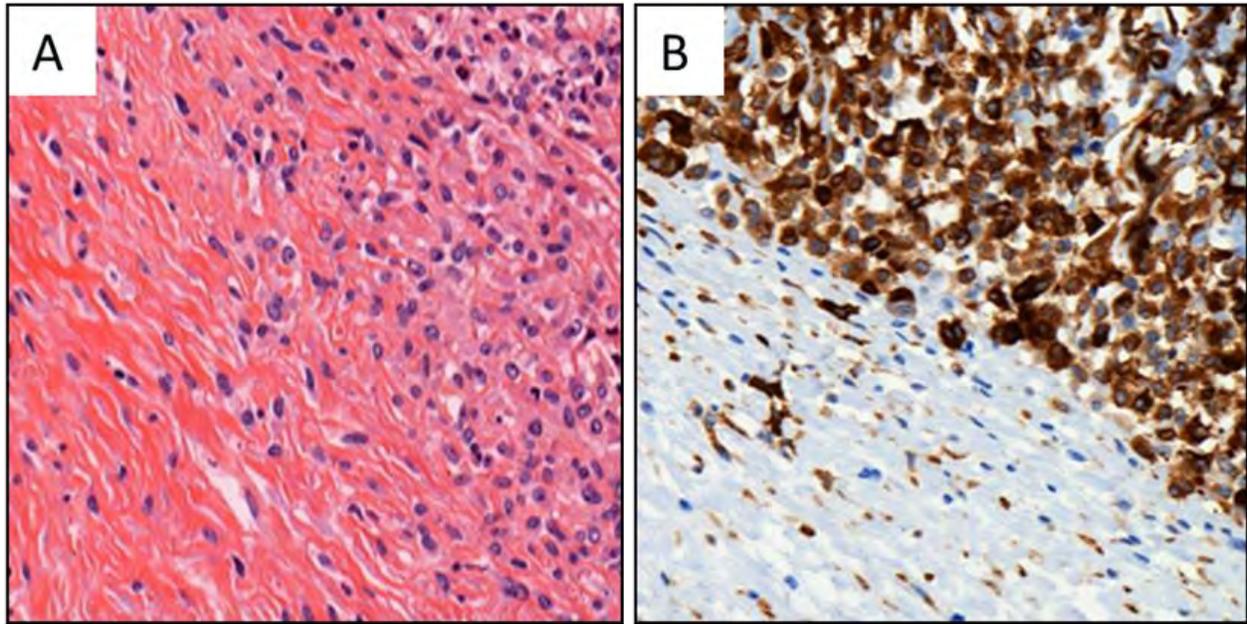
*Figure 9. Aspects morphologiques et immunohistochimiques (anticorps anti-MUC4) des FES*

### **3.3 TH (figure 10)**

Parmi les 23 cas de TH, la tumeur apparaît bien limitée dans 15 cas (65.2%) et mal limitée dans 3 cas (13.1%). L'architecture est faite de faisceaux ou enroulements dans 13 cas (56.5%), de cordons/nids dans 2 cas (8.7%) et d'architecture mixte (faisceaux et cordons) dans 8 cas (34.8%).

Le stroma apparaît myxoïde dans 1 cas (4.3%), fibreux dans 8 cas (34.8%) et mixte dans 14 cas (60.9%). La cellularité globale est élevée dans 11 cas (47.8%), modérée dans 11 cas (47.8%) et faible dans 1 cas (4.4%). Tous les cas (100%) présentent des cellules de morphologie mixte (contingent fusiforme et épithélioïde). Les noyaux sont réguliers avec des atypies modérées dans les 23 cas (100%). Parmi les autres caractéristiques morphologiques, 2 cas (8.8%) présentent des rosettes géantes collagéniques, 2 cas (8.8%) présentent des calcifications, 1 cas (4.3%) présente de la métaplasie chondroïde et 1 cas (4.3%) de la métaplasie osseuse.

Toutes les TH sont de grade tumoral 2 (FNCLCC) avec un score 3 de différenciation (100%), un index mitotique de score 1 (98.7% des cas entre 0 et 2 mitoses pour 10 champs au G40) et sans nécrose tumorale.



(A) Prolifération de cellules épithélioïdes (droite de la photo) et de cellules fusiformes (gauche de la photo) dans un stroma fibreux, (B) expression diffuse de l'anticorps anti-MUC4 dans les deux contingents cellulaires

*Figure 10. Aspects morphologiques et immunohistochimiques (anticorps anti-MUC4) des TH*

### **3.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4 (figure 11)**

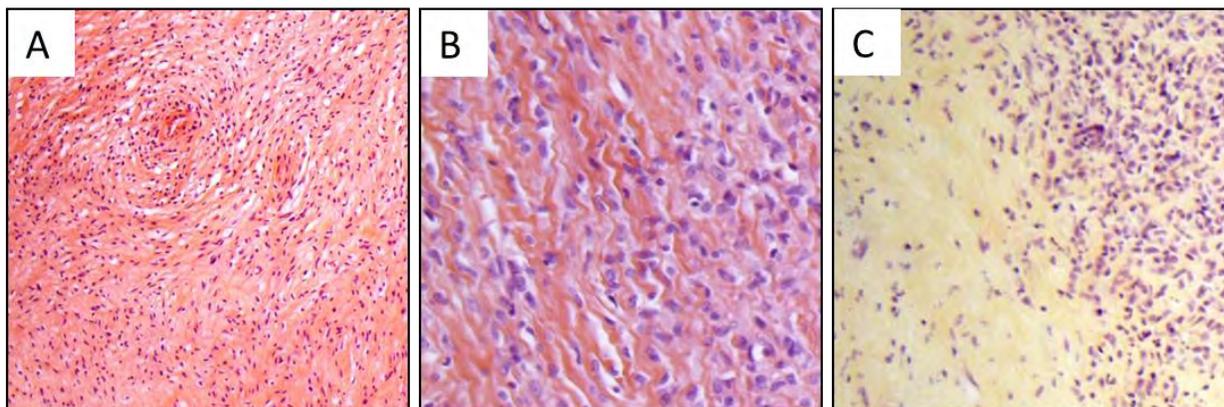
Parmi les 7 cas de SCM MUC4-, 2 cas présentent un aspect morphologique de SFMBG, 3 cas un aspect de FES et 2 cas un aspect de TH.

La tumeur apparaît bien limitée dans 4 cas (66.7%) et mal limitée dans 3 cas (33.3%). L'architecture est faite de faisceaux ou enroulements dans 2 cas (28.6%), de cordons/nids dans 3 cas (42.9%) et d'architecture mixte (faisceaux et cordons) dans 2 cas (28.6%).

Le stroma apparaît myxoïde dans 1 cas (14.3%), fibreux dans 5 cas (71.4%) et mixte

dans 1 cas (14.3%). La cellularité globale est élevée dans 2 cas (28.6%) et modérée dans 5 cas (71.4%). Les cellules sont rondes ou épithélioïdes dans 3 cas (42.9%), fusiformes dans 2 cas (28.6%) et mixtes dans 2 cas (28.6%). Les noyaux sont réguliers avec des atypies modérées dans les 7 cas (100%).

Les SCM sont de grade tumoral 1 (FNCLCC) dans 2 cas (28.6%), de grade 2 dans 4 cas (57.1%) et de grade 3 dans 1 cas (14.3%), avec un score 1 de différenciation dans 2 cas (28.6%) et un score 3 dans 5 cas (71.4%). Le score de mitose est de 1 dans 5 cas (71.4%), de 2 dans 1 cas (14.3%) et de 3 dans 1 cas (14.3%). Le score de nécrose tumorale est de 1 dans 6 cas (85.7%) et de 2 dans 1 cas (14.3%).



(A) NI=43 aspects « SFMBG-like », (B) NI=40 aspects « FES-like », (C) NI=3 aspects « TH-like »

Figure 11. Aspects morphologiques des SCM MUC4-

Tableau 3. Caractéristiques histologiques des 142 cas après analyse morphologique et immunohistochimique

	SFMBG N (%)	FES N (%)	TH N (%)	SCM MUC4- N (%)	P
<b>N</b>	101	11	23	7	
<b>Limitation</b>					0.7452
Bien limitée	65 (64.4)	8 (72.7)	15 (65.2)	4 (57.1)	
Mal limitée	18 (17.8)	1 (9.1)	3 (13.1)	2 (28.6)	
Non communiquée	18 (17.8)	2 (18.2)	5 (21.7)	1 (14.3)	
<b>Architecture</b>					<0.0001
Enroulements/faisceaux	94 (93.0)	2 (18.2)	13 (56.5)	4 (57.1)	
Cordons/nids	3 (3.0)	9 (81.8)	2 (8.7)	2 (28.6)	
Autre*	4 (4.0)	0	8 (34.8)	1 (14.3)	
<b>Stroma</b>					0.0018
Myxoïde	23 (22.8)	0	1 (4.3)	1 (14.3)	
Fibreux	50 (49.5)	11 (100)	8 (34.8)	5 (71.4)	
Mixte (myxoïde et fibreux)	28 (27.7)	0	14 (60.9)	1 (14.3)	
<b>Cellularité globale</b>					<0.0001
Elevée	9 (8.9)	9 (81.8)	11 (47.8)	2 (28.6)	
Modérée	70 (69.3)	2 (18.2)	11 (47.8)	5 (71.4)	
Faible	22 (21.8)	0	1 (4.4)	0	
<b>Cellules</b>					<0.0001
Fusifformes	98 (97.0)	0	0	2 (28.6)	
Rondes/épithélioïdes	2 (2.0)	11 (100)	0	3 (42.9)	
Mixtes**	1 (1.0)	0	23 (100)	2 (28.6)	
<b>Noyaux</b>					
Réguliers/atypies modérées	101 (100)	11 (100)	23 (100)	7 (100)	
Pléomorphes	0	0	0	0	
<b>Caractéristiques autres</b>	11 (11.0)	1 (9.1)	6 (26.1)	0	0.5798
Formations kystiques	3 (3.0)	0	0	0	
Métaplasie osseuse	2 (2.0)	1 (9.1)	1 (4.3)	0	
Métaplasie chondroïde	0	0	1 (4.3)	0	
Calcifications	4 (4.0)	0	2 (8.8)	0	
Rosettes géantes***	2 (2.0)	0	2 (8.8)	0	
<b>Grade tumoral FNCLCC</b>					<0.0001
Grade 1	101 (100)	0	0	2 (28.6)	
Grade 2	0	8 (72.2)	23 (100)	4 (57.1)	
Grade 3	0	2 (18.2)	0	1 (14.3)	
Non évaluable****	0	1 (9.1)	0	0	
<b>Différenciation tumorale</b>					<0.0001
1	101 (100)	0	1 (4.3)	2 (28.6)	
2	0	0	0	0	
3	0	10 (90.9)	22 (95.7)	5 (71.4)	
Non évaluable****	0	1 (9.1)	0	0	
<b>Mitoses</b>					<0.0001
1	101 (100)	7 (63.6)	23 (100)	5 (71.4)	
2	0	1 (9.1)	0	1 (14.3)	
3	0	2 (18.2)	0	1 (14.3)	
Non évaluable****	0	1 (9.1)	0	0	
<b>Nécrose tumorale</b>					0.0138
1	101 (100)	9 (81.8)	23 (100)	6 (85.7)	
2	0	1 (9.1)	0	1 (14.3)	
3	0	0	0	0	
Non évaluable****	0	1 (9.1)	0	0	

\* myxoïde et fibreux ; \*\* fusiformes et épithélioïdes ; \*\*\* rosettes géantes collagéniques ;\*\*\*\* tissu détérioré, SCM MUC4- : sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes non marqués avec l'anticorps anti-MUC4, SFMBG : sarcomes fibromyxoïdes de bas grade, FES : fibrosarcomes épithélioïdes sclérosant, TH : tumeurs hybrides

## 4. Caractéristiques moléculaires (FISH et RNA-seq)

Sur les 33 cas sélectionnés pour le séquençage ARN, 20 cas ont été validés (*annexe 6*). Parmi les 13 cas non séquencés, 5 cas ont une quantité d'ARN insuffisante et 8 cas présentent un ARN trop dégradé pour être séquencé, avec une DV200 inférieure à 30% (*figures 12 et 13*).

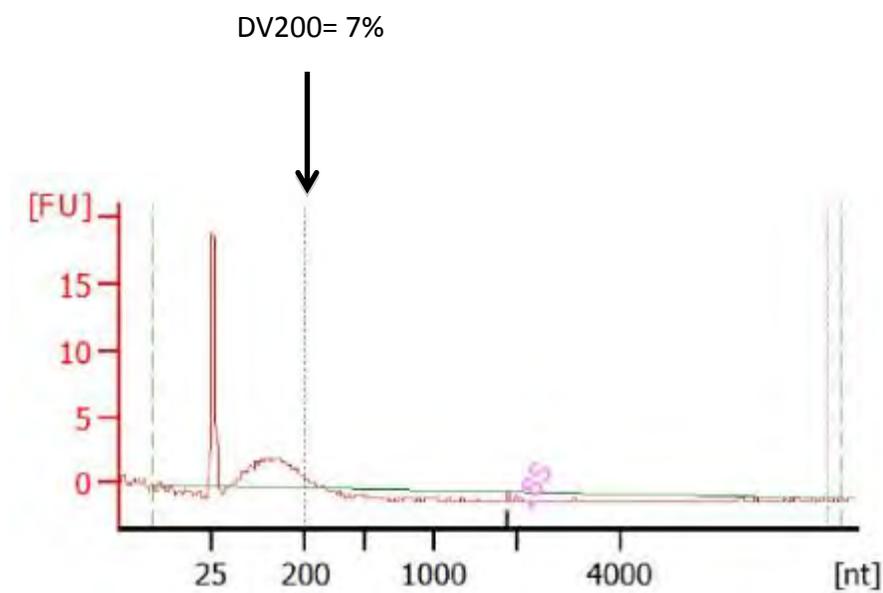


Figure 12. Exemple d'échantillon trop dégradé (n°77)

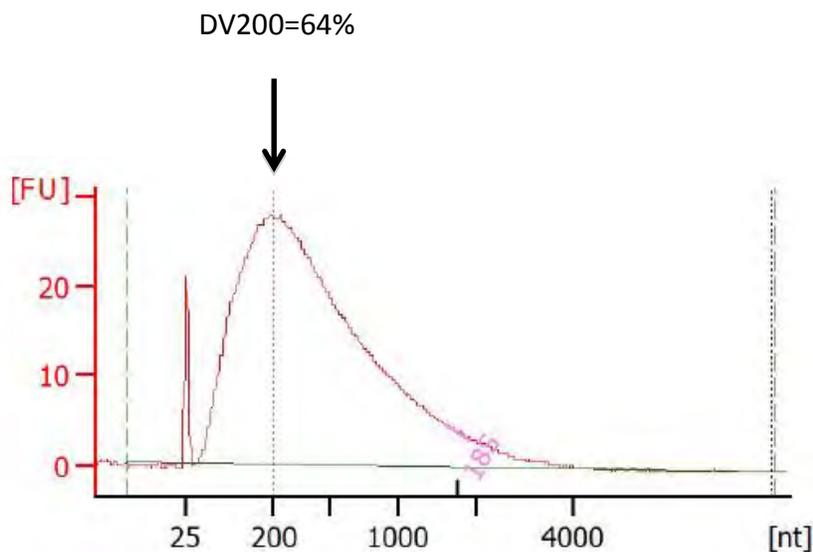


Figure 13. Exemple d'échantillon de bonne qualité (cas n°147)

Les résultats de FISH et de RNA-Seq sont résumés dans les figures suivantes (Figures 13 à 15), pour chaque type histologique.

En ce qui concerne la technique de FISH, un réarrangement du gène est symbolisé par un « + » et une absence de réarrangement est symbolisé par un « - ».

Sur les 20 cas tous confondus ayant bénéficié d'une analyse en RNA-seq, l'analyse bioinformatique a été réalisée à l'aide de l'algorithme Defuse, mettant en évidence 8554 potentiels transcrits de fusion. Après élimination des transcrits non pertinents (probabilité faible, séquences répétées...) restaient 231 candidats. Sur ces derniers cas, seuls les transcrits s'alignant correctement sur la séquence génomique de référence (version GRCh37 du génome humain) ont été conservés.

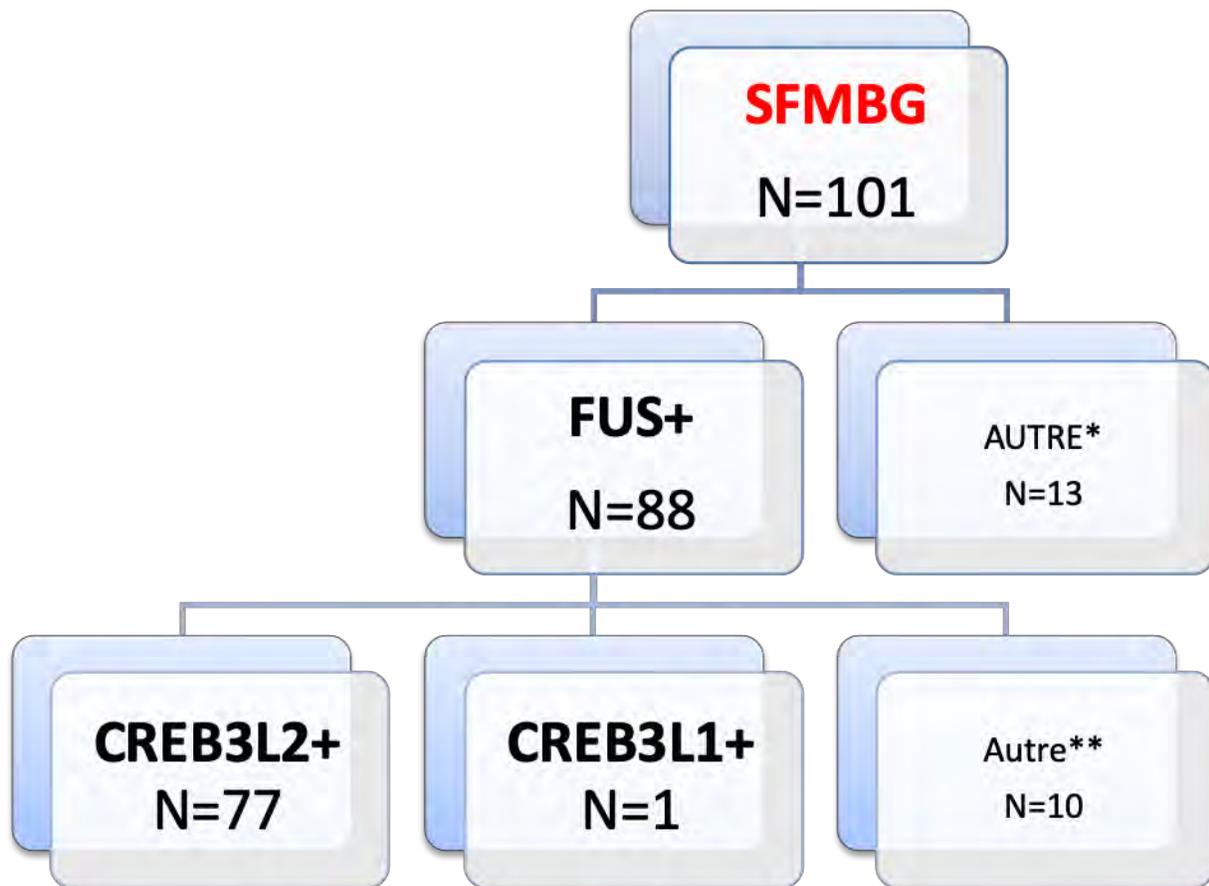
## 4.1 SFMBG (figure 14)

### 4.1.1 Données de FISH

Parmi les 101 cas de SFMBG :

- ◆ 88 cas (87.1%) présentent un réarrangement du gène *FUS* dont :
  - 77 cas (87.5%) présentent un réarrangement du gène *CREB3L2*
  - 1 cas (1.1%) présente un réarrangement du gène *CREB3L1*
  - 2 cas (2.3%) présentent un réarrangement déséquilibré de *CREB3L2*
  - 5 cas (5.7%) ne présentent pas de réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1* (3 de ces cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq)
  - 3 cas (3.4%) de FISH *CREB3L2* sont ininterprétables
  
- ◆ 13 cas (12.9%) ne mettent pas en évidence de réarrangement du gène *FUS* dont :
  - 7 cas (53.8%) ne présentent pas de réarrangement du gène *FUS* (5 de ces 7 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq)
  - 6 cas (46.2%) de FISH *FUS* sont ininterprétables (2 de ces 6 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

Treize des cas sus-cités, pour lesquels la FISH ne mettait pas en évidence de réarrangement du gène *FUS* ou n'était pas interprétable, n'ont pu bénéficier d'une analyse en RNA-Seq (sur tissu FFPE) du fait d'un ARN tumoral en quantité insuffisante ou trop dégradé.



\*7 cas de FISH sans réarrangement du gène *FUS* (5 de ces 7 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq), 6 cas de FISH *FUS* sont non interprétables (2 de ces 6 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

\*\*2 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L2*, 5 cas de FISH sans réarrangement de *CREB3L2* et *CREB3L1* (3 de ces cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq), 3 cas de FISH *CREB3L2* non interprétables

Figure 14. Caractéristiques en FISH dans le groupe des SFMBG

## 4.1.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique

Les données de séquençage, après analyse bioinformatique, des 10 cas de SFMBG répertoriés *figure 14* sont résumées dans le tableau ci-dessous (*tableau 5*) :

*Tableau 5. Transcrits de fusion en RNA-Seq dans le groupe des SFMBG*

Numéro d'inclusion	FISH	RNA-sequencing (Transcrits de fusion)
<b>N°8</b>	<i>FUS-</i>	Absence de transcrit de fusion
<b>N°32</b>	<i>FUS+, CREB3L2-, CREB3L1-</i>	AC091167.3-MUC4 C4orf32-ATF2 COL1A2-RN7SL1 COL6A1-RN7SL1 H19-RN7SL1 IGF2-H19 MUC4-RN7SL1/RN7SL2/RN7SL3 RN7SL5P-MUC4
<b>N°39</b>	<i>FUS-</i>	RN7SK-MGST2 EYA3-RN7SL2
<b>N°90</b>	<i>FUS-</i>	IGF2-SLC12A1
<b>N°96</b>	<i>FUS+, CREB3L2-, CREB3L1-</i> , Réarrangement déséquilibré de <i>JAZF1</i> (RT-PCR de validation en cours)	JAZF1-MXD4
<b>N°97</b>	FISH <i>FUS</i> non interprétable	ACTR1A-ZNF141
<b>N°104</b>	FISH <i>FUS</i> non interprétable	RNU6-2-TCP1
<b>N°133</b>	<i>FUS-</i>	KANK2-PRKCQ RAB1A-DAPL1 RNU6-6P-SNORD3A
<b>N°138</b>	<i>FUS+, CREB3L2-, CREB3L1-</i>	RNU6-6P-SNORA57
<b>N°147</b>	<i>FUS-</i>	RNU6-15P-SNORA57

SFMBG : sarcomes fibromyxoides de bas grade

## 4.2 FES (figure 15)

### 4.2.1 Données de FISH

Parmi les 11 cas de FES :

◆ 7 cas (63.6%) présentent un réarrangement du gène *EWSR1* dont :

-3 cas (42.9%) présentent un réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L1*

-2 cas (28.6%) de FISH ne présentent pas de réarrangement du gène *CREB3L1*

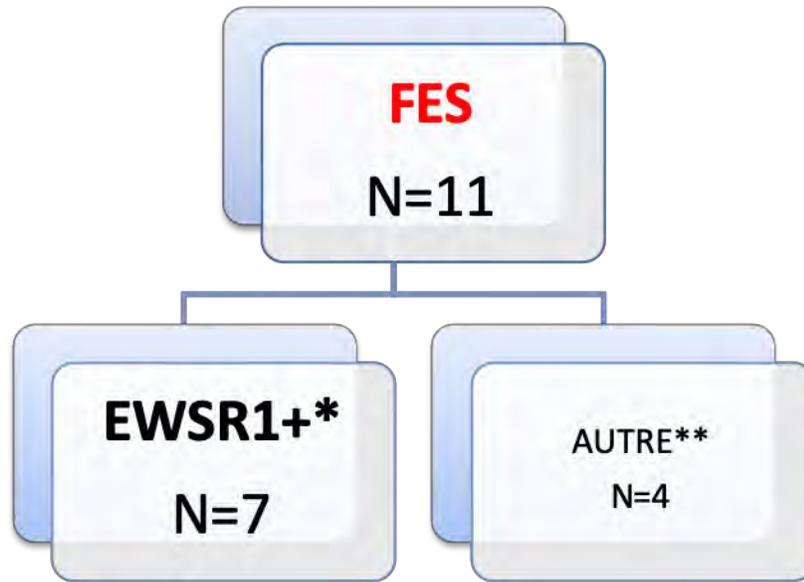
-2 cas (28.6%) de FISH *CREB3L1* sont ininterprétables

◆ 4 cas (36.4%) ne mettent pas en évidence de réarrangement du gène *EWSR1* dont :

-2 cas (50%) présentent un réarrangement déséquilibré du gène *EWSR1* (ces 2 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq)

- 2 cas (50%) de FISH *EWSR1* sont ininterprétables (1 de ces cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

Huit des cas sus-cités, pour lesquels la FISH ne mettait pas en évidence de réarrangement du gène *EWSR1* ou n'était pas interprétable, n'ont pu bénéficier d'une analyse en RNA-Seq (sur tissu FFPE) du fait d'un ARN tumoral en quantité insuffisante ou trop dégradé.



\* 3 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L1*, 2 cas de FISH sans réarrangement du gène *CREB3L1*, 2 cas de FISH *CREB3L1* non interprétable

\*\*2 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *EWSR1* (ces 2 cas ont bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq), 2 cas de FISH *EWSR1* non interprétables (1 de ces cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq)

*Figure 15. Caractéristiques en FISH dans le groupe des FES*

#### 4.2.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique

Les données de séquençage, après analyse bioinformatique, des 3 cas de FES répertoriés *figure 15* sont résumées dans le tableau ci-dessous (*tableau 6*) :

*Tableau 6. Transcrits de fusion en RNA-Seq dans le groupe des FES*

Numéro d'inclusion	FISH	RNA-Sequencing (transcrits de fusion)
N°4	Réarrangement déséquilibré du gène <i>EWSR1</i>	<i>CREB3L1-EWSR1</i>
N°73	Réarrangement déséquilibré du gène <i>EWSR1</i>	<i>CREB3L1-EWSR1</i>
N°105	FISH <i>EWSR1</i> non interprétable	<i>TNIP1-CCDN2</i>

FES: fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants

## 4.3 TH (figure 16)

### 4.3.1 Données de FISH

Parmi les 23 cas de TH :

◆ 8 cas (34.8%) présentent un réarrangement du gène *FUS* dont :

- 4 cas (50%) présentent un réarrangement du gène *CREB3L2*
- 1 cas (12.5%) présente un réarrangement du gène *CREB3L1*
- 2 cas (25%) présentent un réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L2*
- 1 cas (12.5%) ne présente pas de réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1* (cas ayant bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

◆ 6 cas (26.1%) présentent un réarrangement du gène *EWSR1* dont :

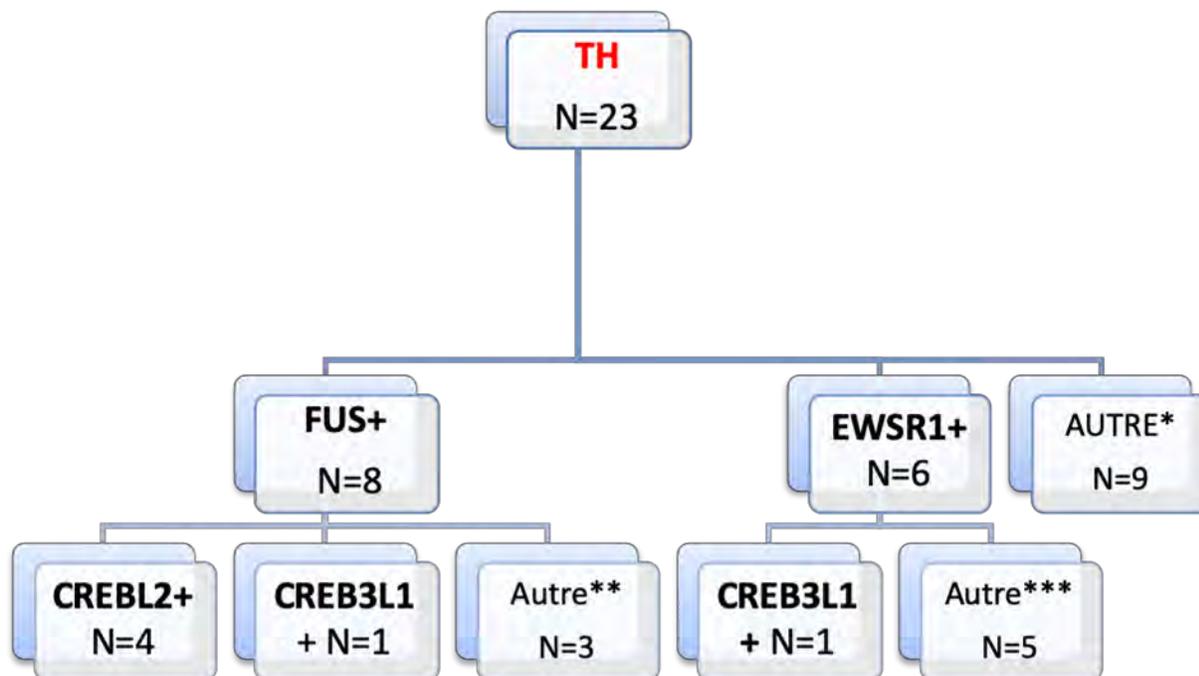
- 1 cas (16.7%) présente un réarrangement du gène *CREB3L1*
- 1 cas (16.7%) présente un réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L2* (cas ayant bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq),
- 3 cas (50%) présentent un réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L1*
- 1 cas (16.7%) ne présente pas de réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1*.

Neuf cas (39.1%) ne mettent pas en évidence de réarrangement des gènes *CREB3L2* et *EWSR1* dont :

- 1 cas (11.1%) présente un réarrangement déséquilibré du gène *FUS*
- 1 cas (11.1%) présente un réarrangement déséquilibré du gène *EWSR1*
- 4 cas (44.4%) ne présentent pas de réarrangement des gènes *CREB3L2* et *EWSR1* (dont 1 cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq)

-3 cas (33.3%) de FISH *FUS* et *EWSR1* sont ininterprétables (dont 1 cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

Treize des cas sus-cités, pour lesquels la FISH ne mettait pas en évidence de réarrangement des gènes *FUS* et *EWSR1* ou n'était pas interprétable, n'ont pu bénéficier d'une analyse en RNA-Seq (sur tissu FFPE) du fait d'un ARN tumoral en quantité insuffisante ou trop dégradé.



\*1 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *EWSR1*, 1 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *FUS*, 4 cas de FISH sans réarrangement des gènes *FUS* et *EWSR1* (dont 1 cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq), 3 cas de FISH non interprétables (dont 1 cas a bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

\*\*2 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L2*, 1 cas de FISH sans réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1* (cas ayant bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq).

\*\*\*1 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L2* (cas ayant bénéficié d'un séquençage en RNA-Seq), 3 cas de FISH avec réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L1*, 1 cas de FISH sans réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1*.

Figure 16. Caractéristiques en FISH dans le groupe des TH

### 4.3.2 Données de RNA-Seq après analyse bioinformatique

Les données de séquençage, après analyse bioinformatique, des 4 cas de TH répertoriés *figure 16* sont résumées dans le tableau ci-dessous (*tableau 7*) :

Tableau 7. Transcrits de fusion en RNA-Seq dans le groupe des TH

Numéro d'inclusion	FISH	RNA-Sequencing (transcrits de fusion)
N°9	<i>FUS+</i> , <i>CREB3L2-</i> , <i>CREB3L1-</i>	MTMR12-GAS5 RNU6-6P-SNORD3C
N°36	<i>EWSR1+</i> avec réarrangement déséquilibré du gène <i>CREB3L2</i>	TNC-RALGDS
N°84	FISH <i>FUS</i> non interprétable (fixation au Bouin)	TNIP1-CCDN2
N°91	<i>FUS-</i> , <i>EWSR1-</i>	FUS-VMP1

TH: tumeurs hybrides

#### **4.4. Sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes négatifs avec l'anticorps anti-MUC4 (tableau 7)**

L'ensemble des caractéristiques cliniques, morphologiques et moléculaires des 7 cas de SCM MUC4- sont répertoriées tableau 7.

1 des 2 cas de sarcomes à cellules monotones fusiformes (évoquant des SFMBG) ne présente pas de réarrangement du gène *FUS* en technique FISH et son étude en RNA-seq met évidence deux transcrits de fusion, MTND1P23 – PDZRN4 et CDY3P – RP11-809N8.5.

Pour le second cas, la FISH *FUS* est d'interprétation difficile et la FISH *CREB3L2* non interprétable. Une RT-PCR pour recherche de transcrit *FUS-CREB3L2* est en cours.

Concernant les 3 cas de sarcomes à cellules monotones épithélioïdes (évoquant des FES), l'un deux présente un réarrangement du gène *EWSR1* en FISH sans réarrangement des gènes *CREB3L2* et *CREB3L1*. Les 2 autres cas ne présentent pas de réarrangement des gènes *FUS* et *EWSR1* et 1 cas possède un potentiel transcrit de fusion YIPF5-TRIO en cours de validation en RT-PCR.

Concernant les 2 cas de sarcomes à cellules monotones épithélioïdes et fusiformes (évoquant des TH), aucun ne présente de réarrangement des gènes *FUS* et *EWSR1* en FISH. L'un des deux cas présente un transcrit de fusion KAMT2A-YAP1, en cours de validation en RT-PCR.

Tableau 7. Caractéristiques morphologiques et moléculaires des 7 SCM MUC4-

Numéro d'inclusion	NI=3	NI=40	NI=43	NI=98	NI=111	NI=149	NI=150
<b>Age au diagnostic</b>	54	20	32	57	12	22	55
<b>Sexe</b>	H	F	F	F	H	F	H
<b>Localisation</b>	Cuisse	Creux axillaire	Avant-pied	Cuisse	Coude	Fesse	Epaule
<b>Taille tumorale (cm)</b>	9.5	7	6.5	3.7	3.2	6.5	4.5
<b>Diagnostic suspecté</b>	TH	FES	SFMBG	FES	SFMBG	TH	FES
<b>Architecture</b>	Mixte	Cordons/nids	Faisceaux	Cordons/nids	Faisceaux	Mixte	Faisceaux
<b>Stroma</b>	Mixte	Fibreux	Fibreux	Fibreux	Fibreux	Fibreux	Mixte
<b>Cellularité globale</b>	Modérée	Modérée	Modérée	Elevée	Modérée	Modérée	Elevée
<b>Aspect des cellules</b>	Mixte	Epithelioides	Fusifformes	Epithelioides	Fusifformes	Mixte	Epithélioïdes
<b>Noyaux</b>	Réguliers	Réguliers	Réguliers	Réguliers	Réguliers	Réguliers	Réguliers
<b>Grade FNCLCC</b>	3	2	1	3	1	2	2
Différenciation tumorale	3	3	1	3	1	3	3
Index mitotique	3	1	1	2	1	1	1
Nécrose tumorale	1	1	1	1	1	1	1
<b>FISH</b>	FUS- EWSR1-	EWSR1+ CREB3L1-	FUS-	EWSR1-	FUS-	FUS-	EWSR1- CREB3L1-
<b>RT-PCR</b>					FUS-CREB3L2 EN COURS		
<b>RNA-seq</b>	KAMT2A-YAP1		MTND1P23- PDZRN4  CDY3P – RP11- 809N8.5	YIPF5-TRIO			

SCM MUC4- : sarcomes à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes non marqués avec l'anticorps anti-MUC4

# DISCUSSION

Au total, 101 cas de SFMBG, 11 cas de FES et 23 cas de TH ont été analysés dans notre étude. Il s'agit de la plus grande cohorte, multicentrique, décrite pour ces types histologiques, et qui soit caractérisée d'un point de vue morphologique, immunohistochimique et bientôt totalement d'un point de vue moléculaire.

L'analyse des premières données cliniques n'a pas mis en évidence de différence significative entre les différents sous-types, possiblement du fait du faible nombre de cas de FES et TH comparé au groupe des SFMBG. On remarque cependant une tendance à un âge au diagnostic plus élevé dans le groupe des FES avec une médiane d'âge de 16 ans supérieure à celle du groupe des SFMBG et de 19 ans supérieure à celle du groupe des TH. Cette tendance n'est pas surprenante au vu du plus grand nombre d'altérations génomiques que présentent les FES comparé au groupe des SFMBG; en effet, il est possible de faire le parallèle avec d'autres types de sarcomes touchant des sujets jeunes qui possèdent de manière classique un profil génomique simple (ex : sarcome d'Ewing, synoviosarcome) et les sarcomes touchant les sujets de plus de 50 ans et possédant un profil génomique complexe (ex : sarcome indifférencié, liposarcome pléomorphe).

De même, aucune différence significative entre les proportions d'hommes et de femmes dans les différents sous-types n'a été mise en évidence. Cette constatation va à l'encontre d'autres études qui rapportent une prédominance féminine dans le groupe des FES comparé au groupe des SFMBG dans des séries de petite taille (18 et 10 cas de FES) (3,49).

Sur le plan histologique, les caractéristiques de l'ensemble des SFMBG et FES sont concordantes avec les données de la littérature. Les remaniements (métaplasie chondroïde, calcifications etc.) sont présents de manière sporadique et aspécifique dans les trois sous-types histologiques. De manière attendue, les rosettes géantes collagéniques ne sont visibles que dans les SFMBG et les TH.

Les TH, qui constituent une entité mal définie, présentent dans notre cohorte des contingents à cellules épithélioïdes et fusiformes en proportions variables sans

qu'aucune caractéristique morphologique particulière n'ait pu être corrélée au type d'altération génomique associé.

Sur le plan immunohistochimique, et en se référant aux données de la littérature et des critères diagnostiques de la dernière classification OMS 2013 des « Tumeurs des Tissus Mous et de l'Os », nous sommes partis du postulat que tous les SFMBG, toutes les TH et qu'une majorité des FES étaient marqués avec l'anticorps anti-MUC4. La surexpression de la protéine MUC4 dans les SFMBG étant liée à une dérégulation du gène *MUC4* (46) (sans rôle encore démontré dans leur tumorigenèse) et au vu de la forte homologie entre les gènes *FUS* et *EWSR1* qui codent tous deux pour une protéine de liaison à l'ARN de la famille FET (67,68), on peut se demander si la surexpression de la protéine MUC4 dans les FES ne serait pas également due à une dérégulation du gène *MUC4* par des mécanismes similaires, venant appuyer la théorie du continuum lésionnel entre les SFMBG et les FES. Cependant, sur les 7 cas de sarcomes à cellules fusiformes et/ou épithélioïdes qui ne présentaient pas d'expression de la protéine MUC4 en immunohistochimie mais dont la morphologie était typique des sarcomes visés par notre étude, 1 cas présentant les caractéristiques morphologiques des FES comporte un réarrangement du gène *EWSR1* (sans réarrangement associé des gènes *CREB3L1* et *CREB3L2*); ce cas va dans le sens des données de la littérature dans lesquelles la proportion de cas de FES présentant une négativité avec l'anticorps anti-MUC4 varie de 70 à 86% dans des cohortes de taille sensiblement équivalente à la nôtre (49,64).

Sur le plan moléculaire, les données sont également concordantes avec les dernières études réalisées.

La grande majorité des SGMBG présente un réarrangement du gène *FUS* (87.1%) avec le gène *CREB3L2* comme partenaire majoritaire (86.4%). Le seul cas de réarrangement du gène *FUS* possédant comme partenaire le gène *CREB3L1* peut se discuter comme étant une TH dont le contingent à cellules épithélioïdes n'aurait pas été prélevé lors de l'examen macroscopique. En effet, il existe un biais lié à l'inclusion non exhaustive de la tumeur, d'autant plus marqué que les prélèvements sont de petite taille (cas des microbiopsies notamment).

En ce qui concerne les FES, la majorité des cas présente un réarrangement du gène *EWSR1* (81.8%). Ce chiffre est comparable aux données de la littérature qui évaluent

le réarrangement du gène *EWSR1* dans environ 90% des cas (64,65).

Seuls 2 de ces cas (22.2%) présentent un réarrangement du gène *CREB3L1*, qui est réarrangé dans 40 à 71% des cas de FES selon les études (49,64,65,76), mais ces données sont encore provisoires en attendant les résultats de la RT-PCR (pour le cas présentant un réarrangement déséquilibré du gène *CREB3L1*) et les données du RNA-Sequencing.

Concernant les TH, les gènes *FUS* et *EWSR1* sont réarrangés respectivement dans 34.8% et 26.1% des cas. Ces résultats diffèrent des études antérieures dans lesquelles plus de 90% des TH présentent un réarrangement du gène *FUS* mais sur un faible nombre de cas (8 cas dans la plus grosse étude) (49,59,64,73). Nos données, plutôt en faveur d'un réarrangement des gènes *EWSR1* et *FUS* en proportion équivalente, sont là encore provisoires et ne permettent pas de conclure formellement; en effet, sur les 23 TH analysées, 8 cas présentent un réarrangement déséquilibré des gènes *CREB3L2*, *CREB3L1* ou *EWSR1* pour lequel une analyse complémentaire par RT-PCR est en cours et permettra de donner des résultats définitifs. Ces résultats préliminaires permettent toutefois d'appuyer encore la théorie d'un continuum lésionnel (morphologique, immunohistochimique et moléculaire, du fait de l'homologie entre les gènes *EWSR1* et *FUS*) entre les SFMBG et les FES dont les TH seraient une forme de transition partageant les caractéristiques morphologiques et moléculaires de chacune des deux entités.

Sur les 17 cas de tumeurs marquées avec l'anticorps anti-MUC4 pour lesquelles nous ne disposons pas de l'un ou des deux partenaires de fusion, l'analyse en RNA-Sequencing permet de confirmer le diagnostic de 2 cas de FES (présentant un réarrangement déséquilibré du gène *EWSR1* en FISH) en mettant en évidence le transcrite de fusion *EWSR1-CREB3L1*.

Les 12 autres cas analysés en RNA-Seq à partir de tissu FFPE présentent des transcrits de fusion parfois multiples. Une analyse complémentaire par RT-PCR est en cours pour valider la présence de ces transcrits. Si la RT-PCR ne permet pas de valider les transcrits de fusion mis en évidence, et du fait des limites liées à des ARN tumoraux de qualité variable sur tissu FFPE, une nouvelle analyse de ces cas en RNA-Seq sera réalisée sur tissu congelé ; en effet, l'analyse de nos données de séquençage montre

que le nombre de lectures par échantillon varie de 16 à 75%, c'est-à-dire que sur 100 ARN d'un échantillon, 16 à 75% des ARN sont séquencés, avec une probabilité parfois élevée (pour les valeurs les plus basses) de ne pas mettre en évidence un transcrit de fusion qui existerait et à l'inverse de mettre en évidence un transcrit de fusion non existant.

Les 34 autres cas n'ayant pu être caractérisés totalement du fait d'un ARN en quantité ou qualité insuffisantes vont également bénéficier d'une analyse en RNA-Seq sur tissu tumoral congelé pour obtenir leur caractérisation moléculaire complète.

Lors de la relecture et de l'analyse immunohistochimique des cas de la cohorte, nous avons isolé 7 cas présentant les caractéristiques morphologiques typiques d'une des 3 catégories (2 cas « SFMBG-like », 3 cas « FES-like » et 2 cas « TH like ») mais sans surexpression immunohistochimique de la protéine MUC4 par les cellules tumorales. L'analyse des données cliniques et morphologiques de ces cas ne montre pas de spécificité notable. Parmi les 2 cas présentant les caractéristiques des SFMBG, 1 cas présente deux transcrits de fusion n'impliquant pas les gènes *FUS* et *CREB3L2* et en cours de validation par RT-PCR. L'autre cas, difficilement interprétable en technique FISH, est en cours d'analyse par RT-PCR avec des amorces visant les gènes *FUS* et *CREB3L2*.

Parmi les 3 cas présentant les caractéristiques des FES, 1 cas présente un réarrangement du gène *EWSR1* en FISH, pouvant possiblement correspondre à un FES négatif pour le marquage avec l'anticorps anti-MUC4, comme discuté plus haut. Le second cas ne présente pas de réarrangement du gène *EWSR1* en FISH; ces 2 cas seront secondairement séquencés en RNA-Seq. Le dernier cas possède un potentiel transcrit de fusion YIPF5-TRIO en cours de validation par RT-PCR.

Parmi les 2 cas présentant les caractéristiques des TH, aucun ne présente de réarrangement des gènes *FUS* et *EWSR1* en FISH. L'un des cas a été séquencé et présente un transcrit de fusion *KAMT2A-YAP1*. Ce transcrit de fusion a récemment été décrit dans la littérature (77) chez une patiente de 20 ans qui présentait, au niveau de la cuisse, un sarcome inclassé de morphologie mixte fusiforme et épithélioïde, d'évolution agressive, avec métastases pulmonaires et décès à trois ans. Une étude en RT-PCR est actuellement en cours pour valider ce deuxième cas de sarcome inclassé à cellules

rondes et fusiformes avec transcrit de fusion KAMT2A-YAP1. Le second cas de potentielle TH va bénéficier d'un séquençage en RNA-Sequencing.

Les 7 cas de SCM sans surexpression de la protéine MUC4, et correspondant morphologiquement à l'une des trois entités étudiées (SFMBG, FES ou TH), pourraient correspondre soit à des cas présentant des transcrits de fusion alternatifs à ceux classiquement décrits et impliquant des gènes de la famille FET, homologues aux gènes *FUS* et *EWSR1*, mais sans dérégulation du gène MUC4, soit à des cas où l'analyse FISH ne permet pas de mettre en évidence le réarrangement des gènes *FUS*, *EWSR1*, *CREB3L2* et *CREB3L1* ; en effet, on sait par exemple que certains réarrangements dits « cryptiques » ne peuvent être mis en évidence par les techniques de FISH classiques. Les analyses moléculaires en cours viendront instruire nos hypothèses.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail, réalisé dans le cadre du projet SARRA (SARcomes RAres) à l'initiative du Groupe Sarcome Français, a permis de constituer la plus grande cohorte multicentrique décrite dans les SFMBG, FES et TH. Elle présente l'atout d'être caractérisée morphologiquement, d'un point de vue immunohistochimique et bientôt totalement d'un point de vue moléculaire. Cette stratégie (relecture histologique, analyses immunohistochimique et moléculaire systématiques) a permis d'obtenir une cohorte de grande taille, robuste et homogène qui va constituer le point de départ d'études complémentaires variées dont certaines sont actuellement en cours (signature pronostique moléculaire CINSARC) ou à venir (projet MIRAS-PRT-K 2018 sur l'analyse de l'environnement immunitaire tumoral et évaluation de l'intérêt d'une immunothérapie) afin d'améliorer in fine la prise en charge thérapeutique des patients porteurs de ces sarcomes rares.

Les analyses préliminaires réalisées sur cette cohorte de 101 cas de SFMBG, 11 cas de FES et 23 cas de TH, viennent appuyer les études antérieures sauf pour les TH où les données moléculaires en cours de finalisation semblent apporter des informations complémentaires plus exhaustives (du fait de la taille conséquente de cette série). Elles permettent notamment de préciser la démarche diagnostique pour les pathologistes en proposant l'utilisation de l'anticorps anti-MUC4 en routine devant tout sarcome à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes (associée à l'utilisation, si besoin, d'autres anticorps) et que devant un sarcome à cellules monotones fusiformes et/ou épithélioïdes suspect de SFMBG, FES ou TH mais n'exprimant pas l'anticorps anti-MUC4, une étude moléculaire exhaustive (séquençage ARN) soit réalisée en première intention sans passer par l'analyse FISH des gènes *FUS* et *EWSR1*.

Les premières analyses auront également permis de mettre en évidence, après validation par RT-PCR, un deuxième cas de « sarcome inclassé à cellules rondes et fusiformes avec transcrite de fusion *KAMT2A-YAP1* » (77).

Les dernières analyses moléculaires en cours et à venir permettront la caractérisation

complète de cette cohorte et le début de nombreux projets sur les sarcomes fibromyxoides de bas grade, les fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants et les tumeurs hybrides, dont le projet d'évaluation de l'intérêt pronostique de la signature moléculaire CINSARC est déjà amorcé.

*Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
de Médecine Toulouse - Purpan*



**Didier CARRIÉ**



**Professeur Pierre BROUSSET**  
Directeur du Département de Pathologie  
Institut Universitaire du Cancer  
Toulouse Oncopôle  
1, av. Irène Joliot-Curie - 31059 Toulouse cedex 972  
Tél. 05 31 15 61 41

# REFERENCES

1. Doyle LA. Sarcoma classification: an update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*. 2014 Jun 15;120(12):1763–74.
2. Evans HL. Low-grade fibromyxoid sarcoma. A report of two metastasizing neoplasms having a deceptively benign appearance. *Am J Clin Pathol*. 1987 Nov;88(5):615–9.
3. Antonescu CR, Rosenblum MK, Pereira P, Nascimento AG, Woodruff JM. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma: a study of 16 cases and confirmation of a clinicopathologically distinct tumor. *Am J Surg Pathol*. 2001 Jun;25(6):699–709.
4. Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Enzinger FM. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma. A variant of fibrosarcoma simulating carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1995 Sep;19(9):979–93.
5. Folpe AL, Lane KL, Paull G, Weiss SW. Low-grade fibromyxoid sarcoma and hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes: a clinicopathologic study of 73 cases supporting their identity and assessing the impact of high-grade areas. *Am J Surg Pathol*. 2000 Oct;24(10):1353–60.
6. Guillou L, Benhattar J, Gengler C, Gallagher G, Ranchère-Vince D, Collin F, et al. Translocation-positive low-grade fibromyxoid sarcoma: clinicopathologic and molecular analysis of a series expanding the morphologic spectrum and suggesting potential relationship to sclerosing epithelioid fibrosarcoma: a study from the French Sarcoma Group. *Am J Surg Pathol*. 2007 Sep;31(9):1387–402.
7. Doyle LA, Möller E, Dal Cin P, Fletcher CDM, Mertens F, Hornick JL. MUC4 is a highly sensitive and specific marker for low-grade fibromyxoid sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2011 May;35(5):733–41.
8. Doyle LA, Wang W-L, Dal Cin P, Lopez-Terrada D, Mertens F, Lazar AJF, et al. MUC4 is a sensitive and extremely useful marker for sclerosing epithelioid fibrosarcoma: association with FUS gene rearrangement. *Am J Surg Pathol*. 2012 Oct;36(10):1444–51.
9. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018 01;29(Suppl 4):iv268–9.
10. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. 2014 Feb;46(2):95–104.
11. Chibon F, Lesluyes T, Valentin T, Guellec SL. CINSARC signature as a prognostic

- marker for clinical outcome in sarcomas and beyond. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2019;58(2):124–9.
12. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):781–7.
  13. Le Guellec S, Lesluyes T, Sarot E, Valle C, Filleron T, Rochaix P, et al. Validation of the Complexity INDEX in SARCOMAS prognostic signature on formalin-fixed, paraffin-embedded, soft-tissue sarcomas. *Ann Oncol*. 2018 01;29(8):1828–35.
  14. Chinestra P. MIRAS: Multimodal Immune characterization of RARE soft tissue Sarcoma poté par l'équipe de Frédéric Chibon est lauréat du PRTK-2018 (DGOS et INCa). [Internet]. CRCT - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse. 2019 [cited 2019 Sep 7]. Available from: <https://www.crct-inserm.fr/mirasmultimodal-immune-characterization-of-rare-soft-tissue-sarcoma-pote-par-lequipe-de-frederic-chibon-est-laureat-du-prtk-2018-dgos-et-inca/>
  15. Programme de Recherche Translationnelle en Cancérologie INCa-DGOS - Appels à projets - résultats professionnels [Internet]. [cited 2019 Sep 7]. Available from: <https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Appels-a-projets/Appels-a-projets-resultats/PRT-K-2018>
  16. Odem JL, Oroszi G, Bernreuter K, Grammatopoulou V, Lauer SR, Greenberg DD, et al. Deceptively benign low-grade fibromyxoid sarcoma: array-comparative genomic hybridization decodes the diagnosis. *Hum Pathol*. 2013 Jan;44(1):145–50.
  17. Rekhi B, Deshmukh M, Jambhekar NA. Low-grade fibromyxoid sarcoma: a clinicopathologic study of 18 cases, including histopathologic relationship with sclerosing epithelioid fibrosarcoma in a subset of cases. *Ann Diagn Pathol*. 2011 Oct;15(5):303–11.
  18. Tang Z, Zhou Z, Lv C, Qin L-Y, Wang Y, Tian G, et al. Low-Grade Fibromyxoid Sarcoma: Clinical Study and Case Report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010 Apr 1;68(4):873–84.
  19. Mertens F, Fletcher CDM, Antonescu CR, Coindre J-M, Colecchia M, Domanski HA, et al. Clinicopathologic and molecular genetic characterization of low-grade fibromyxoid sarcoma, and cloning of a novel FUS/CREB3L1 fusion gene. *Lab Invest*. 2005 Mar;85(3):408–15.
  20. Lee JH, Choi HJ, Jung HY. Low-Grade Fibromyxoid Sarcoma of the Malar Area. *Arch Plast Surg*. 2016 Jan;43(1):110–2.
  21. Lee EJ, Hwang HJ, Byeon HK, Park HS, Choi H-S. A low grade fibromyxoid sarcoma originating from the masseter muscle: a case report. *J Med Case Rep*. 2015 Aug 21;9:176.
  22. Soma S, Bhat S, Shetty SK. Low Grade Fibromyxoid Sarcoma of the Palate: A Case Report. *J Clin Diagn Res*. 2015 Oct;9(10):XD01–2.

23. Mendoza AS, O'Leary MP, Peng S-K, Petrie BA, Li AI, French SW. Low-grade fibromyxoid sarcoma of the sigmoid colon. *Exp Mol Pathol*. 2015 Apr;98(2):300–3.
24. Ferlosio A, Doldo E, Polisca P, Orlandi A. Low-grade fibromyxoid sarcoma: an unusual cardiac location. *Cardiovasc Pathol*. 2013 Jun;22(3):e15-17.
25. Laurini JA, Zhang L, Goldblum JR, Montgomery E, Folpe AL. Low-grade fibromyxoid sarcoma of the small intestine: report of 4 cases with molecular cytogenetic confirmation. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jul;35(7):1069–73.
26. Billings SD, Giblen G, Fanburg-Smith JC. Superficial low-grade fibromyxoid sarcoma (Evans tumor): a clinicopathologic analysis of 19 cases with a unique observation in the pediatric population. *Am J Surg Pathol*. 2005 Feb;29(2):204–10.
27. Hwang S, Kelliher E, Hameed M. Imaging features of low-grade fibromyxoid sarcoma (Evans tumor). *Skeletal Radiol*. 2012 Sep;41(10):1263–72.
28. Wu JS, Hochman MG. Soft-tissue tumors and tumorlike lesions: a systematic imaging approach. *Radiology*. 2009 Nov;253(2):297–316.
29. Coindre J-M. [New WHO classification of tumours of soft tissue and bone]. *Ann Pathol*. 2012 Nov;32(5 Suppl):S115-116.
30. Mohamed M, Fisher C, Thway K. Low-grade fibromyxoid sarcoma: Clinical, morphologic and genetic features. *Ann Diagn Pathol*. 2017 Jun;28:60–7.
31. Evans HL. Low-grade fibromyxoid sarcoma: a clinicopathologic study of 33 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2011 Oct;35(10):1450–62.
32. Bejarano PA, Padhya TA, Smith R, Blough R, Devitt JJ, Gluckman JL. Hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes--a soft tissue tumor with mesenchymal and neuroendocrine features. An immunohistochemical, ultrastructural, and cytogenetic analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Aug;124(8):1179–84.
33. Reid R, de Silva MVC, Paterson L, Ryan E, Fisher C. Low-grade fibromyxoid sarcoma and hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes share a common t(7;16)(q34;p11) translocation. *Am J Surg Pathol*. 2003 Sep;27(9):1229–36.
34. Linos K, Bridge JA, Edgar MA. MUC 4-negative FUS-CREB3L2 rearranged low-grade fibromyxoid sarcoma. *Histopathology*. 2014 Nov;65(5):722–4.
35. Gipson IK. Mucins of the human endocervix. *Front Biosci*. 2001 Oct 1;6:D1245-1255.
36. Lane KL, Shannon RJ, Weiss SW. Hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes: a distinctive tumor closely resembling low-grade fibromyxoid sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 1997 Dec;21(12):1481–8.
37. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2004 Mar;78(3):379–88.

38. Liu B, Offner GD, Nunes DP, Oppenheim FG, Troxler RF. MUC4 is a major component of salivary mucin MG1 secreted by the human submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 29;250(3):757–61.
39. Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, et al. Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4033–40.
40. Chauhan SC, Singh AP, Ruiz F, Johansson SL, Jain M, Smith LM, et al. Aberrant expression of MUC4 in ovarian carcinoma: diagnostic significance alone and in combination with MUC1 and MUC16 (CA125). *Mod Pathol*. 2006 Oct;19(10):1386–94.
41. Rakha EA, Boyce RWG, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol*. 2005 Oct;18(10):1295–304.
42. Singh AP, Chauhan SC, Bafna S, Johansson SL, Smith LM, Moniaux N, et al. Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *Prostate*. 2006 Mar 1;66(4):421–9.
43. Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J*. 2008 Apr;22(4):966–81.
44. Komatsu M, Jepson S, Arango ME, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene*. 2001 Jan 25;20(4):461–70.
45. Hanaoka J, Kontani K, Sawai S, Ichinose M, Tezuka N, Inoue S, et al. Analysis of MUC4 mucin expression in lung carcinoma cells and its immunogenicity. *Cancer*. 2001 Oct 15;92(8):2148–57.
46. Möller E, Hornick JL, Magnusson L, Veerla S, Domanski HA, Mertens F. FUS-CREB3L2/L1-positive sarcomas show a specific gene expression profile with upregulation of CD24 and FOXL1. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2646–56.
47. Storlazzi CT, Mertens F, Nascimento A, Isaksson M, Wejde J, Brosjo O, et al. Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma. *Hum Mol Genet*. 2003 Sep 15;12(18):2349–58.
48. Panagopoulos I, Storlazzi CT, Fletcher CDM, Fletcher JA, Nascimento A, Domanski HA, et al. The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004 Jul;40(3):218–28.
49. Prieto-Granada C, Zhang L, Chen H-W, Sung Y-S, Agaram NP, Jungbluth AA, et al. A genetic dichotomy between pure sclerosing epithelioid fibrosarcoma (SEF) and hybrid SEF/low-grade fibromyxoid sarcoma: a pathologic and molecular study of 18 cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015 Jan;54(1):28–38.

50. Matsuyama A, Hisaoka M, Shimajiri S, Hayashi T, Imamura T, Ishida T, et al. Molecular detection of FUS-CREB3L2 fusion transcripts in low-grade fibromyxoid sarcoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep;30(9):1077–84.
51. Chang E, Lee A, Lee E, Shin O, Kang C, Kim JM, et al. Hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes with pulmonary metastasis after a long hiatus: a case report. *J Korean Med Sci*. 2004 Aug;19(4):619–23.
52. Konecna J, Liberale G, Haddad J, de Saint-Aubain N, El Nakadi I. Diffuse intra-abdominal low grade fibromyxoid sarcoma with hepatic metastases: Case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep*. 2015;14:40–3.
53. Baydar DE, Aki FT. Low-grade fibromyxoid sarcoma metastatic to the prostate. *Ann Diagn Pathol*. 2011 Feb;15(1):64–8.
54. Maretty-Nielsen K, Baerentzen S, Keller J, Dyrop HB, Safwat A. Low-Grade Fibromyxoid Sarcoma: Incidence, Treatment Strategy of Metastases, and Clinical Significance of the FUS Gene. *Sarcoma*. 2013;2013:256280.
55. Stoeckle E, Gardet H, Coindre J-M, Kantor G, Bonichon F, Milbéo Y, et al. Prospective evaluation of quality of surgery in soft tissue sarcoma. *Eur J Surg Oncol*. 2006 Dec;32(10):1242–8.
56. Coindre JM, Terrier P, Bui NB, Bonichon F, Collin F, Le Doussal V, et al. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J Clin Oncol*. 1996 Mar;14(3):869–77.
57. Wang W-L, Evans HL, Meis JM, Liegl-Atzwanger B, Bovee JVMG, Goldblum JR, et al. FUS rearrangements are rare in “pure” sclerosing epithelioid fibrosarcoma. *Mod Pathol*. 2012 Jun;25(6):846–53.
58. Righi A, Gambarotti M, Manfrini M, Benini S, Gamberi G, Cocchi S, et al. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma of the thigh: report of two cases with synchronous bone metastases. *Virchows Arch*. 2015 Sep;467(3):339–44.
59. Wojcik JB, Bellizzi AM, Dal Cin P, Bredella MA, Fletcher CDM, Hornicek FJ, et al. Primary sclerosing epithelioid fibrosarcoma of bone: analysis of a series. *Am J Surg Pathol*. 2014 Nov;38(11):1538–44.
60. Argani P, Lewin JR, Edmonds P, Netto GJ, Prieto-Granada C, Zhang L, et al. Primary renal sclerosing epithelioid fibrosarcoma: report of 2 cases with EWSR1-CREB3L1 gene fusion. *Am J Surg Pathol*. 2015 Mar;39(3):365–73.
61. Ertoy Baydar D, Kosemehmetoglu K, Aydin O, Bridge JA, Buyukeren B, Aki FT. Primary sclerosing epithelioid fibrosarcoma of kidney with variant histomorphologic features: report of 2 cases and review of the literature. *Diagn Pathol*. 2015 Oct 9;10:186.
62. Beaman FD, Kransdorf MJ, Andrews TR, Murphey MD, Arcara LK, Keeling JH.

Superficial soft-tissue masses: analysis, diagnosis, and differential considerations. *Radiographics*. 2007 Apr;27(2):509–23.

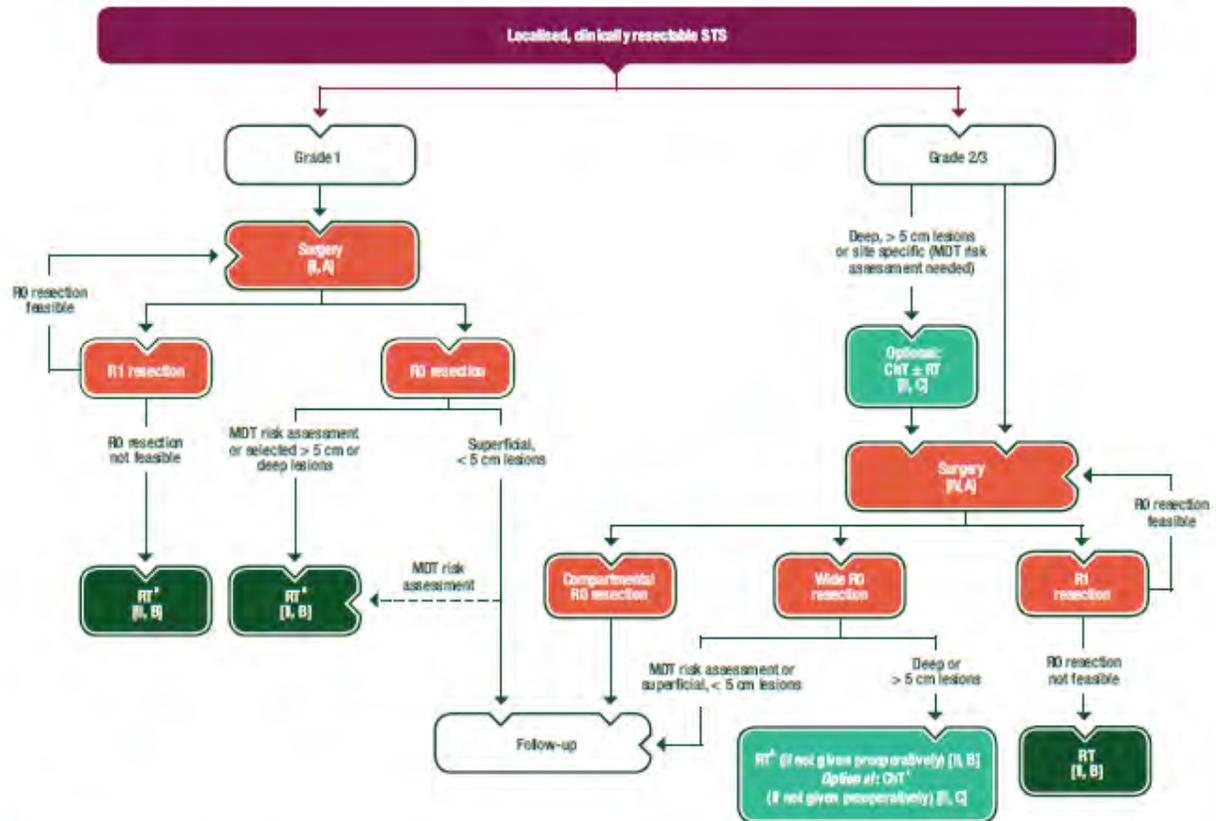
63. CDM F, JA B, PCW H, F M. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone [Internet]. [cited 2019 Sep 2]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Soft-Tissue-And-Bone-2013>
64. Arbajian E, Puls F, Magnusson L, Thway K, Fisher C, Sumathi VP, et al. Recurrent EWSR1-CREB3L1 gene fusions in sclerosing epithelioid fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2014 Jun;38(6):801–8.
65. Stockman DL, Ali SM, He J, Ross JS, Meis JM. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma presenting as intraabdominal sarcomatosis with a novel EWSR1-CREB3L1 gene fusion. *Hum Pathol*. 2014 Oct;45(10):2173–8.
66. Aman P, Panagopoulos I, Lassen C, Fioretos T, Mencinger M, Toresson H, et al. Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics*. 1996 Oct 1;37(1):1–8.
67. Lau PPL, Lui PCW, Lau GTC, Yau DTW, Cheung ETY, Chan JKC. EWSR1-CREB3L1 gene fusion: a novel alternative molecular aberration of low-grade fibromyxoid sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 May;37(5):734–8.
68. Law WJ, Cann KL, Hicks GG. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomics*. 2006 Jan 1;5(1):8–14.
69. Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, et al. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol*. 2009 Oct;11(10):1205–11.
70. Kondo S, Hino S-I, Saito A, Kanemoto S, Kawasaki N, Asada R, et al. Activation of OASIS family, ER stress transducers, is dependent on its stabilization. *Cell Death Differ*. 2012 Dec;19(12):1939–49.
71. Denard B, Seemann J, Chen Q, Gay A, Huang H, Chen Y, et al. The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells. *Cell Host Microbe*. 2011 Jul 21;10(1):65–74.
72. Dewaele B, Libbrecht L, Levy G, Brichard B, Vanspauwen V, Sciot R, et al. A novel EWS-CREB3L3 gene fusion in a mesenteric sclerosing epithelioid fibrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(9):695–9.
73. Arbajian E, Puls F, Antonescu CR, Amary F, Sciot R, Debiec-Rychter M, et al. In-depth Genetic Analysis of Sclerosing Epithelioid Fibrosarcoma Reveals Recurrent Genomic Alterations and Potential Treatment Targets. *Clin Cancer Res*. 2017 Dec 1;23(23):7426–34.
74. Kesrouani C, Zemoura L, Trassard M, Laé M. [A hybrid lesion: Low-grade fibromyxoid sarcoma (LGFMS) and sclerosing epithelioid fibrosarcoma (SEF)]. *Ann*

Pathol. 2016 Oct;36(5):351–4.

75. Mok Y, Pang YH, Sanjeev JS, Kuick CH, Chang KT-E. Primary Renal Hybrid Low-grade Fibromyxoid Sarcoma-Sclerosing Epithelioid Fibrosarcoma: An Unusual Pediatric Case With EWSR1-CREB3L1 Fusion. *Pediatr Dev Pathol*. 2018 Dec;21(6):574–9.
76. Fisher C. The diversity of soft tissue tumours with EWSR1 gene rearrangements: a review. *Histopathology*. 2014 Jan;64(1):134–50.
77. Yoshida A, Arai Y, Tanzawa Y, Wakai S, Hama N, Kawai A, et al. KMT2A (MLL) fusions in aggressive sarcomas in young adults. *Histopathology*. 2019 May 28;

# ANNEXES

## Annexe 1 : prise en charge thérapeutique des sarcomes des tissus mous localement avancés, résécables



**Figure 1.** Management of localized, clinically resectable STS.

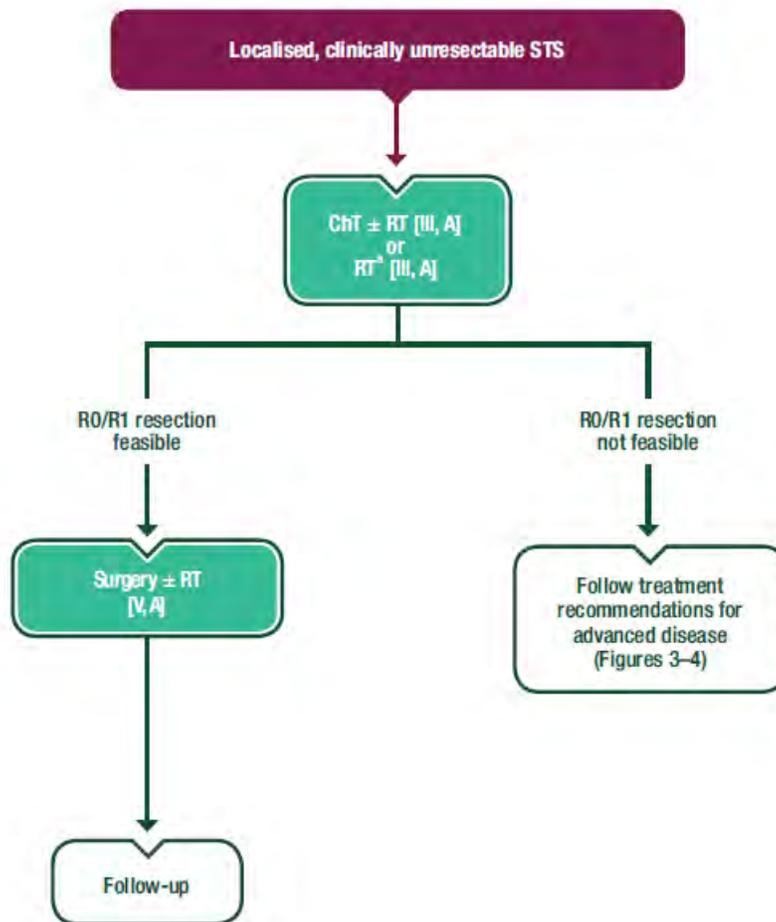
\*RT can be omitted in selected cases; optional isolated limb perfusion in highly selected cases.

†RT can be omitted in selected deep cases and added in selected superficial cases; to be administered preoperatively if problematic postoperatively.

‡Extremity and superficial trunk, G3, deep, > 5 cm.

CRT, chemotherapy; MDT, multidisciplinary team; R0, no tumour at the margin; R1, microscopic tumour at the margin; RT, radiotherapy; STS, soft tissue sarcoma.

**Annexe 2 : prise en charge thérapeutique des sarcomes des tissus mous localement avancés, non résectables**



**Figure 2.** Management of localised, clinically unresectable STS.

<sup>3</sup>Optional: isolated limb perfusion in selected cases.

ChT, chemotherapy; R0, no tumour at the margin; R1, microscopic tumour at the margin; RT, radiotherapy; STS, soft tissue sarcoma.

### **Annexe 3 : Grading histologique des sarcomes (FNCLCC)**

Proposé par les Centres Anti-Cancéreux Français (FNCLCC). Trois grades sont calculés en additionnant les différents scores.

#### **Différenciation tumorale :**

**Score 1** : sarcomes ressemblant à un tissu adulte normal (ex: liposarcome bien différencié)

**Score 2** : sarcomes pour lesquels le diagnostic histologique est certain (ex : liposarcome myxoïde)

**Score 3** : sarcomes embryonnaires, synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes, à cellules claires, alvéolaires des parties molles, sarcomes indifférenciés et sarcomes pour lesquels le type histologique est incertain.

#### **Index mitotique (surface du champ : 0,174 mm<sup>2</sup>) :**

**Score 1** : 0 à 9 mitoses pour 10 HPF (pour 10 champs à l'objectif X 40)    **Score 2** : 10 à 19 mitoses pour 10 HPF

**Score 3** : Plus de 19 mitoses pour 10 HPF

#### **Nécrose tumorale :**

**Score 0** : Absence de nécrose

**Score 1** : < 50 % de nécrose tumorale

**Score 2** : > 50 % de nécrose tumorale

**Grade 1** : somme des scores = 2-3 (risque métastatique faible)

**Grade 2** : somme des scores = 4-5 (risque métastatique réel)

**Grade 3** : somme des scores = 6-8 (risque métastatique élevé)

## **Annexe 4 : protocole FISH d'hybridation et révélation**

J-1 : préparation du tissu

- Sélection des blocs et cerclage de la zone tumorale d'intérêt par le médecin
- Réalisation de coupes sur les blocs en paraffine et étalement sur des lames chargées positivement (type Superfrost +)

J1 : déparaffinage et réhydratation (xylène + éthanol)

Pré-traitement des lames (incubation)

Digestion enzymatique à la pepsine

Déshydratation à l'éthanol

Dénaturation de l'ADN puis hybridation avec les sondes d'intérêt (CREB3L1 et CREB3L2)

J2 : post-hybridation/lavages stringents : décollement des lamelles et lavages consécutifs

Déshydratation à l'éthanol et montage des lames dans un milieu contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, fluorochrome bleu).

Validation de la technique par lecture des lames au microscope à fluorescence et numérisation des lames pour mise à disposition du médecin lecteur.

## Annexe 5 : protocole « kit Qiagen » d'extraction de l'ARN tumoral

### Matériel, réactifs et Equipement

#### Réactifs

- ❖ RNeasy FFPE kit, référence : 73504, Qiagen
- ❖ Deparaffinization solution, référence : 19093, Qiagen
- ❖ Ethanol absolu

#### Equipement

- ❖ Thermoblock ou bain-marie à 56 °C
- ❖ Thermoblock ou bain-marie à 80°C

### Déroulement des activités

Pratiquement toutes les étapes se font à température ambiante

#### Déparaffinage

#### Préparation des échantillons

- Sortir un scalpel, un punch, une LB et un tube de 2 ml par cas **annoté et protégé par du scotch**
- Resuspendre la DNase avec de l'eau et faire des aliquots de 11µl à -20°C
- Mettre une bille autoclavée dans chaque tube

#### Préparation des tampons

- ❖ **RPE buffer** : avant la première utilisation ajouter dans la bouteille **44 ml** d'éthanol absolu, mélanger par inversion 5 fois. Noter l'ajout sur la bouteille.

#### Préparation des équipements

- ❖ Mettre à chauffer un thermoblock ou un bain-marie à 56°C
- ❖ Mettre à chauffer un thermoblock ou un bain-marie à 80°C
- ❖ Sortir les blocs du broyeur **au moins 1h avant**

## Déparaffinage

- Mettre **400 µl** de solution de **déparaffinage** par tube
- Faire **8 à 10** punchs par cas les mettre sur la LB, enlever l'excès de paraffine au scalpel et mettre les carottes dans le tube annoté
- Vortexer **10 sec** vigoureusement et centrifuger brièvement
- Placer les tubes dans les blocs pour le broyeur, fixer les blocs et lancer le broyage : **30 sec à 30 Hz**
- Retourner les blocs et relancer le broyage **30 sec à 30 Hz**
- Vortexer rapidement les tubes à vitesse maximale, centrifuger rapidement et revortexer doucement
- Incuber **3 min à 56°C**, enlever la bille et laisser refroidir à RT : *si la solution de déparaffinage devient dure après refroidissement en rajouter (100µl mini) et incuber à nouveau 3 min à 56°C et laisser refroidir*
- Ajouter **240 µl** de buffer **PKD** et vortexer
- Centrifuger **1 min à 11000g** (2 phases apparaissent)
- Ajouter **10µl** de **proteinase K** à la phase blanche du dessous : mélanger doucement en pipetant
- Incuber **1h à 56°C** (jusqu'à 3h possible)
- Incuber **15 min à 80°C** : vortexer toutes les **3 à 5 min**
- **Transférer à la P200** la phase blanche du dessous dans un nouveau tube annoté de 2 ml
- Incuber sur glace **3 min**
- Centrifuger **15 min à 20000g à 4°C**
- **Transférer le surnageant** dans un nouveau tube annoté sans toucher au culot de débris
- Ajouter **500 µl** de Buffer **RBC** et mélanger à la pipette
- Ajouter **1200 µl d'éthanol absolu** et mélanger bien par pipetage

## Purification sur colonne

- Transférer **700 µl** dans une colonne annotée placée dans un tube collecteur
- Centrifuger **15 sec à 8000g** (10000 rpm)
- Jeter le surnageant
- Transférer le reste de liquide de chaque échantillon et centrifuger **15 sec à 8000g** puis jeter le surnageant
- Ajouter **500 µl** de buffer RPE

- Centrifuger **15 sec à 8000g**
- Jeter le surnageant
- Ajouter **500 µl** de buffer RPE
- Centrifuger **2 min à 8000g**
- Jeter le surnageant et le tube collecteur
- Mettre la colonne dans un nouveau tube collecteur
- Centrifuger les colonnes bouchon ouvert à vitesse maximale **5 min** et jeter le tube collecteur
- **3 min** au speedvac (si pas de speedvac ne pas faire cette étape passer directement à la suivante)
- Mettre la colonne dans un tube de 1,5 ml
- Ajouter **25 µl** d'eau RNase free sur la membrane : laisser **1 min**
- Centrifuger **1 min** à vitesse maximale
- Mettre sur glace les tubes et stocker les ARN à -80°C

**Annexe 6 : concentration/quantité/DV200 des ARN tumoraux séquencés au CNAG**

<b>N° CAS</b>	<b>CONCENTRATION (ng/μL)</b>	<b>QUANTITE ARN (μg)</b>	<b>DV200 (%)</b>
3	20.3	0.6	55
4	73.7	6.2	43
8	186.7	5.6	96
9	205.6	6.2	70
32	153.7	4.6	51
36	205.6	6.2	72
39	178.5	5.4	47
43	212.6	6.4	69
73	148	4.4	72
84	324.6	9.7	81
90	279.7	8.4	66
91	664.6	19.9	47
96	253.6	7.6	80
97	141.9	12.4	87
98	335.9	10.1	70
104	141.2	4.2	93
105	199.5	6.0	75
133	74.2	2.2	47
138	162.3	4.9	84
147	416	12.5	64

---

**CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE, IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES SARCOMES FIBROMYXOÏDES DE BAS GRADE ET DES FIBROSARCOMES EPITHELIOÏDES SCLEROSANTS, DE LA BASE NATIONALE DU GROUPE SARCOME FRANÇAIS**

---

**RESUME**

Les sarcomes fibromyxoïdes de bas grade (SFMBG), les fibrosarcomes épithélioïdes sclérosants (FES) et leurs formes de transition appelée tumeurs hybrides (TH), sont des tumeurs malignes conjonctives très rares de diagnostic difficile et de prise en charge thérapeutique non standardisée du fait d'un nombre restreint de cas étudiés dans la littérature. Ce travail, à l'initiative du Groupe Sarcome Français (GSF) et dans le cadre de l'étude SARRA (SARcomes RAres), a permis de construire la plus grosse cohorte publiée à ce jour, comportant 101 cas de SFMBG, 11 cas de FES et 23 cas de TH caractérisés sur les plans morphologique, immunohistochimique et bientôt totalement d'un point de vue moléculaire. Cette cohorte va permettre la réalisation de nombreuses études complémentaires (dont les projets CINSARC et MIRAS-PRT-K2018 sont actuellement en cours).

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique – anatomie et cytologie pathologiques

---

MOTS-CLÉS : Sarcome fibromyxoïde de bas grade – fibrosarcome épithélioïde sclérosant – tumeur hybride – Groupe Sarcome Français – Projet SARRA (SARcomes RAres)

---

Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

Directrice de thèse : Sophie LE GUELLEC