



INTERET DE L'HYBRIDATION IN SITU PAR FLUORESCENCE ET DE LA REUNION DE CONCERTATION PLURIDISCIPLINAIRE DANS LA PRISE EN CHARGE DES SARCOMES DES PARTIES MOLLES DES EXTREMITES

PRESENTE PAR :

Docteur ASMAE MAZTI

Née le 03/08/1988 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE

OPTION : anatomie pathologique

Sous la direction de PROFESSEUR CHBANI LAILA

Session Octobre 2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

فَاللَّهُ بِحَنَانِ الْاَعْلَامِ لَنَا الْاَمَامُ عَلِيٌّ
اِنْبَاءُ نَبِيِّ الْعَالَمِ الْحَكِيمِ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

DEDICACES



*A ceux qui me sont les plus chers
A ceux qui ont toujours cru en moi
A ceux qui m'ont toujours encouragé*

Je dédie ce mémoire à...



A mes très chers parents Ahmed MAZTI et Fatima SAMI

De tous les parents, vous étiez les meilleurs, vous avez su m'entourer d'attention, m'inculquer les valeurs nobles de la vie, m'apprendre le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité.

Vous n'avez pas cessé de me soutenir et de m'encourager. Votre amour, votre générosité exemplaire et votre présence constante ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Vos prières ont été pour moi un grand soutien tout au long de mes études. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu tout puissant vous protéger, vous procurer longue vie, santé et bonheur pour que vous demeuriez le flambeau illuminant notre chemin.



À mon très cher mari Abdesselam BOUGDIRA

Aucun mot ne saurait exprimer mon estime et mon profond amour.

Tu étais constamment une source de force, de motivation et d'inspiration pour moi.

Ton soutien moral, ta gentillesse sans égale et ta présence m'ont permis de concrétiser mes objectifs.

Les mots me manquent pour t'exprimer mon admiration profonde et ma grande reconnaissance pour ta patience et tous les sacrifices que tu as consentis au cours de cette période.

Que ce travail soit le témoignage de mon amour sincère et fidèle.

Que Dieu préserve notre union et nous procure un bonheur infini et un avenir radieux.



À mon petit trésor « Nadine »

Tu as rempli notre vie d'amour et de bonheur. Tes éclats de rire sont notre plus belle mélodie. Ta présence est notre source de motivation pour tout ce que nous
entreprenons.

Puisse Dieu le tout puissant nous aider à te garantir une vie joyeuse et un
avenir prospère.

Je te dédie ce travail qu'on a élaboré ensemble.

Je t'aime mon âme ...



A ma très chère sœur Nassira MAZTI et son mari Saïd ABAALI

A mes deux nièces Bayane ABAALI et Takoua ABAALI

Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide.

J'ai trouvé en vous le refuge de mes moments difficiles et mes secrets.

*Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de
bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée.*

*Puisse Dieu tout puissant vous protéger, vous procurer longue vie, santé et
bonheur.*

Je vous aime ...



À mes très chers frères Tarik, Yassir et Achraf

Vous avoir tous à mes côtés est le baume de mon existence.

*Vous étiez toujours mes fidèles accompagnants dans les moments les plus
difficiles.*

*Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amour et de la gratitude pour
l'épaule inconditionnelle que vous représentez pour moi.*

*Je ne saurais jamais exprimer mes sentiments fraternels et chers que j'éprouve
pour vous tous.*

Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent.



A mes chers beaux-parents Mohamed Ben Abdesslam et Khadija Bent Bouchta

A tous mes chers beaux-frères et leurs petites familles

A toutes mes très chères belles-soeurs et leurs petites familles

*Vous êtes ma deuxième famille. Votre soutien, votre tolérance et votre bonté
exceptionnelle ont été une grande source de motivation pour moi. Votre aide m'a
toujours été précieuse.*

*Je vous dédie ce travail en guise de remerciement pour vos conseils et
encouragements qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.*

Je vous souhaite tout le bonheur que vous méritez.





REMERCIEMENTS

À notre cher Maître, Madame le Professeur

CHBANI LAÏLA

J'ai eu l'immense plaisir de travailler sous votre direction, j'ai trouvé auprès de vous l'humain, le conseiller et le guide qui m'a reçue en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Vos compétences humaines et professionnelles incontestables ainsi que votre personnalité valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et du professionnalisme dans l'exercice de la profession.

Retrouvez dans ce travail cher Maître l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère gratitude.



À notre cher Maître, Madame le Professeur

EL FATEMI HINDE

C'est avec une grande émotion et un profond respect et estime qu'on a l'honneur d'écrire ce modeste mot afin de vous rendre hommage et de vous formuler notre profonde gratitude.

Vous avez guidé nos pas et illuminé notre chemin vers le savoir.

Nous avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui n'a jamais épargné d'efforts pour nous octroyer une formation meilleure. Vous avez montré à notre égard beaucoup de patience et un indéfectible soutien. Vos qualités humaines et professionnelles, votre rigueur et droiture nous serviront certainement d'exemple dans notre carrière.

Nous vous restons à jamais reconnaissants, sincèrement respectueux et toujours disciples dévoués...



À notre cher Maître, Madame le Professeur

HAMMAZ NAWAL

De votre enseignement brillant et précieux, nous gardons les meilleurs souvenirs.

Vous avez prodigués avec patience et indulgence infinie, vos précieux conseils.

Vous étiez toujours disponibles et soucieuse de nous donner la meilleure formation qui puisse être. Vos qualités humaines ainsi que votre modestie nous ont profondément marqué.

Nous vous remercions vivement et nous vous exprimons notre profond respect et notre sincère gratitude.



A notre chère Professeur LAYLA TAHIRI EL OUSROUTI

*Cher Professeur, nous vous remercions de votre patience et de tout le savoir que
vous nous avez généreusement transmis. Vos qualités humaines nous ont
beaucoup marquées.*

*On n'oubliera jamais vos conseils, vos soucis de transmettre les connaissances,
votre bienveillance et simplicité.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre haute considération, de
notre sincère reconnaissance et profond respect.*



*A mes chers collègues résidents du service d'anatomie pathologique de Fès
Où que la vie nous mène, je me souviendrai toujours de tous les moments de joie
et de réussite qu'on a vécus ensemble tout au long de notre parcours de
résidanat.*

*Je vous remercie pour votre amitié, votre gentillesse, votre soutien et votre
grand cœur.*

*Je vous remercie pour le travail d'équipe et pour tout ce que nous avons partagé
pendant la période de notre formation.*

*Je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie
professionnelle que privée.*



*A toute l'équipe paramédicale du service d'anatomie pathologique de Fès
Je vous dédie ce travail en témoignage de mes sentiments les plus sincères et ma
profonde gratitude.*



*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail.*

PLAN

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
MATERIELS ET METHODES	12
I. TYPE ET CADRE DE L'ETUDE :	13
II. DONNEES ANATOMOPATHOLOGIQUES :	15
1. Prise en charge macroscopique des prélèvements :	15
1.1. Prélèvements biopsiques :	15
1.2. Pièces opératoires :	15
1.3. Fixation :	16
1.4. Circulation :	16
1.5. L'inclusion en Paraffine :	18
1.6. La coupe :	19
2. Etude microscopique :	20
2.1. Analyse morphologique :	20
2.1.1. Coloration standard HPS/HES :	20
2.1.2. Le diagnostic histologique :	23
2.2. Etude immunohistochimique :	28
2.2.1. La technique d'immunohistochimie indirecte :	28
2.2.2. Choix des anticorps :	31
2.3. Etude cytogénétique par hybridation in situ par fluorescence (FISH)	34
2.3.1. Principe et interprétation :	34
2.3.2. Technique de le FISH :	46
III. PRISE EN CHARGE MULTIDISCIPLINAIRE DES PATIENTS :	52
IV. ANALYSE STATISTIQUE :	53
RESULTATS	54
1. Cadre de l'étude :	55
2. Données démographiques :	56
3. Données cliniques :	58
4. Données anatomopathologiques :	61
4.1. Type histologique :	61
4.2. Grade histologique :	64

4.3. Les marges de résection :	65
4.4. Etude moléculaire :	66
5. Données thérapeutiques :	74
6. Données évolutives :	76
7. Etude analytique :	78
DISCUSSION	87
VOLET I : INTERET DE L'HYBRIDATION IN SITU PAR FLUORESCENCE DANS LES TUMEURS DES TISSUS MOUS :	88
1. Place de la biologie moléculaire dans les sarcomes des tissus mous :	88
1.1. Intérêt de la FISH dans la pratique diagnostique de routine	88
1.2. Distinguer une tumeur bénigne d'un sarcome :	89
1.3. Identifier un type de sarcome spécifique	89
1.4. Affirmer un diagnostic face à des formes histologiques et cliniques inhabituelles :	91
1.5. Place de la FISH dans les prélèvements cytologiques :	91
1.6. La FISH : utile ou nécessaire au diagnostic ?	95
2. Rôle de la FISH dans le pronostic	95
3. Indications de la biologie moléculaire	95
VOLET II : L'INTERET DE LA PRISE EN CHARGE MULTIDISCIPLINAIRE DES SARCOMES DES TISSUS MOUS :	97
1. Intérêt de l'imagerie :	98
2. Intérêt de la biopsie préalable :	99
3. Le traitement chirurgical et l'importance des marges de résection :	100
4. Le diagnostic anatomopathologique :	102
5. Le traitement adjuvant / néo-adjuvant :	103
CONCLUSION	110
RESUME	112
REFERENCES	115

Liste des figures

Figure 1 : Flux des patients.

Figure 2: biopsie radioguidée : les carottes biopsiques ont incluses dans deux cassettes.

Figure 3 : Aspect macroscopique d'une pièce opératoire d'une compartimentectomie de la cuisse.

Figure 4 : schéma illustrant le processus de circulation

Figure 5: Automate à inclusion sous vide Tissue-Tek VIP® 6 AI disponible au service

Figure 6: Console d'enrobage des tissus « Tissue-Tek® TEC™ 5 » disponible au service.

Figure 7 : Microtome rotatif semi-automatique AEM 450 disponible au service.

Figure 8 : schéma illustrant les différentes étapes de coloration standard.

Figure 9 : Automate de coloration de lames Tissue-Tek® DRS™ 2000 disponible au service.

Figure 10 : classification OMS des tumeurs des tissus mous 2013.

Figure 11: score de différenciation en fonction du type histologique.

Figure 12 : schéma illustrant les différentes catégories de la qualité de l'exérèse chirurgicale selon l'UICC.

Figure 13: schéma résumant les différentes étapes du protocole de l'immunohistochimie.

Figure 14 : Entités émergentes dans le groupe des sarcomes à cellules rondes.

Figure 15 : représentation schématique et cytologique des différents signaux détectés par FISH.

Figure 16 : Schéma des trois catégories de translocation réciproque observées dans

les sarcomes

Figure 17 : Les différentes translocations chromosomiques dans les sarcomes des tissus mous et leur gène de fusion correspondant.

Figure 18 : Les gènes de fusion dans les sarcomes des tissus mous.

Figure 19. Mécanisme d'action de MDM2 et CDK4 au niveau du cycle cellulaire.

Figure 20 : Mécanisme de la dédifférenciation dans les liposarcomes dédifférenciés.

Figure 21 : Les principales amplifications dans les sarcomes des tissus mous.

Figure 22 : répartition des patients en fonction du groupe « RCP » ou « NON RCP ».

Figure 23 : répartition des patients en fonction du sexe.

Figure 24 : répartition des patients en fonction des groupes d'âge.

Figure 25 : répartition des patients en fonction du membre atteint.

Figure 26 : répartition des patients en fonction de la localisation.

Figure 27: répartition des patients en fonction de la réalisation de la biopsie pré-opératoire.

Figure 28 : répartition des patients en fonction du type histologique

Figure 29 : Image histologique d'un liposarcome dédifférencié.

Figure 30 : Image histologique d'un myxofibrosarcome .

Figure 31: Image histologique d'un sarcome d'Ewing

Figure 32: Image histologique d'un synovialosarcome biphasique.

Figure 33 : répartition des patients en fonction du grade histologique

Figure 34 : répartition des patients en fonction de la qualité d'exérèse chirurgicale.

Figure 35 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une étude par FISH.

Figure 36 : répartition des patients en fonction de l'aspect morphologique.

Figure 37 : répartition des cas en fonction de l'indication et la réalisation d'une

étude immunohistochimique.

Figure 38 : algorithme appliqué dans notre étude en fonction de l'aspect morphologique.

Figure 39: répartition des patients en fonction des sondes utilisées.

Figure 40 : répartition des sondes utilisées en fonction de l'aspect morphologique.

Figure 41 : Image histologique d'un liposarcome dédifférenciée (HESx400) (a), avec une amplification du gène MDM2 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un liposarcome.

Figure 42 : Image histologique d'un sarcome à cellules fusiformes (HESx200) (a), avec un réarrangement du gène SS18 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un synoviosarcome.

Figure 43 : Image histologique d'un sarcome à cellules rondes (HESx400) exprimant le CD99 sur le plan immunohistochimique (a), avec un réarrangement du gène EWSR1 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un sarcome d'Ewing.

Figure 44: répartition des cas en fonction du groupe génomique.

Figure 45: répartition des patients en fonction du traitement adjuvant par radiothérapie.

Figure 46: répartition des patients en fonction du traitement par chimiothérapie.

Figure 47: répartition des patients en fonction du statut vivant ou non.

Figure 48: répartition des patients en fonction du statut métastatique.

Figure 49: répartition des patients en fonction de la récurrence locale.

Figure 50 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une IRM dans les deux groupes.

Figure 51 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une biopsie pré-

opératoire dans les deux groupes.

Figure 52 : répartition des patients en fonction de la survenue de la récurrence locale dans les deux groupes.

Figure 53: Courbe de survie globale de l'ensemble des patients (n=116).

Figure 54 : Courbe de survie globale des deux groupes de patients.

Figure 55 : Courbe de survie sans récurrence des deux groupes de patients

Figure 56: Courbe de survie sans métastase des deux groupes de patients

Figure 57 : Image cytologique d'un sarcome d'EWING. a : prolifération tumorale à petites cellules rondes. b : étude FISH réalisée, montrant un réarrangement du gène EWSR1.

Figure 58 : Image cytologique d'un synoviosarcome. a prolifération tumorale faite de cellules aux noyaux ronds ou ovalaires. b l'étude par FISH a montré un réarrangement du gène SS18

Figure 59 : Image cytologique d'un liposarcome dédifférencié. a prolifération tumorale faite de cellules pléomorphes sur un fond myxoïde. b L'étude par FISH a montré une amplification du gène MDM2.

Figure 60 : Prise en charge des STS localisés et cliniquement résectables.

Figure 61 : Prise en charge des STS localisés et cliniquement non résectables.

Figure 62 :Prise en charge du STS avancé / métastatique, cliniquement résectable.

Figure 63 : Prise en charge du STS avancé / métastatique, cliniquement non résectable.

Liste des tableaux

Tableau 1 : système de grading de la FNCLCC

Tableau 2 : stadification TNM selon l'AJCC (8^{ème} édition)

Tableau 3 : classification des stades pronostiques selon l'AJCC (8^{ème} édition)

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés en premières intension en fonction de l'aspect morphologique.

Tableau 5 : Vue d'ensemble des marqueurs immunohistochimiques et des corrélations moléculaires dans le diagnostic différentiel de certains sarcomes à cellules rondes, tumeurs vasculaires, tumeurs adipocytaires,

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de la comparaison des différents paramètres clinicopathologiques des 2 groupes de patients

Tableau 7 : résultats de l'étude multivariée

Tableau 8 : Tableau résumant les différentes anomalies génétiques détectables par étude FISH sur des prélèvements cytologiques de STS.

INTRODUCTION

Les sarcomes sont des tumeurs malignes qui prennent naissance dans les tissus conjonctifs ou les tissus de soutien du corps. Ce sont des tumeurs rares, représentant moins de 1 % des tumeurs malignes de l'adulte [1]. Les sarcomes présentent une grande diversité pathologique avec plus de 70 sous-types histologiques et d'un nombre croissant de sous-types moléculaires. Ils se développent à tout âge, y compris chez l'enfant. Ils peuvent survenir anatomiquement de la tête aux pieds et ils sont d'une agressivité variable même au sein du même sous-type histologique [2]. On distingue trois catégories de sarcomes correspondant à des entités clinico-pathologiques différentes, d'évolutions individuellement spécifiques et dont les traitements sont distincts : les sarcomes osseux, les sarcomes viscéraux développés au sein d'un organe spécifique dont le représentant le plus emblématique est le *gastro-intestinal stromal tumor* (GIST) et les sarcomes des tissus mous (STM) issus des tissus conjonctifs et de soutien extra-osseux, qui représentent environ 1 % des cancers de l'adulte [3—5].

Du fait de leur rareté et de leur hétérogénéité, ces tumeurs posent différentes problématiques :

- ☞ Ils sont fréquemment d'interprétation et de classement difficiles, conduisant à des erreurs de diagnostic pouvant orienter sur un traitement non optimal (8 à 25 % de discordances avant et après relecture selon les études) [6] ;
- ☞ La rareté de ces tumeurs et les signes cliniques peu évocateurs conduisent fréquemment à des chirurgies inadéquates et minimalistes sans discussion pluridisciplinaire et sans respect des marges de sécurité adéquates pour les sarcomes. Pour que la chirurgie soit optimale, le sarcome doit avoir été identifié, d'où la nécessité d'une imagerie et d'une biopsie préalables. La chirurgie doit ensuite être planifiée au sein d'une équipe entraînée [7,8] ;
- ☞ L'histologie est prépondérante sur la localisation, et le dossier doit être

discuté en début de maladie en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) spécialisée sarcome, afin d'appliquer les stratégies thérapeutiques dédiées aux sarcomes ainsi que les techniques chirurgicales adéquates [9,10].

Depuis une décennie, ce groupe hétérogène de tumeurs présente une évolution permanente et/ou une apparition de nouvelles entités, ce qui pose plus de difficultés diagnostiques pour les pathologistes non spécialisés, surtout avec l'utilisation de la microbiopsie comme « Gold Standard » en matière de diagnostic initial des sarcomes. Actuellement, la classification des sarcomes comprend des critères moléculaires, en plus des critères histologiques et immunohistochimiques, et de nombreuses anomalies génétiques ont été décrites et sont utilisées au quotidien [11].

MATERIELS ET METHODES

I. Type et cadre de l'étude :

Note travail est basé sur une étude prospective, réalisée au centre hospitalier universitaire HASSAN II de Fès, sur une période de 43 mois, du 01/01/2017 au 30/07/2020, et dans le cadre d'un projet de recherche.

Parmi 183 inclus initialement, le diagnostic de sarcome des tissus mous a été confirmé chez 116 patients. Les autres cas ont été exclus, soit parce que le diagnostic anatomopathologique a révélé des tumeurs bénignes ou autre type histologique, soit après refus de traitement par certains patient.

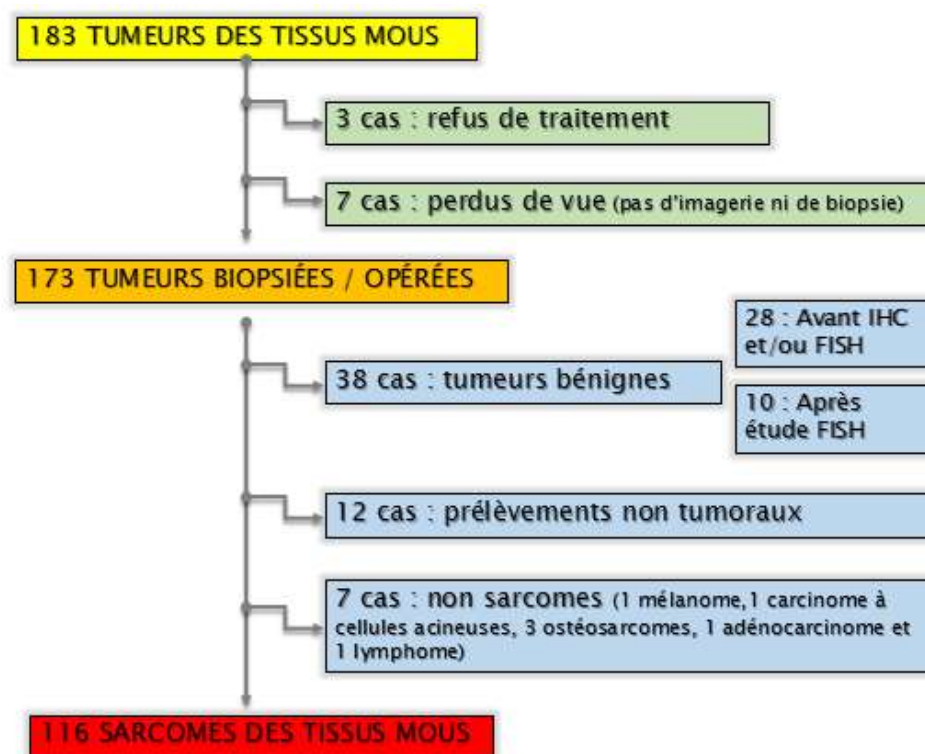


Figure 1 : Inclusion des patients.

Les critères d'inclusion sont :

- patients âgés de ≥ 18 ans.
- patients ayant un diagnostic de sarcome de tissus mous des extrémités.

Les critères d'exclusion sont:

- autres sarcomes que ceux des tissus mous (os, viscères)
- autres types histologiques de cancer.

On a subdivisé nos patients en deux groupes. Un groupe « RCP » dont les dossiers ont été recrutés de novo au CHU, et ont été discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire avant tout geste. Le deuxième groupe « Hors RCP » comporte les dossiers recrutés du secteur privé, ou référés après avoir réalisé des bilans radiologiques, des biopsies ou des gestes chirurgicaux.

Recueil des données cliniques :

Le recueil des données a été effectué dans le respect de l'anonymat des patients et de la confidentialité de leurs informations.

Une fiche d'informations a été remplie pour chaque patient, comportant les différentes données cliniques, radiologiques, anatomopathologiques, thérapeutiques et évolutives, qui ont été enregistrées par la suite à l'aide d'un masque de saisie.

II. Données anatomopathologiques :

1. Prise en charge macroscopique des prélèvements :

1.1. Prélèvements biopsiques :

Les prélèvements biopsiques reçus ont été soit radio-guidés ou chirurgicaux. Dans les deux cas de figure, ils ont été fixés au Formol tamponné, puis inclus dans 2 cassettes au minimum pour éviter l'épuisement du prélèvement.



Figure 2: biopsie radioguidée : les carottes biopsiques ont été incluses dans deux cassettes.

1.2. Pièces opératoires :

Le geste chirurgical dans notre étude était le plus souvent un traitement conservateur, et moins fréquemment une amputation. La pièce opératoire est reçue à notre laboratoire orientée par le traumatologue, encrée à l'état frais, puis ouverte selon des tranches de 1 cm d'épaisseur pour permettre une fixation optimale de la pièce opératoire. Cette dernière est fixée dans du Formol tamponné dont la durée de fixation dépend de la taille de la pièce.

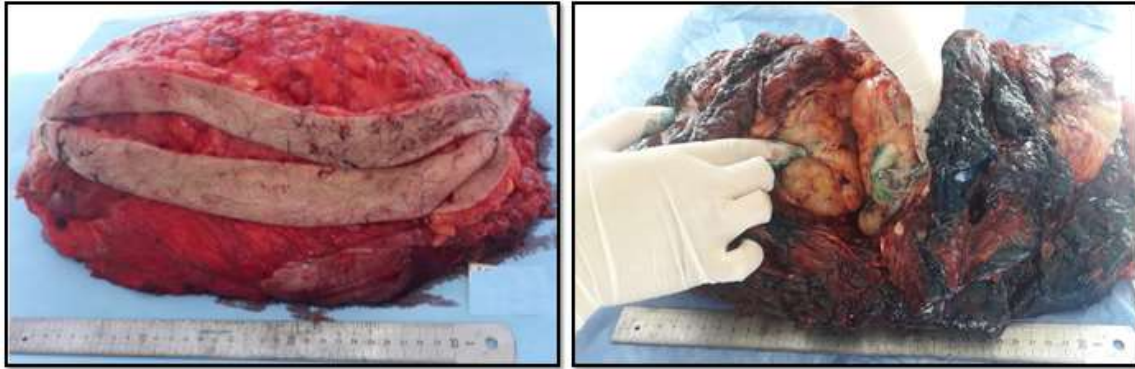


Figure 3 : Aspect macroscopique d'une pièce opératoire d'une compartimentectomie au niveau de la cuisse.

1.3. Fixation :

La fixation des prélèvements se fait dans du Formol tamponné, dont la préparation comporte :

- 200 ml de Formol 37%.
- 7g de phosphates mono-sodique.
- 13g de phosphates di-sodique.
- 2L d'eau distillé.

1.4. Circulation :

La procédure de circulation consiste à déshydrater les prélèvements pour permettre l'inclusion en paraffine par la suite. Elle consiste en le passage dans 12 bains préalablement préparés :

- Déshydratation : 4 bains d'alcool à 60%, 80%, 90% et 100%
- Eclaircissement : 4 bains de toluène
- Imprégnation : 4 bains de paraffine

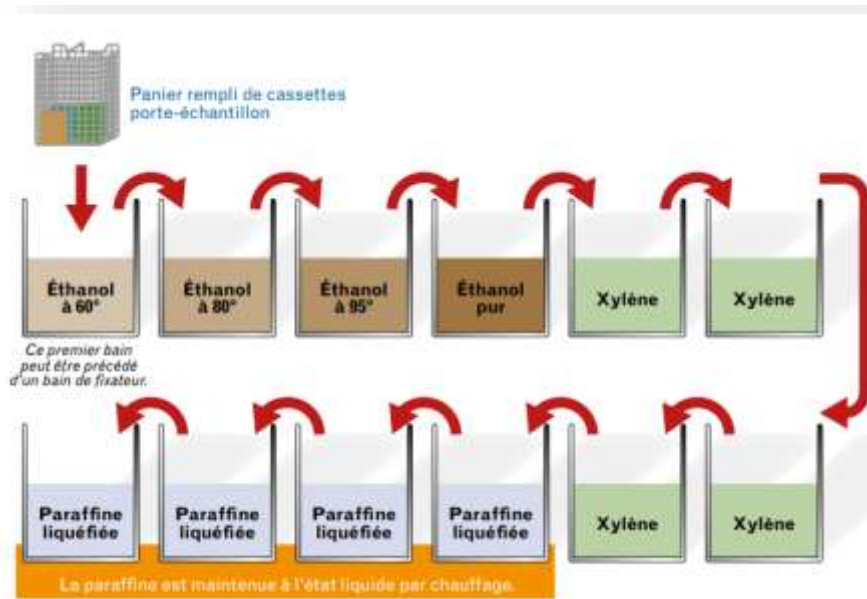


Figure 4 : schéma illustrant le processus de circulation



Figure 5: Automate à inclusion sous vide Tissue-Tek VIP® 6 AI disponible au service

1.5. L'inclusion en Paraffine :

L'inclusion des prélèvements se fait dans la paraffine chauffée à 56°, en choisissant le moule adéquat en fonction de la taille du prélèvement et en respecter l'orientation des fragments. Après l'inclusion, les blocs sont mis par la suite sur une plaque refroidie à -10° avant le démoulage des blocs.



Figure 6: Console d'enrobage des tissus « Tissue-Tek® TEC™ 5 » disponible au service.

1.6. La coupe :

Les blocs sont coupés par la suite en utilisant des microtomes (coupe de 3 à 5 micron). Les rubans sont étalés sur le bain mari chauffé à 49° (préparation : 2g de gélatine dans 2l d'eau distillé), puis récupérés par les lames. Ces dernières sont déparaffinées dans l'étuve à 65° pendant 30min.



Figure 7 : Microtome rotatif semi-automatique AEM 450 disponible au service.

2. Etude microscopique :

2.1. Analyse morphologique :

L'analyse anatomopathologique a été effectuée sur des prélèvements colorés par la coloration standard HPS (Hématoxyline, Phloxine, Safran) (la phloxine est remplacé parfois par l'éosine).

2.1.1. Coloration standard HPS/HES :

C'est une coloration histologique topographique standard, associant à une coloration nucléaire par l'hémalun, une coloration cytoplasmique par la phloxine et une coloration du collagène par le safran. C'est une coloration trichromique.

♦ Réactifs

- Hématoxyline de MAYER : Solution aqueuse saturée d'alun de potassium (2%)
1000ml + Hématéine 2 g + Acide Acétique 20 ml.
- Eau chlorhydrique à 1% dans l'eau distillée.
- Eau ammoniacale à 1% dans l'eau distillée.
- Phloxine à 2 o/oo dans l'eau distillée (parfois remplacé par l'éosine)
- Safran en solution alcoolique (CI 75100)

♦ Résultats :

- Les noyaux sont **bleus violets**
- Les cytoplasmes sont **roses**
- Les hématies sont **rouges** ou non colorées
- Les fibres de collagène sont **roses – orangées**

Technique

- ✓ Plonger la lame dans trois bains de xylène en agitant 3x5 min
- ✓ Plonger dans deux bains d'alcool absolu en agitant les lames 2x3 min
- ✓ Plonger dans un bain d'alcool à 80% en agitant 2 min
- ✓ Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée
- ✓ Colorer à l'Hémalun 5 min
- ✓ Rincer à l'eau courante
- ✓ Plonger dans l'eau chlorhydrique
- ✓ Rincer à l'eau courante
- ✓ Plonger dans l'eau ammoniacale
- ✓ Rincer à l'eau courante
- ✓ Contrôler la différenciation au microscope
- ✓ Rincer à l'eau distillée
- ✓ Colorer à la Phloxine 3 min
- ✓ Rincer à l'eau courante
- ✓ Plonger dans l'alcool absolu en agitant la lame •1 min
- ✓ Plonger dans un deuxième bain d'alcool absolu •2 min
- ✓ Colorer au Safran 4 à 6 min
- ✓ Rincer dans deux bains d'alcool absolu en agitant la lame
- ✓ Plonger dans trois bains de xylène en agitant la lame
- ✓ Monter sous lamelle à l'aide de résine

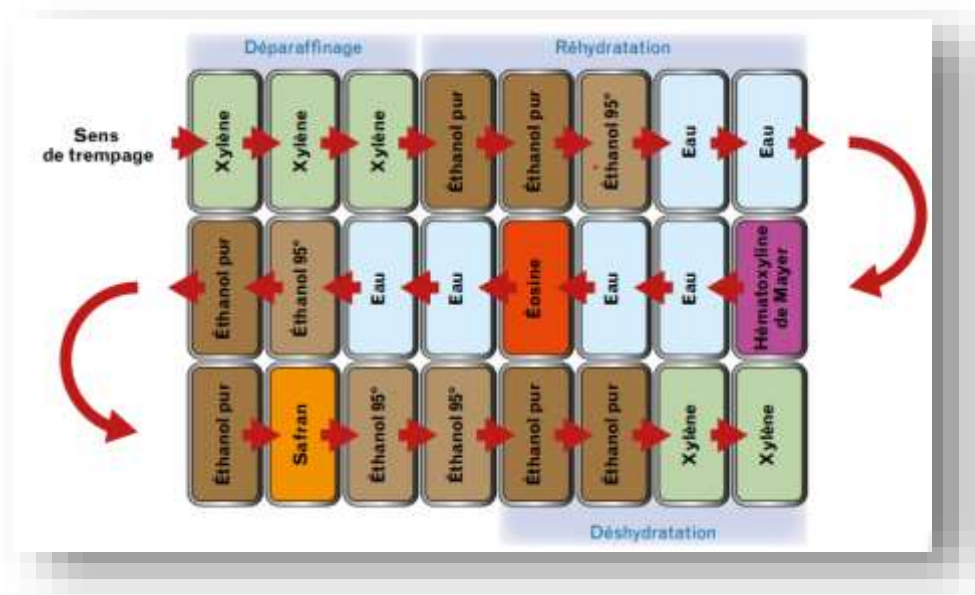


Figure 8 : schéma illustrant les différentes étapes de coloration standard.



Figure 9 : Automate de coloration de lames Tissue-Tek® DRS™ 2000 disponible au service.

2.1.2. Le diagnostic histologique :

Le diagnostic des différents sous-types histologiques a été fait selon la 4^{ème} édition de la classification OMS des tumeurs des tissus mous et de l'os (2013).

ADIPOCYTIC TUMOURS			
Benign			
Lipoma	8850/0	Solitary fibrous tumour	8815/1*
Lipomatosis	8850/0	Solitary fibrous tumour, malignant	8815/3
Lipomatosis of nerve	8850/0	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Lipoblastoma/lipoblastomatosis	8881/0	Low-grade myofibroblastic sarcoma	8825/3*
Angiolipoma	8851/0	Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma/	
Myolipoma	8890/0	Atypical myxoinflammatory fibroblastic tumour	8811/1*
Chondroid lipoma	8862/0	Infantile fibrosarcoma	8814/3
Extra-renal angiolipoma	8860/0	Malignant	
Extra-adrenal myolipoma	8870/0	Adult fibrosarcoma	8810/3
Spindle cell/pleomorphic lipoma	8857/0	Myxofibrosarcoma	8811/3
Hibernoma	8880/0	Low-grade fibromyxoid sarcoma	8840/3*
		Sclerosing epithelioid fibrosarcoma	8840/3*
Intermediate (locally aggressive)			
Atypical lipomatous tumour/	8850/1	SO-CALLED FIBROHISTIOCYTIC TUMOURS	
well differentiated liposarcoma	8850/3	Benign	
Malignant			
Dedifferentiated liposarcoma	8858/3	Tenosynovial giant cell tumour	
Myxoid liposarcoma	8852/3	localized type	9252/0
Pleomorphic liposarcoma	8854/3	diffuse type	9252/1*
Liposarcoma, not otherwise specified	8850/3	malignant	9252/3
FIBROBLASTIC / MYOFIBROBLASTIC TUMOURS			
Benign			
Nodular fasciitis	8828/0*	Deep benign fibrous histiocytoma	8831/0
Proliferative fasciitis	8828/0*	Intermediate (rarely metastasizing)	
Proliferative myositis	8828/0*	Plexiform fibrohistiocytic tumour	8835/1
Myositis ossificans		Giant cell tumour of soft tissues	9251/1
Fibro-osseous pseudotumour of digits		SMOOTH MUSCLE TUMOURS	
Ischaemic fasciitis		Benign	
Elastofibroma	8820/0	Deep leiomyoma	8890/0
Fibrous hamartoma of infancy		Malignant	
Fibromatosis coli		Leiomyosarcoma (excluding skin)	8890/3
Juvenile hyaline fibromatosis		PERICYTIC (PERVASCULAR) TUMOURS	
Inclusion body fibromatosis		Glomus tumour (and variants)	8711/0
Fibroma of tendon sheath	8813/0	Glomangiomas	8711/1*
Desmoplastic fibroblastoma	8810/0	Malignant glomus tumour	8711/3
Mammary-type myofibroblastoma	8825/0	Myopericytoma	8824/0
Calcifying aponeurotic fibroma	8816/0*	Myofibroma	8824/0
Angiomyofibroblastoma	8826/0	Myofibromatosis	8824/1
Cellular angiofibroma	9160/0	Angioleiomyoma	8804/0
Nuchal-type fibroma	8810/0	SKELETAL MUSCLE TUMOURS	
Gardner fibroma	8810/0	Benign	
Calcifying fibrous tumour	8817/0*	Rhabdomyoma	8900/0
Intermediate (locally aggressive)			
Palmar/plantar fibromatosis	8813/1*	Adult type	8904/0
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Fetal type	8903/0
Lipofibromatosis	8851/1*	Genital type	8905/0
Giant cell fibroblastoma	8834/1	Malignant	
Intermediate (rarely metastasizing)			
Dermatofibrosarcoma protuberans	8832/1*	Embryonal rhabdomyosarcoma	
Fibrosarcomatous dermatofibrosarcoma		(including botryoid, anaplastic)	8910/3
protuberans	8832/3*	Alveolar rhabdomyosarcoma	
Pigmented dermatofibrosarcoma protuberans	8833/1*	(including solid, anaplastic)	8920/3
		Pleomorphic rhabdomyosarcoma	8901/3
		Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma	8912/3

Figure 10 : classification OMS des tumeurs des tissus mous 2013.

**INTERET DE L'HYBRIDATION IN SITU PAR FLUORESCENCE ET DE LA REUNION DE CONCERTATION
PLURIDISCIPLINAIRE DANS LA PRISE EN CHARGE DES SARCOMES DES PARTIES MOLLES DES EXTREMITES**

VASCULAR TUMOURS OF SOFT TISSUE		Malignant	
Benign		Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3
Haemangioma	9120/0	Epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumour	9542/3*
Synovial		Malignant Triton tumour	9561/3
Venous	9122/0	Malignant granular cell tumour	9580/3
Arteriovenous haemangioma/malformation	9123/0	Ectomesenchymoma	8921/3
Intramuscular	9132/0		
Epithelioid haemangioma	9125/0	TUMOURS OF UNCERTAIN DIFFERENTIATION	
Angiomatosis		Benign	
Lymphangioma	9170/0	Acrall fibromyxoma	8811/0
Intermediate (locally aggressive)		Intramuscular myxoma	
Kaposiform haemangioendothelioma	9130/1	(including cellular variant)	8840/0
Intermediate (rarely metastasizing)		Juxta-articular myxoma	8840/0
Reitrom haemangioendothelioma	9136/1*	Deep ("aggressive") angiomyxoma	8841/0*
Papillary intralymphatic angioendothelioma	9135/1	Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumour	8802/1*
Composite haemangioendothelioma	9136/1	Ectopic hamartomatous thymoma	8587/0
Pseudomyogenic (epithelioid sarcoma-like)		Intermediate (locally aggressive)	
haemangioendothelioma	9136/1	Haemosiderotic fibrolipomatous tumour	8811/1*
Kaposi sarcoma	9140/3	Intermediate (rarely metastasizing)	
Malignant		Atypical fibroxanthoma	8830/1
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3	Angiomatoid fibrous histiocytoma	8836/1
Angiosarcoma of soft tissue	9120/3	Ossifying fibromyxoid tumour	8842/0
		Ossifying fibromyxoid tumour, malignant	8842/3*
		Mixed tumour NOS	8940/0
		Mixed tumour NOS, malignant	8940/3
		Myoepithelioma	8882/0
		Myoepithelial carcinoma	8982/3
		Phosphaturic mesenchymal tumour, benign	8990/0
		Phosphaturic mesenchymal tumour, malignant	8990/3
CHONDRO-OSSEOUS TUMOURS		Malignant	
Soft tissue chondroma	9220/0	Synovial sarcoma NOS	9040/3
Extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma	9240/3	Synovial sarcoma, spindle cell	9041/3
Extraskeletal osteosarcoma	9180/3	Synovial sarcoma, biphasic	9043/3
		Epithelioid sarcoma	8804/3
		Alveolar soft-part sarcoma	9561/3
		Clear cell sarcoma of soft tissue	9044/3
		Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	9231/3
		Extraskeletal Ewing sarcoma	9364/3
		Desmoplastic small round cell tumour	8806/3
		Extra-renal rhabdoid tumour	8963/3
		Necroplasma with perivascular epithelioid	
		cell differentiation (PEComa)	
		PEComa NOS, benign	8714/0*
		PEComa NOS, malignant	8714/3*
		Intimal sarcoma	9137/3*
GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOURS		UNDIFFERENTIATED/UNCLASSIFIED SARCOMAS	
Benign gastrointestinal stromal tumour	8936/0	Undifferentiated spindle cell sarcoma	8801/3
Gastrointestinal stromal tumour, uncertain malignant potential	8936/1	Undifferentiated pleomorphic sarcoma	8802/3
Gastrointestinal stromal tumour, malignant	8936/3	Undifferentiated round cell sarcoma	8803/3
		Undifferentiated epithelioid sarcoma	8804/3
		Undifferentiated sarcoma NOS	8805/3
NERVE SHEATH TUMOURS			
Benign			
Schwannoma (including variants)	9560/0		
Melanotic schwannoma	9560/1*		
Neurofibroma (incl. variants)	9540/0		
Plexiform neurofibroma	9550/0		
Perineurioma	9571/0		
Malignant perineurioma	9571/3		
Granular cell tumour	9580/0		
Dermal nerve sheath myxoma	9562/0		
Solitary circumscribed neuroma	9570/0		
Ectopic meningioma	9530/0		
Nasal glial heterotopia			
Benign Triton tumour			
Hybrid nerve sheath tumours	9563/0*		

Figure 10 : classification OMS des tumeurs des tissus mous 2013 (suite).

Le grade histologique été effectué selon le grading de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC).

Système de grading de la FNCLCC
1. Différenciation tumorale Score 1 : sarcomes reproduisant un tissu très proche du tissu normal (par exemple, liposarcome bien différencié...) Score 2 : sarcomes pour lesquels le diagnostic de type histologique est certain et incontestable (par exemple, liposarcome myxoïde, chondrosarcome myxoïde...) Score 3 : sarcomes embryonnaires, synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes, sarcomes à cellules claires, sarcomes alvéolaires des parties molles, sarcomes peu différenciés ou indifférenciés et sarcomes pour lesquels le type histologique est incertain, donc contestable
2. Index mitotique (pour une surface de champ de 0,1734 mm ²) Score 1* : 0-9 mitoses/10 champs au grossissement x 400 Score 2* : 10-19 mitoses/10 champs au grossissement x 400 Score 3* : > 19 mitoses/10 champs au grossissement x 400
3. Nécrose tumorale (évaluation microscopique corrélée à l'examen macroscopique) Score 0 : pas de nécrose Score 1 : nécrose occupant moins de 50% de la surface tumorale Score 2 : plus de 50% de la surface tumorale nécrosée
Le grade est obtenu par la somme des scores attribués aux trois paramètres : Grade 1 : total des scores = 2 ou 3 Grade 2 : total des scores = 4 ou 5 Grade 3 : total des scores = 6, 7 ou 8

Tableau 1 : système de grading de la FNCLCC

Well-differentiated liposarcoma	1
Myxoid liposarcoma	2
Round cell liposarcoma	3
Pleomorphic liposarcoma	3
Dedifferentiated liposarcoma	3
Fibrosarcoma	2
Myxofibrosarcoma	2
MFH,† pleomorphic type (patternless pleomorphic sarcoma)	3
Giant cell and inflammatory MFH† (pleomorphic sarcoma, NOS, with giant cells or inflammatory cells)	3
Conventional MPNST	2
Poorly differentiated MPNST	3
Malignant Triton tumor	3
Well-differentiated leiomyosarcoma	1
Conventional leiomyosarcoma	2
Poorly differentiated/pleomorphic/epithelioid leiomyosarcoma	3
Biphasic/monophasic synovial sarcoma	3
Poorly differentiated synovial sarcoma	3
Rhabdomyosarcoma	3
Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	2
Mesenchymal chondrosarcoma	3
Extraskeletal osteosarcoma	3
Ewing sarcoma/PNET	3
Epithelioid sarcoma	3
Malignant rhabdoid tumor	3
Undifferentiated (spindle cell and pleomorphic) sarcoma	3

Figure 11: score de différenciation en fonction du type histologique.

Pour les pièces Opératoires, la qualité de l'exérèse chirurgicale (R0, R1, R2) a été évaluée selon la classification de l'UICC (union internationale contre le cancer), qui définit une résection chirurgicale « R0 » une exérèse complète (où la limite entre la tumeur et le tissu sain dépasse 1 mm), une résection chirurgicale « R1 » où l'exérèse est incomplète avec un résidu microscopique (limite entre la tumeur et le tissu sain est moins de 1 mm), et une résection chirurgicale « R2 » une exérèse avec un résidu macroscopique.

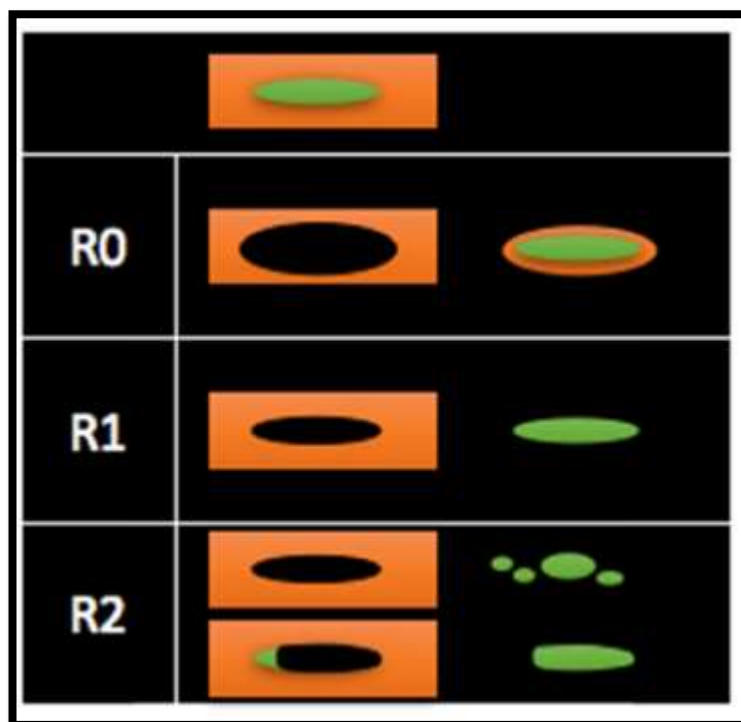


Figure 12 : schéma illustrant les différentes catégories de la qualité de l'exérèse chirurgicale selon l'UICC.

CATEGORY	DEFINITION
Primary tumor (T)	
Tx	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Tumor ≤ 5 cm in greatest dimension
T2	Tumor > 5 cm and ≤ 10 cm in greatest dimension
T3	Tumor > 10 cm and ≤ 15 cm in greatest dimension
T4	Tumor > 15 cm in greatest dimension
Regional lymph nodes (N)	
N0	No regional lymph node metastasis or unknown lymph node status
N1	Regional lymph node metastasis
Distant metastasis (M)	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

Tableau 2 : stadification TNM selon l'AJCC (8^{ème} édition)

STAGE	AJCC CLASSIFICATION			GRADE
	TUMOR	LYMPH NODE	METASTASIS	
Stage IA	T1	N0	M0	G1, GX
Stage IB	T2	N0	M0	G1, GX
	T3	N0	M0	G1, GX
	T4	N0	M0	G1, GX
	T4	N0	M0	G1, GX
Stage II	T1	N0	M0	G2, G3
Stage IIIA	T2	N0	M0	G2, G3
Stage IIIB	T3	N0	M0	G2, G3
	T4	N0	M0	G2, G3
Stage IV	Any T	N1	M0	Any G
	Any T	Any N	M1	Any G

Tableau 3 : classification des stades pronostiques selon l'AJCC (8^{ème} édition)

2.2. Etude immunohistochimique :

Une étude immunohistochimique a été réalisée dans la majorité des cas, selon l'orientation diagnostique morphologique.

2.2.1. La technique d'immunohistochimie indirecte :

La technique d'immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de tissu fixé au Formol et inclus en paraffine, et coupé à 5 µm d'épaisseur.

Les fragments tissulaires coupés ont été étalés sur des lames salinisées commercialisées spécialement pour cette technique. Les lames ont été incubées dans une étuve dont la température est réglée à 58° pendant une nuit. Par la suite, un déparaffinage a été fait en immergeant les lames dans deux bains de Toluène pendant 5 min, puis deux bains d'éthanol absolu et à 95% successivement pendant 5 min. après un démasquage a été réalisé dans le but de provoquer une rupture des liaisons entre les protéines lors de la fixation, pour permettre l'accessibilité de la reconnaissance de l'anticorps spécifique. Ce démasquage a été réalisé à l'aide d'une solution livrée avec

le Kit commercialisé, et utilisée après dilution dans l'eau distillée. La dénaturation est nécessaire pour libérer les sites de fixation des anticorps sur leurs récepteurs antigéniques spécifiques, et se fait par un passage au bain marie à 95°, suivi d'un refroidissement des lames à température ambiante pendant 20 à 30 min dans leur solution de démasquage. Par la suite, les lames sont rincées dans un bain de PBS (Phosphate-Buffered Saline) dont le but est d'arrêter la dénaturation. Les lames sont ensuite mises dans un milieu humide, fait d'un papier imbibé par l'eau distillé.

Après avoir mis la peroxydase bloquante (1 à 2 gouttes/fragment), un rinçage à la solution de PBS est réalisé par la suite pour appliquer l'anticorps primaire (incubation à l'obscurité pendant 45 min), puis un lavage par la solution de PBS dans deux bains pendant 5 min, puis l'application de l'anticorps secondaire (incubation pendant 30 min) puis un rinçage par la solution de PBS.

La révélation du complexe AC-Ag a été réalisée à l'aide d'une solution de révélation fraîchement préparée en mélangeant une goutte de DAB (3,3-Diaminobenzidine, DAKO) (qui est un chromogène donnant une coloration marron des sites spécifiques) avec 1 ml d'un tampon spécial livré avec le Kit. Cette étape est suivie par un rinçage par l'eau distillée, suivi d'une application de l'hématoxyline (pour permettre la coloration des noyaux en bleu) suivie d'un deuxième lavage à l'eau distillé.

La dernière étape consiste à faire passer les lames dans une solution d'alcool ammoniacal puis une déshydratation par un bain d'alcool de concentration décroissante avant de finir par un montage standard.

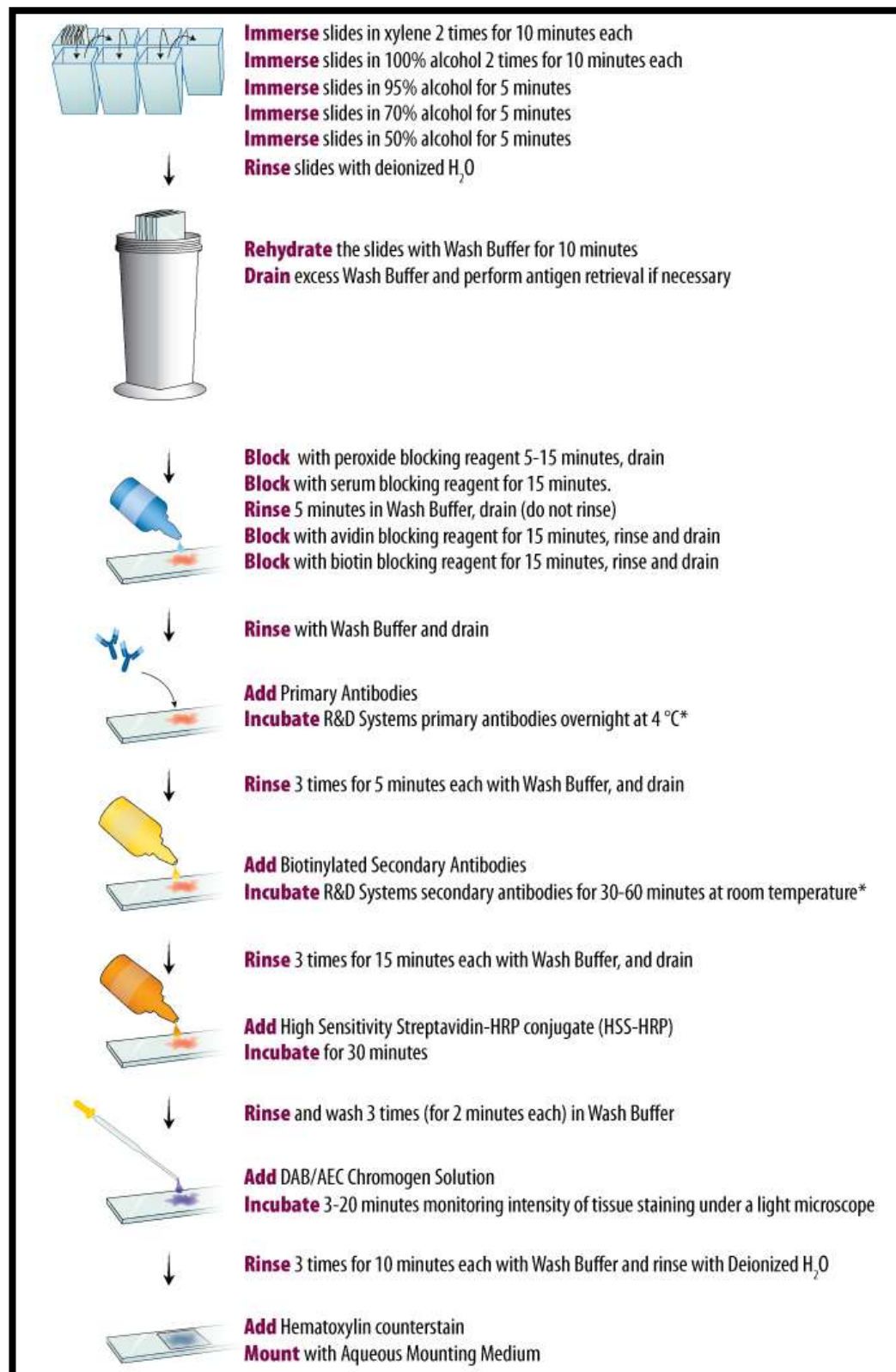


Figure 13: schéma résumant les différents étapes du protocole de l'immunohistochimie indirecte.

2.2.2. Choix des anticorps :

Le choix des anticorps à réaliser dépendait de l'aspect morphologique et de l'orientation clinique et radiologique.

<i>Anticorps</i>	<i>Clone</i>	<i>Marquage</i>
<i>CK</i>	AE1 /AE3 DAKO	Cytoplasmique
<i>CD99</i>	12 EZ DAKO	Membranaire
<i>AML</i>	1A4 DAKO	Cytoplasmique
<i>DESMINE</i>	D33 DAKO	Cytoplasmique
<i>H-CALDESZONE</i>	h-CD DAKO	Cytoplasmique
<i>MYOGENINE</i>	F5D DAKO	Cytoplasmique
<i>EMA</i>	E29 DAKO	Cytoplasmique/membranaire
<i>PS 100</i>	POLYCLONAL Rabbit AntiS100 DAKO	Cytoplasmique
<i>CD34</i>	QBend10 DAKO	Membranaire
<i>CD31</i>	JC70a DAKO	Membranaire
<i>STAT6</i>	EP 325 DAKO	Nucléaire

Tableau 4 : liste des anticorps utilisés en première-intention en fonction de l'aspect morphologique.

Diagnostic Group	Tumor Type	Immunohistochemistry			Genetic Alteration
		Positive Markers	Negative Markers		
Round cell sarcomas	Ewing sarcoma	CD99 (100%), NKX2.2 (> 90%)	ETV4, WT1, BCOR, CCNB3		<i>EW/SRI-FLI1</i> fusion (<i>EW/SRI-ERG</i> , others)
	<i>CIC</i> -rearranged sarcoma	CD99 (20%), ETV4 (> 90%), WT1 (> 90%)	NKX2.2		<i>CIC-DUX4</i> fusion (<i>CIC-FOY04</i>)
	<i>BCOR</i> -rearranged sarcoma	CD99 (80%), BCOR (> 90%), CCNB3 (90%)	NKX2.2		<i>BCOR-CCNB3</i> fusion (<i>BCOR-MAML3</i> , <i>ZC3H7B-BCOR7</i> , <i>KMT2D-BCOR</i>)
Vascular tumors	Epithelioid hemanjoma	CD31, ERG, FOSB (50%)	—		<i>ZFP36-FOSB</i> fusion, <i>WWTR1-FOSB</i> fusion, <i>FOS</i> rearrangement
	Epithelioid hemangioendothelioma	CD31, ERG, keratin (25%), CAMTA1 (90%), TFE3 (5%)	—		<i>WWTR1-CAMTA1</i> fusion (90%), <i>YAPI-TFE3</i> fusion (5%)
	Pseudomyogenic hemangioendothelioma	CD31, ERG, keratin, FOSB (> 90%)	—		<i>SERPINE1-FOSB</i> fusion
SMARCB1-deficient tumors	Malignant rhabdoid tumor	Keratin, EMA, various others	SMARCB1 (100%)		<i>SMARCB1</i> mutation/deletion
	Epithelioid sarcoma	Keratin, EMA, CD34 (55%)	SMARCB1 (90%)		<i>SMARCB1</i> deletion (miR-206, -381, 671-5p upregulation)
	Epithelioid schwannoma	S100 (100%), SOX10 (100%), GFAP (40%)	SMARCB1 (40%)		NA
	Epithelioid MPNST	S100 (100%), SOX10 (100%), GFAP (60%)	SMARCB1 (70%)		NA
	Poorly differentiated chordoma	Brachyury (100%), keratin (100%)	SMARCB1 (100%)		NA
	Myoepithelial carcinoma	Myoepithelial markers (p63, SMA, GFAP, S100), keratin	SMARCB1 (10-40%)		NA
Adipocytic tumors with spindle cell features	Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	S100 (< 50%), EMA (30%)	SMARCB1 (17%)		<i>NR4A3-EW/SRI</i> fusion (<i>NR4A3-TAF15</i>)
	Renal medullary carcinoma	PAX8, keratin	SMARCB1 (90%)		<i>SMARCB1</i> rearrangement
	Spindle cell/pleomorphic lipoma	CD34	RB1		13q14 deletion (<i>RB1</i>)
Giant cell-rich bone tumors	Atypical spindle cell lipomatous tumor	CD34 (60%), S100 (40%), desmin (20%)	RB1 (50%)		13q14 deletion (<i>RB1</i>)
	Atypical lipomatous tumor	MDM2, CDK4, HMGA2	—		12q13-15 high-level amplification (<i>MDM2</i> , <i>CDK4</i> , <i>HMGA2</i>)
	Giant cell tumor of bone	H3G34W (> 90%), rarely G34V or G34R)	H3K36M		<i>H3F3A (H3F3B)</i> G34W mutation (G34V, G34R, G34L, G34M)
Sinonasal sarcoma	Chondroblastoma	H3K36M (> 95%)	H3G34W		<i>H3F3B (H3F3A)</i> K36M mutation
	Biphenotypic sinonasal sarcoma	S100, SMA (desmin, myogenin), PAX3 (PAX8), β -catenin (TLE1)	—		<i>PAX3-MAML3</i> fusion (<i>PAX3-FOY01</i> , <i>PAX3-NCOA1</i> , others)
EMA indicates epithelial membrane antigen; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MPNST, malignant peripheral nerve sheath tumor; NA, not available.					

Tableau 5 : Vue d'ensemble des marqueurs immunohistochimiques et des corrélations moléculaires dans le diagnostic différentiel de certains sarcomes à cellules rondes. tumeurs vasculaires. tumeurs adipoctaires.

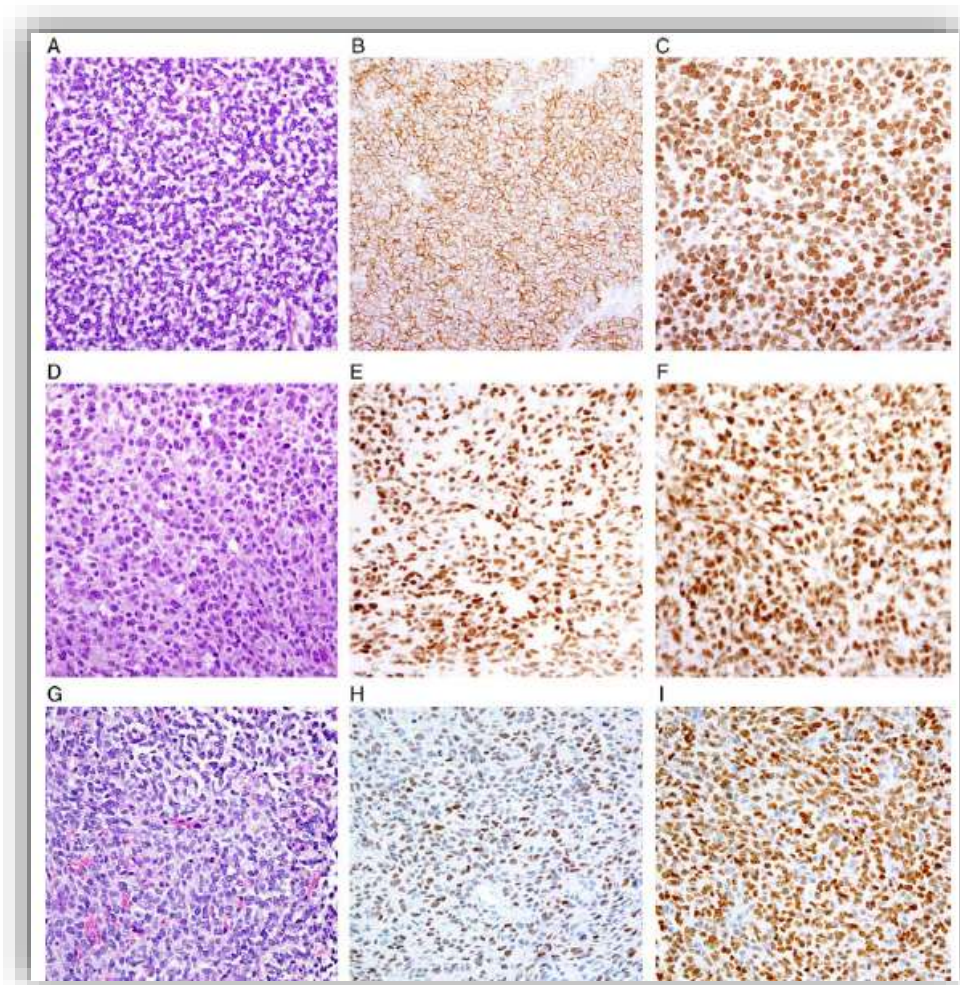


Figure 14 : Entités émergentes dans le groupe des sarcomes à cellules rondes. Le sarcome d'Ewing est caractérisé par des cellules tumorales uniformes avec des noyaux arrondis et des nucléoles discrets (A) avec une expression membranaire diffuse du CD99 (B) et une expression nucléaire du facteur de transcription NKX2.2 (C). Le sarcome CIC réarrangé est constitué d'une population morphologiquement plus hétérogène de cellules tumorales primitives rondes à ovoïdes (D) avec une expression nucléaire de ETV4 (E) et WT1 (F). Le sarcome BCOR réarrangé présente des cellules tumorales rondes à ovoïdes, montrant une architecture diffuse avec un stroma myxoïde proéminent de manière variable (G). Ces tumeurs montrent l'expression de BCOR (H) et CCNB3 (I).

2.3. Etude cytogénétique par hybridation in situ par fluorescence (FISH)

2.3.1. Principe et interprétation :

Diverses anomalies génétiques dans les tumeurs des tissus mous et des os ont récemment été identifiées par séquençage de nouvelle génération (NGS), la dernière méthode rapide et puissante d'analyse génomique complète, contribuant à la confirmation génétique du diagnostic des différents sous-types histologiques [12]. Les tumeurs des tissus mous peuvent être génétiquement diagnostiquées en utilisant l'hybridation in situ par fluorescence (FISH), un outil pratique et efficace. Cette technique peut détecter des translocations chromosomiques, des amplifications géniques, des délétions géniques et des polyploïdies anormales dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE), le type d'échantillons que nous utilisons universellement pour le diagnostic pathologique de routine. Parmi les nombreuses anomalies génétiques possibles, des gènes chimériques spécifiques dérivés de translocations chromosomiques sont particulièrement précieux pour le diagnostic de confirmation du sarcome avec translocation, qui comprend environ 25% des sarcomes des tissus mous (STM) [13].

Actuellement, de nombreuses sondes de FISH commerciales sont disponibles, permettant ainsi d'effectuer cette technique dans de nombreux laboratoires de pathologie et de jouer à l'avenir un rôle de plus en plus important dans l'analyse génétique des tumeurs des tissus mous.

Dans la pratique courante, on utilise généralement des sondes ADN qui détectent certaines anomalies de l'ADN génomique dans les chromosomes [14]. Ces sondes sont conçues pour inclure certaines parties d'une séquence de bases spécifiques et complémentaires de l'ADN chromosomique cible, et ces séquences de bases sont ensuite marquées avec des colorants fluorescents rouges et verts. Ainsi, la présence de

certaines anomalies génétiques dans les tumeurs peut être confirmée par la détection de signaux fluorescents rouges et verts. Pour interpréter ce modèle de signal, il est impératif qu'on comprend précisément les conceptions des sondes et quels types d'anomalies peuvent être détectés. Dans la situation pratique, on étudie les signaux fluorescents sous forme de «points» rouges et verts sous un microscope fluorescent et on interprète les modèles de signaux pour évaluer les anomalies génétiques (15).

La figure 12 montre certains modèles de signaux et les interprétations d'anomalies représentatives, y compris la translocation, l'amplification, la suppression et la polyploïdie.

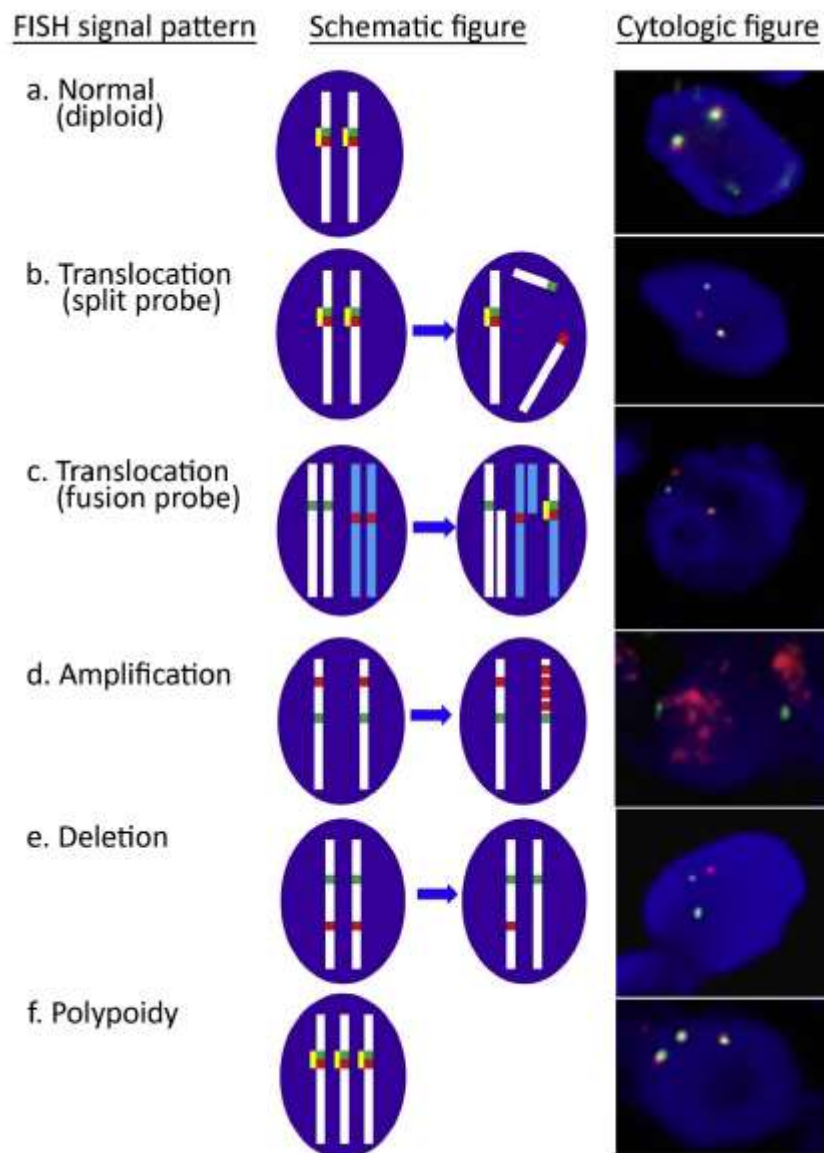


Figure 15 : représentation schématique et cytologique des différents signaux détectés par FISH.

a. La translocation chromosomique :

Les sarcomes avec translocation réciproque spécifique représentent environ 10 à 15 % de l'ensemble des sarcomes. Les plus fréquents sont le dermatofibrosarcome protubérant de Darier et Ferrand, le liposarcome myxoïde, le sarcome d'Ewing et le synoviosarcome. La présence d'une translocation réciproque dans le sarcome d'Ewing a été la première translocation rapportée dans une tumeur solide humaine par deux équipes françaises en 1983 [16, 17].

Ces translocations aboutissent à un gène de fusion que l'on suppose être directement responsable du développement tumoral (Fig 13). La plupart de ces gènes de fusion codent pour un facteur de transcription chimérique aberrant en combinant un promoteur fort, comme EWSR1, qui confère le niveau d'expression et un domaine dit de DNA-binding, tel FLI1, ERG, ATF1, WT1, qui confère la spécificité d'activation transcriptionnelle [18]. Un second mécanisme a pour résultat un facteur de croissance autocrine tel qu'observé dans le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand avec la fusion des gènes COL1A et PDGFB [19]. Le troisième mécanisme implique la fusion du domaine catalytique d'un récepteur tyrosine-kinase qui a pour résultat l'activation de tyrosine-kinase indépendante du ligand tel qu'observé dans le fibrosarcome congénital avec la fusion de ETV6 et NTRK3 (20).

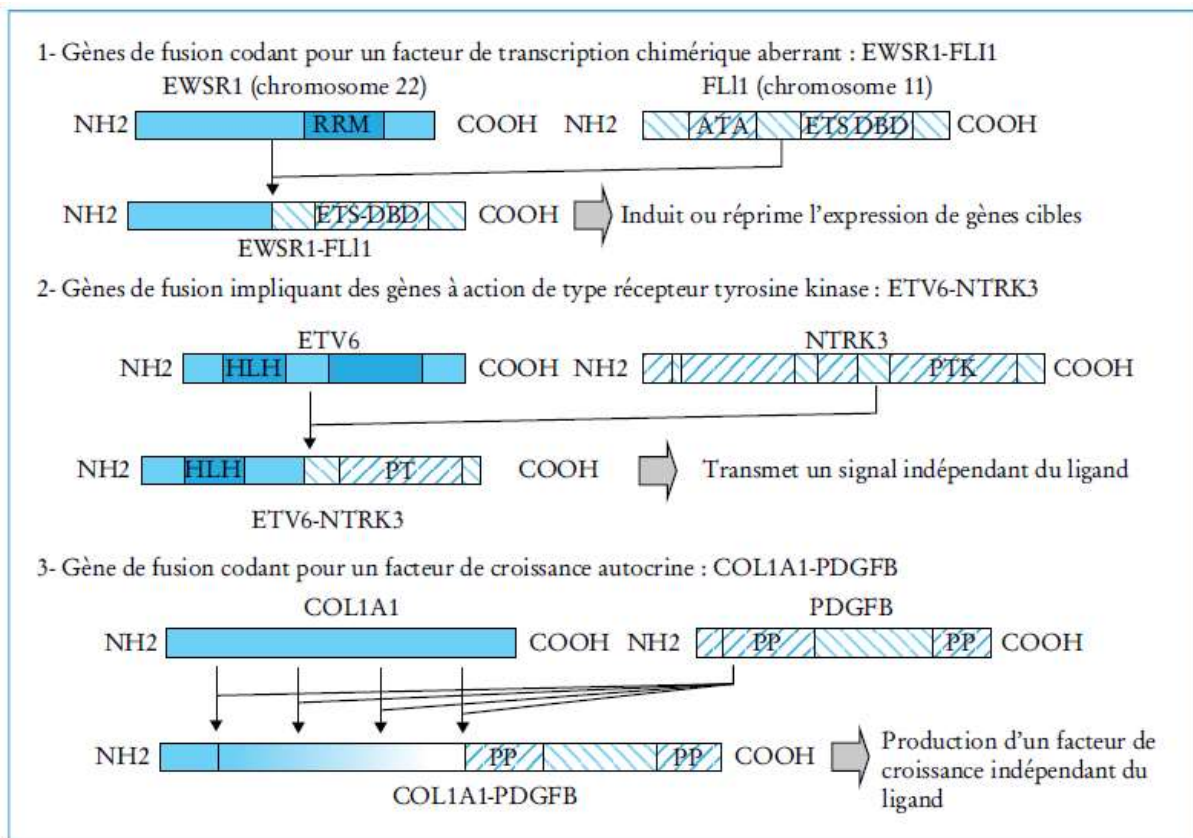


Figure 16 : Schéma des trois catégories de translocation réciproque observées dans les sarcomes

Ces translocations sont détectées à l'aide de sondes bicolores, à signal divisé ou bicolore à signal fusionné [14,21]. Les sondes à signal divisé sont conçues pour englober un point de rupture dans le chromosome entre les colorants rouge et vert, On voit donc deux paires de signaux fusionnés dans des cellules diploïdes normales. Lorsqu'une translocation chromosomique s'est produite, nous observons une paire de signaux fusionnés et divisés car la rupture chromosomique crée une distance entre les points rouge et vert. D'autre part, les sondes à signal fusionné sont conçues pour englober un point de fusion prospectif sur le chromosome dérivé entre les colorants rouge et vert [23, 24]. Par conséquent, les interprétations des signaux de translocation positifs sont complètement différentes entre les sondes à signal divisé et fusionné à moins que les deux sondes ne présentent le même modèle de signal.

Plusieurs sondes sont maintenant commercialement disponibles : EWSR1, FOXO1A pour le rhabdomyosarcome alvéolaire, SS18 pour le synoviosarcome, DDIT3 pour le liposarcome myxoïde et à cellules rondes, TLS pour le sarcome fibromyxoïde de bas grade, ETV6 pour le fibrosarcome congénital et ALK1 pour la tumeur myofibroblastique inflammatoire. Cette technique est très utilisée pour le diagnostic de sarcome d'Ewing, lorsque l'on ne dispose pas de tissu congelé, et pour le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand.

Ces translocations sont spécifiques d'un type histologique donné, à part quelques exceptions : ainsi, la translocation ETV6–NTRK3 est présente dans le fibrosarcome infantile, mais également dans le néphrome mésoblastique cellulaire, dans le carcinome sécrétoire du sein et dans un type de leucémie myéloïde aiguë ; la translocation de type ASLP–TFE3 est présente dans le sarcome alvéolaire des parties molles et également dans quelques carcinomes à cellules rénales survenant préférentiellement chez l'enfant et l'adulte jeune ; la translocation de type TPM3–ALK est présente dans la tumeur myofibroblastique inflammatoire et dans le lymphome anaplasique ; les deux translocations de type EWSR1–ATF1 et EWSR1–CREB1 sont présentes dans le sarcome à cellules claires et l'histiocytofibrome angiomatoïde. Ces données peuvent s'expliquer par un programme de différenciation différent suivant la cellule précurseur au niveau de laquelle l'anomalie moléculaire survient (23).

Tumors	Chromosome	Fusion gene
Synovial sarcoma	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SS18-SSX1, SSX2
Ewing sarcoma	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FU1
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG
	t(7;22)(p22;q12)	EWSR1-ETV1
	t(17;22)(q12;q12)	EWSR1-E1AF
Myxoid/round cell liposarcoma	t(12;16)(q13;p11)	FUS-DDIT3
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3
Alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1
	t(1;13)(q36;q14)	PAX7-FOXO1
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
	t(2;22)(q32.3;q12)	EWSR1-CREB1
Extraskeletal myxoid chondrosa.	t(9;22)(q22;q12)	EWSR1-NR4A3
	t(9;17)(q22;q12)	TAF15-NR4A3
DSRCT	t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1
DFSP/Giant cell fibroblastoma	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PFGFB
Infantile/congenital fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Alveolar soft part sarcoma	t(X;17)(p21;q25)	ASPCR1-TFE3
IMT	t(2;5)(p23;q35)	TPM3/4-ALK
	t(2;17)(p23;q23)	CLTC-ALK
	inv(2)(p23q13)	RANBP2-ALK
Angiomatoid fibrous histiocyoma	t(2;22)(q32.3;q12)	EWSR1-CREB1
	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
Low grade fibromyxoid sa./	t(7;16)(q34;p11)	FUS-CREB3L2
Sclerosing epithelioid fibrosa.	t(11;16)(p11;p11)	FUS-CREB3L1
Hemosiderotic fibrolipomatous t.	t(1;10)(p22;q24)	MGEA5-TGFBFR3
Myxoinflammatory fibroblastic sa.		
Mesenchymal chondrosarcoma	del(8)(q13.3q21.1)	HEY1-NCOA2
Epithelioid hemangioendothelioma	t(1;3)(p36.3;q25)	WWTR1-CAMTA1
Soft tissue myoepithelioma	t(1;22)(q23;q12)	EWSR1-PBX1
GCT of tendon sheath	t(1;2)(p13;q37)	COL6A3-CSF1
Solitary fibrous tumor	inv(12)(q13q13)	NAB2-STAT6
Nodular fasciitis	t(17;22)(p13;q13)	MYH9-USP6
Pseudomyogenic hemangioendothelioma	t(7;19)(q22;q13)	SERPINE1-FOSB
Soft tissue angiofibroma	t(5;8)(q15;q13)	AHRR-NCOA2
CIC-DUX4 sarcoma	t(4;19)(q35;q13)	CIC-DUX4
	t(10;19)(q26;q13)	CIC-DUX4
BCOR-CCNB3 sarcoma	inv(X)(p11.4;p11.22)	BCOR-CCNB3
Phosphaturic mesenchymal t.	t(2;8)(q35;p11)	FN1-FGFR1

DSRCT, Desmoplastic small round cell tumor; DFSP, Dermatofibrosarcoma protuberans; IMT, Inflammatory myofibroblastic tumor; GCT, Giant cell tumor

Figure 17 : Les différentes translocations chromosomiques dans les sarcomes des tissus mous et leur gène de fusion correspondant.

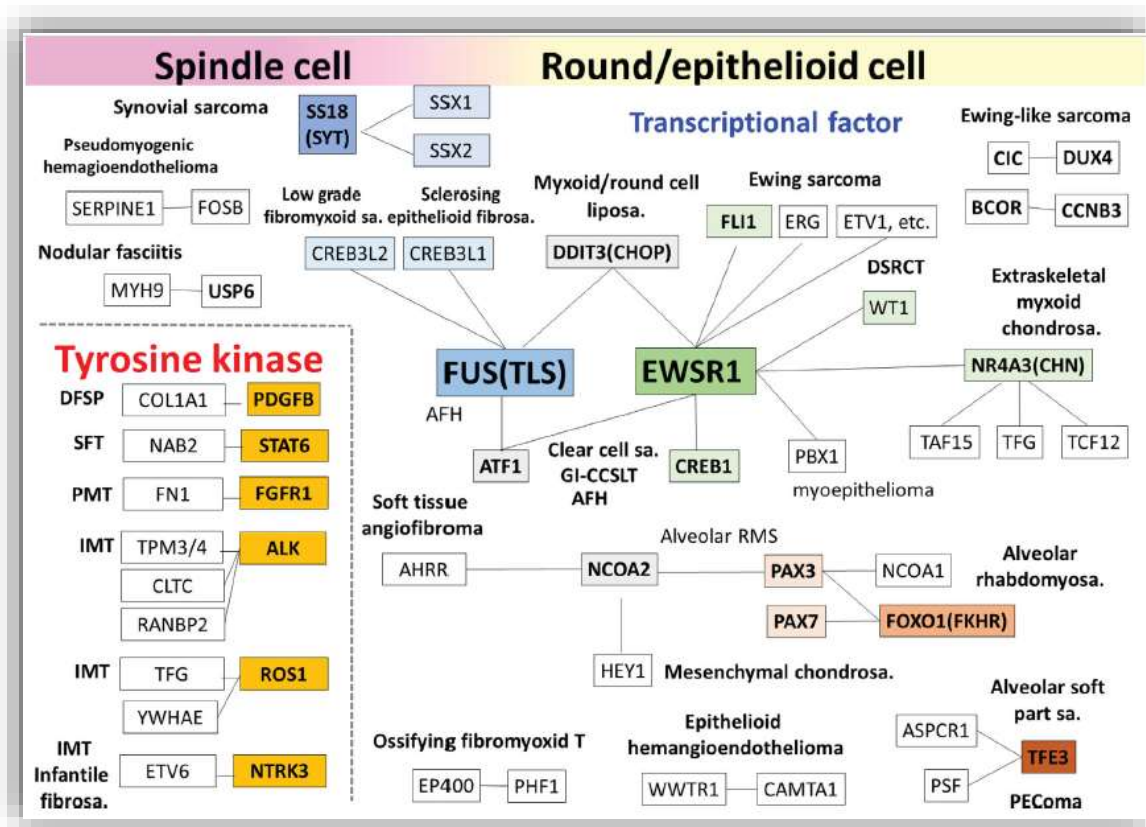


Figure 18 : Les gènes de fusion dans les sarcomes des tissus mous.

b. Amplification génique

Il s'agit principalement des tumeurs adipeuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés et des liposarcomes dédifférenciés [23]. Cette amplification implique MDM2 dans tous les cas et CDK4 dans 90 % des cas.

La catégorie des tumeurs adipeuses bien différenciées ou liposarcomes bien différenciés et liposarcomes dédifférenciés représente 10 à 15 % de l'ensemble des sarcomes et à peu près 80 % des liposarcomes. Ces tumeurs sont principalement localisées en région profonde des membres et au niveau du rétropéritoine. Au niveau du rétropéritoine, elles représentent 60 % des sarcomes.

Sur le plan cytogénétique, ces tumeurs sont caractérisées par la présence de chromosomes géants ou en anneau surnuméraires sur un fond de caryotype par ailleurs normal. Ces chromosomes surnuméraires sont constitués de séquences amplifiées de la région 12q14–15 avec amplification constante du gène MDM2, et neuf fois sur dix du gène CDK4 et plus accessoirement d'autres gènes comme HMGA2 et SAS.

Les tumeurs adipeuses bien différenciées ou liposarcomes bien différenciés sont caractérisées habituellement par un amplicon unique en 12q14–15. La coamplification MDM2 et CDK4 est certainement responsable du processus tumoral : MDM2, en tant qu'inhibiteur de p53, augmente la survie cellulaire tandis que CDK4, en tant qu'inhibiteur de RB1, augmente la prolifération cellulaire (fig 19).

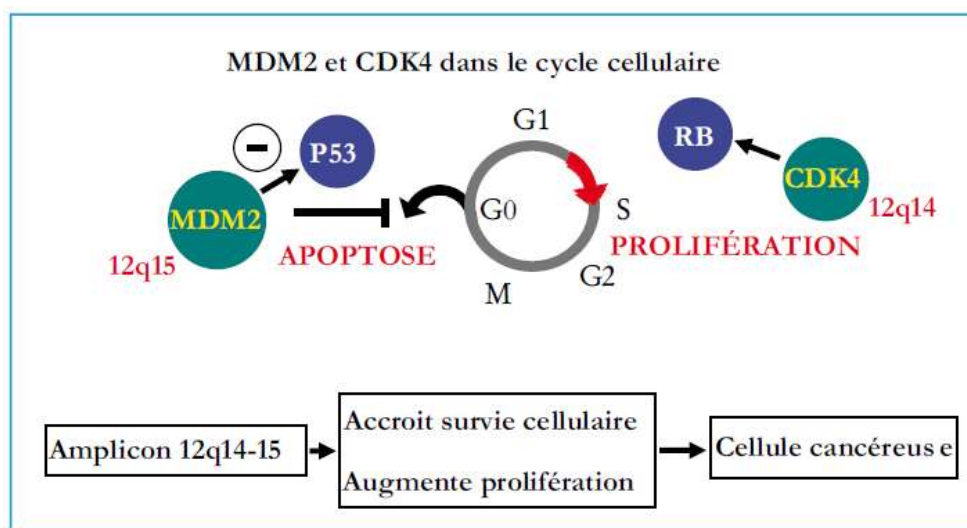


Figure 19. Mécanisme d'action de MDM2 et CDK4 au niveau du cycle cellulaire.

Dans les liposarcomes dédifférenciés, il existe habituellement une coamplification située en 1p32 et intéressant le gène JUN ou en 6q23 et impliquant le gène ASK1. L'activation de cette voie entraîne une inhibition de PPAR-gamma qui est l'initiateur de la différenciation adipocytaire [24] (fig 15) . Ainsi, cette coamplification entraîne un arrêt de la différenciation adipocytaire, expliquant le caractère dédifférencié de ce type de tumeur. L'activation de cette voie s'accompagne également

d'une agressivité accrue de la tumeur avec un potentiel métastatique de l'ordre de 15 à 25 %, alors que la tumeur adipeuse bien différenciée ou liposarcome bien différencié ne donne jamais de métastase (22).

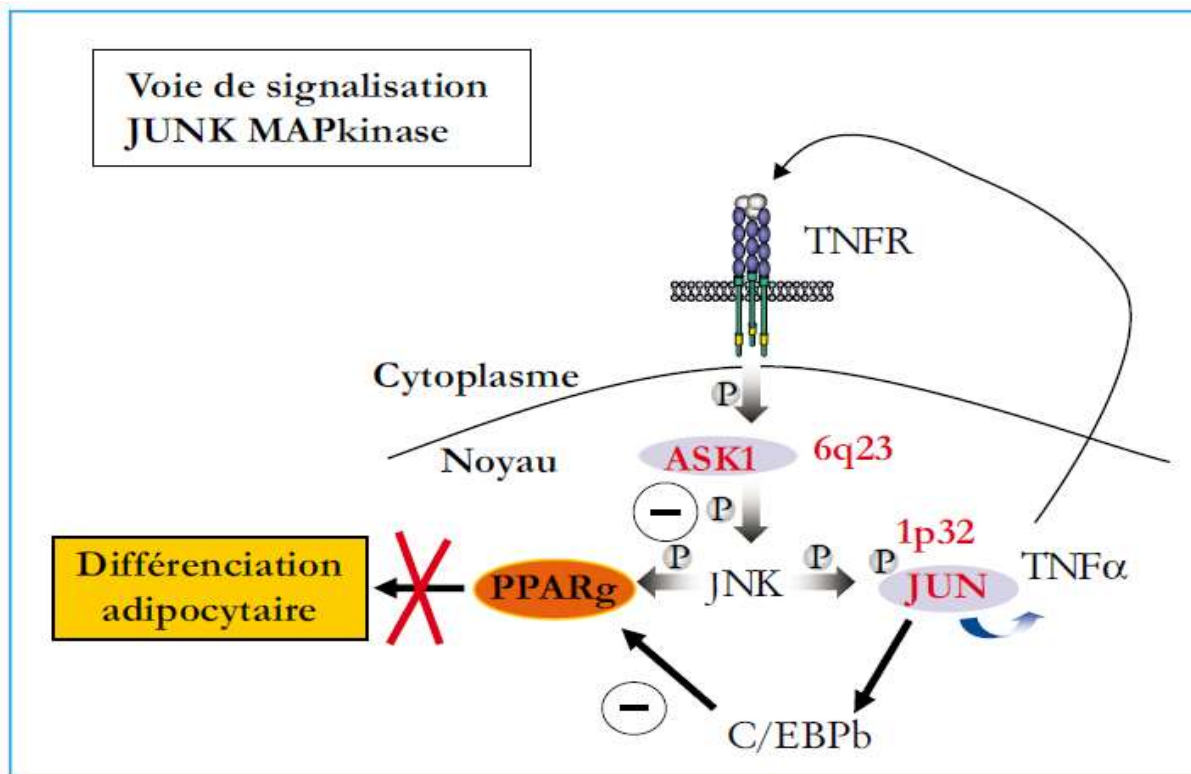


Figure 20 : Mécanisme de la dédifférenciation dans les liposarcomes dédifférenciés. L'amplification et l'hyperexpression des gènes ASK1 ou JUN appartenant à la même voie de signalisation conduisent à l'inhibition de PPAR-gamma qui représente l'élément déclenchant de la différenciation adipocytaire.

Pratiquement, pour mettre en évidence cette amplification, on utilise des sondes qui incluent un locus de contrôle sans amplification de gène et un locus cible avec amplification de gène sur le même chromosome, respectivement marqué par des colorants vert et rouge (ou l'inverse). On examine le rapport du vert (contrôle) au rouge (amplification) et on considère qu'il y a une amplification si le rapport est de 2,0 ou plus. Schématiquement, les noyaux avec amplification génique présentent peu de signaux verts et de nombreux signaux rouges (15).

<i>Tumeurs</i>	<i>Chromosomes</i>	<i>Gènes</i>	<i>Prévalence</i>	<i>Méthodes</i>
<i>Anomalies moléculaires</i>				
– Liposarcome bien différencié/	12q13-15	<i>MDM2</i>	95–100 %	FISH (<i>MDM2</i>)
dédifférencié	12q15	<i>CDK4</i>	90–95 %	qPCR
– Sarcome intimal				
– Ostéosarcome parostéal				
Angiosarcome sur tissus irradiés	8q24	<i>MYC</i>	> 50 %	FISH (<i>MYC</i>)

Figure 21 : Les principales amplifications dans les sarcomes des tissus mous.

c. La délétion de gènes :

La délétion d'un locus spécifique sur un chromosome a parfois des effets significatifs sur le diagnostic pathologique et le traitement de la maladie. Par exemple, nous avons détecté une délétion NF1 dans une tumeur maligne de la gaine nerveuse périphérique [25] et une délétion INI1 dans un sarcome épithélioïde [14]. De plus, la délétion homozygote p16 peut nous aider à diagnostiquer certains cas difficiles de mésothéliome malin [26]. Pour estimer les délétions, nous utilisons des sondes qui incluent un locus de contrôle sans délétion de gène et un locus cible avec une délétion de gène, respectivement marqué par des colorants verts et rouges. Une suppression entraîne une diminution du nombre de signaux rouges par rapport aux signaux verts. Schématiquement, les noyaux avec une suppression présentent deux signaux verts et un signal rouge. Nous calculons le pourcentage de cellules avec un signal de suppression car la troncature nucléaire influence souvent la détection des signaux de suppression. Par conséquent, la valeur seuil définitive des délétions doit être évaluée pour chaque type histologique.

d. Polyplœdie et aneuploïdie

Les signes de polyplœdie et d'aneuploïdie complètent les informations fournies par les analyses des signaux ci-dessus. En général, les STS n'ont pas tendance à présenter des anomalies supplémentaires, bien que nous ayons montré que le

rhabdomyosarcome présente de manière caractéristique une polyploïdie [14,27]. Les cellules normales présentent généralement un caryotype diploïde et montrent ainsi une paire de signaux fusionnés (jaunes) si les translocations sont analysées à l'aide de sondes à signal divisé. Cependant, les cellules tumorales présentent plus souvent une polyploïdie que la diploïdie et présentent trois paires de signaux si les cellules tumorales sont triploïdes.

e. Sarcomes avec profil génomique complexe

Cinquante à 60 % des sarcomes montrent un profil génomique complexe avec de nombreux gains et pertes géniques difficiles à catégoriser [28]. Ces tumeurs sont principalement représentées par des léiomyosarcomes, des myxofibrosarcomes, des liposarcomes pléomorphes, des rhabdomyosarcomes pléomorphes et des sarcomes peu différenciés, anciennement dénommés histiocytofibromes malins pléomorphes. Elles surviennent le plus souvent chez l'adulte après 50 ans et sont constituées, sur le plan histologique, de cellules fusiformes et surtout pléomorphes. Il s'agit, en règle, de tumeurs relativement agressives avec un potentiel métastatique de l'ordre de 50 % des cas. Sur le plan génomique, elles montrent un profil complexe avec fréquemment une altération de la voie p53 et une perte du gène RB1 et de nombreux remaniements communs aux différents types de tumeurs entrant dans cette catégorie. Une perte de PTEN est également souvent observée, en particulier dans les léiomyosarcomes. Ces tumeurs montrent souvent une activation de la voie PI3-kinase — AKT — mTOR liée à la perte de PTEN et/ou à une hyperexpression de l'IGFR. L'inactivation de PTEN dans la lignée musculaire lisse d'un modèle murin a permis la survenue de léiomyosarcomes, et cette anomalie a été considérée comme primordiale pour ce type de sarcomes. Par ailleurs, l'agressivité des léiomyosarcomes différenciés du rétropéritoine peut être liée à une amplification du gène de la myocardine dont l'hyperexpression s'accompagne

d'une initiation de la différenciation musculaire lisse et d'un accroissement de la migration cellulaire pouvant expliquer le potentiel métastatique particulièrement important pour ce type de tumeurs. Une partie au moins des sarcomes peu différenciés de type histiocytofibrome malin pourrait être liée à l'hyperexpression de DKK1 qui constitue un inhibiteur de la voie canonique de WNT. L'analyse combinée du génome par CGH-array et du profil d'expression permet ainsi d'identifier des gènes d'intérêt, selon le type de sarcomes ou leur degré d'agressivité [29].

2.3.2. Technique de le FISH :

Devant des sarcomes à cellules rondes, des sarcomes à cellules fusiformes, des néoplasies myxoïdes ou des néoplasies adipocytaires, une étude par FISH (Fluorescence in situ hybridization) a été faite. Nous avons utilisé des sondes BREAK-APART Vysis pour analyser les gènes MDM2, SS18 et EWS.

La technique consistait à la recherche d'anomalies moléculaires sur des blocs de paraffine, avec l'utilisation de lames chargées positivement (Super Frost). Ces lames ont été analysées sur un microscope à épifluorescence (Leica DM 2500), en utilisant un filtre triple bande DAPI – vert – rouge.

a. Matériel Requis :

La technique nécessite la disponibilité et le bon fonctionnement des instruments suivants:

- ✓ Agitateur magnétique (Fisher B94386)
- ✓ Bain-Marie (Fisher A90664 + A86692)
- ✓ Balance de précision (Fisher B21560)
- ✓ Microcentrifugeuse (Fisher B92100)
- ✓ Chronomètres (Fisher B57901)
- ✓ Microscope a Epi-fluorescence (Olympus AX 70)

- ✓ P 0.5–10 µl (Fisher B75031)
- ✓ P 10–100 µl (Fisher B75033)
- ✓ P 100–1000 µl (Fisher B75035)
- ✓ pH mètre (Fisher A16354)
- ✓ Thermomètre calibré (Fisher A86519)
- ✓ Agitateur Vortex (Fisher A11118)
- ✓ Platine d'hybridation THERMOBRITE (Abbott 7J9120)

b. Préparation des solutions:

☞ **20X SSC (Sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH 5.3)**

- HCl 5N (VWR 30018298)
- 20X SSC (ABBOTT 2J1032 ou flacon du kit PathVysion)

Préparation :

Diluer 66g de 20X SSC dans 200ml d'H₂O déminéralisé sur agitateur magnétique. Mesurer le pH et ajuster celui-ci à pH 5.3 avec l'HCl concentré. Ajuster le volume qsp 250mL avec H₂Od. Filtrer la solution (unité de filtration de porosité 0.45µm). Stocker à t° ambiante jusqu'à 6 mois.

Nb : On peut directement utiliser du 20XSSC prêt à l'emploi.

☞ **Tampon de lavage Post-hybridation 2XSSC /0.3% NP 40 :**

- NaOH 1N (VWR31627290)
- NP40 (ABBOTT)

Préparation :

Dans un Erlenmeyer sur agitateur magnétique, diluer 3mL de NP40 dans 100mL de 20XSSC. (Commencer à diluer dans un petit volume de 20XSSC pour faciliter la dissolution du NP40 qui est très visqueux).

Ajouter 850mL d'H₂O_d et ajuster le pH à 7–7.5 avec du 1N NaOH (ici il peut être nécessaire d'utiliser du HCl si la solution 20XSSC est acheté prêt à l'emploi). Jeter la solution après chaque jour d'utilisation. La solution stock peut être gardé jusqu'à 6 mois à t° ambiante. Ne plus utiliser si la solution présente un aspect trouble ou contaminé.

Dilution d'Ethanol :

Ethanol 70% : 700mL Ethanol, ajuster à 1L avec H₂O_d.

Ethanol 85% : 850 mL Ethanol, ajuster à 1L avec H₂O_d.

c. Technique :

Réactifs nécessaires

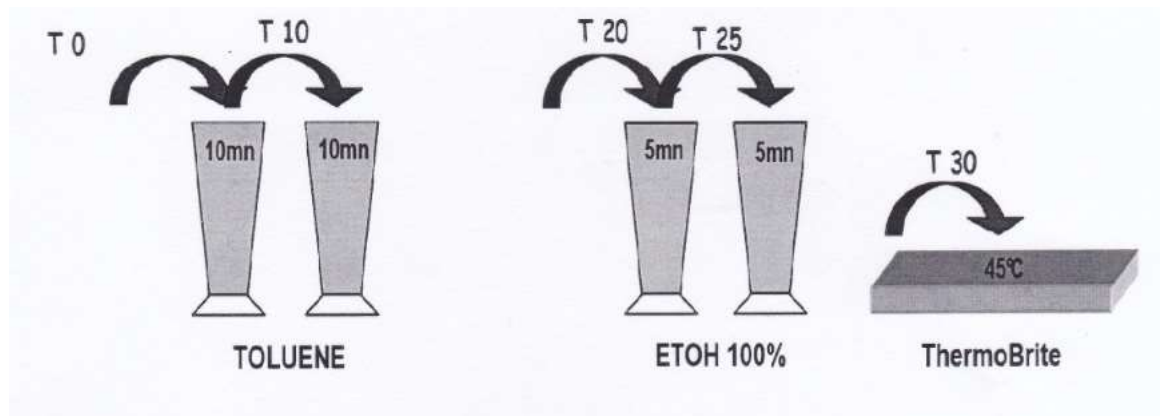
- ✓ Toluène
- ✓ Solution de 1XSSC pH 7–7.5
- ✓ Solutions préparées dans la section 2
- ✓ Pepsine diluée : Utiliser la pepsine Vysis (protéase I (2x250mg ref.2J0832)) et le tampon pepsine Vysis (2x62,5mL ref.1N9901). Mélanger 1 tube de 250 mg de pepsine dans un flacon de tampon pepsine. Laisser incuber 15mn à 37°C. Aliquoter dans des tubes type Eppendor f et congeler à –20°C (en moyenne compter qu'un aliquot peut permettre de préparer 3 à 4 lames mais tout dépend de la taille de la section de tissu).
- ✓ Dapi : Flacon contenus dans le kit PathVysion ou ref.ABBOT 6J4901

Préparation des lames pour FISH

- ✓ La veille de la technique, placer les lames (épaisseur de coupes de 4 µm) à hybrider dans un incubateur à 56°C.

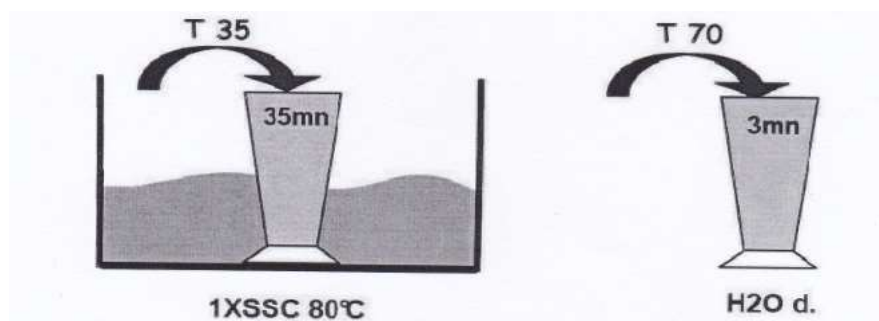
Déparaffinage :

- ✓ Immerger les lames dans du toluène 10 min (2x)
- ✓ Immerger les lames dans de l'Ethanol 5min (2x)
- ✓ Sécher les lames sur le THERMOBRITE réglé à 45°C (3 à 5 mn) ou à t° ambiante.



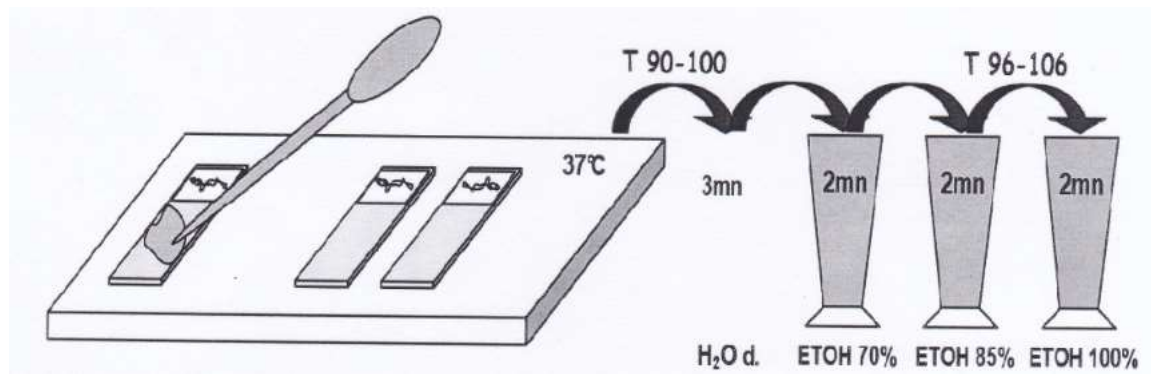
Prétraitement :

- ✓ Immerger les lames dans la solution de 1XSSC à 80°C pendant 35 mn.
- ✓ Immerger les lames dans du H2Od pendant 3mn.



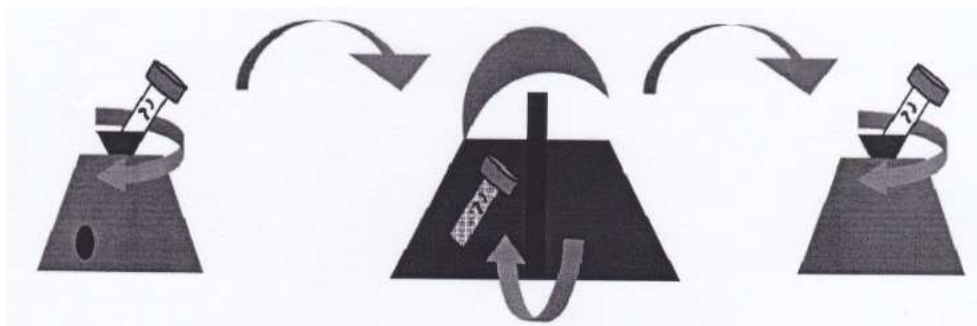
Traitement à la pepsine :

- ✓ Placer les lames sur le Thermobrite à 37°C et recouvrir la section avec la pepsine diluée.
- ✓ Laisser incuber 18mn.
- ✓ Immerger les lames dans du H2Od pendant 3 mn.
- ✓ Déshydrater les lames dans un gradient d'Ethanol 70, 85, 100 2mn chaque.
- ✓ Laisser sécher les lames avant de procéder à l'étape d'hybridation.



Hybridation des échantillons :

- ✓ Sortir la sonde du congélateur et lui laisser atteindre la t° ambiante.
- ✓ Centrifuger la sonde, la vortexer et la centrifuger à nouveau.



- ✓ Déposer entre 5 et 10µl de sonde sur une lamelle.
- ✓ Prendre la lame échantillon et la retourner sur la lamelle.
- ✓ Retourner immédiatement la lame et sceller la lamelle à l'aide de rubber cement.



- ✓ Placer la lame dans le thermobrite et laisser incuber à 37°C pendant environ 5mn avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation.

Lavage post-hybridation :

A partir de cette étape, il faut travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames.

- ✓ A la fin de l'hybridation, sortir les lames du thermobrite.
- ✓ Retirer le ruber cement sans retirer la lamelle et placer la lame dans la solution de lavage 2XSSC/0,3%NP40 à t°ambiante. Compter 30s à 1 mn le temps de traiter la totalité des lames. (pour plus de facilité on peut placer deux lames dos à dos).
- ✓ Retirer ensuite délicatement les lamelles et transférer les lames dans la solution 2XSSC/0,3% NP40 à 73°C. Agiter rapidement et lancer le chronomètre réglé à 2mn.
- ✓ Retirer les lames de la solution à 37°C et effectuer un rinçage rapide dans la solution à t° ambiante.
- ✓ Mettre les lames à sécher à l'obscurité et sortir le DAPI du congélateur.

Contre-coloration des noyaux au DAPI :

- ✓ Déposer 10 à 20µl de DAPI (dépend de la taille de la lamelle) sur une lamelle couvre-objet.
- ✓ Retourner la lame échantillon sur la lamelle (même technique que pour la sonde d'hybridation).
- ✓ Placer les lames à 4°C pendant au moins 5 mn avant de procéder à la lecture sous microscope.

III. Prise en charge multidisciplinaire des patients :

Devant toute suspicion de sarcome des tissus mous des extrémités, le dossier du patient est discuté lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire avant tout geste. Cette réunion est bimensuelle, et regroupe un traumatologue, un radiologue, un anatomopathologiste, un oncologue et un radiothérapeute. Les décisions et la prise en charge globale sont basées sur des recommandations internationales déjà disponibles (NCCN, ESMO), avec une confrontation de ces recommandations aux pratiques locales.

Les recommandations respectées lors de la prise en charge de nos patients sont comme suivant :

- a. La prise en charge doit être réalisée au sein du centre hospitalier universitaire Hassan II.
- b. Un bilan radiologique, idéalement par une IRM, pour permettre une orientation diagnostique et guider la biopsie.
- c. Une biopsie pré-opératoire radio-guidée ou chirurgicale en fonction de la localisation de la tumeur, sa taille et son hétérogénéité. Elle est indiquée devant :
 - Toute masse profonde sous-aponévrotique,
 - Toute masse superficielle plus de 5 cm,
 - Toute masse évolutive,
 - Hématome sans notion récente de traumatisme.
- d. L'étude anatomopathologique par un pathologiste expérimenté,
- e. le traitement chirurgical est planifié au préalable, et doit viser une résection R0.
- f. La radiothérapie est indiquée au cas par cas, pour des sarcomes des tissus

mous non métastatiques, en adjuvant.

- g. la chimiothérapie néoadjuvante est indiquée essentiellement dans des sarcomes rapidement évolutifs pour permettre une meilleure résécabilité.

IV. Analyse statistique :

L'ensemble des données recueillies a été saisi et analysé au moyen du logiciel « SPSS ». Les variables qualitatives ont été décrites par les moyennes et les médianes, alors que les variables quantitatives ont été décrites par les effectifs et les pourcentages.

La comparaison de la distribution des paramètres qualitatifs selon certains critères a été réalisée à l'aide d'un test de Khi-Deux, $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

La survie a été décrite par la méthode de Kaplan-Meier. Les événements considérés étaient la survenue du premier événement (progression locorégionale, progression métastatique et décès, toutes causes confondues). La date originale de l'étude était la date du diagnostic.

RESULTATS

1. Cadre de l'étude :

On a subdivisé nos patients en deux groupes. Un groupe « RCP » (75 cas) dont les dossiers ont été recrutés de novo au CHU, et ont été discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire avant tout geste. Le deuxième groupe « Hors RCP » (41 cas) comporte les dossiers recrutés du secteur privé, ou référés après avoir réalisés des bilans radiologiques, des biopsies ou opérés.

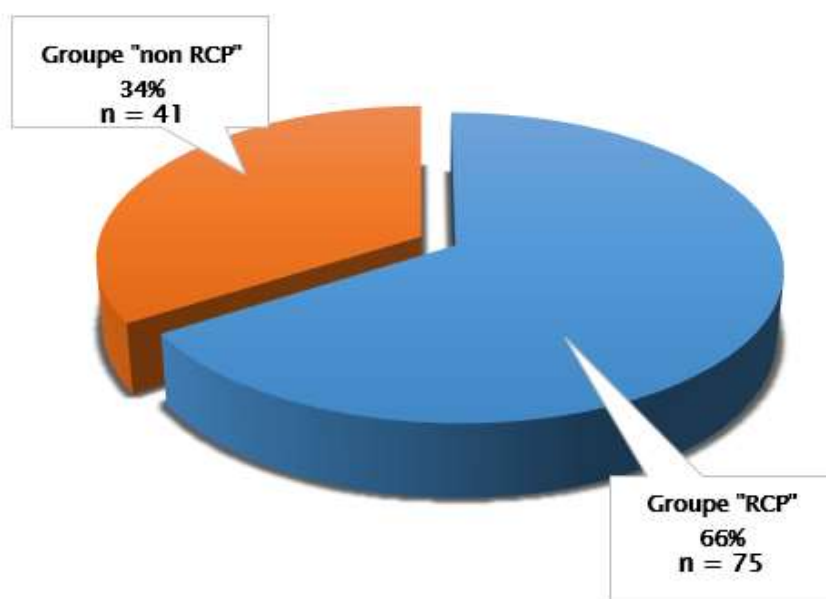


Figure 22 : répartition des patients en fonction du groupe « RCP » ou « NON RCP ».

2. Données démographiques :

2.1. Le sexe :

Dans les 116 cas de sarcomes retenus, On a constaté une prédominance masculine avec 71 (61%) hommes et 45 (39%) femmes. Le sexe ratio H/F était de 1,58.

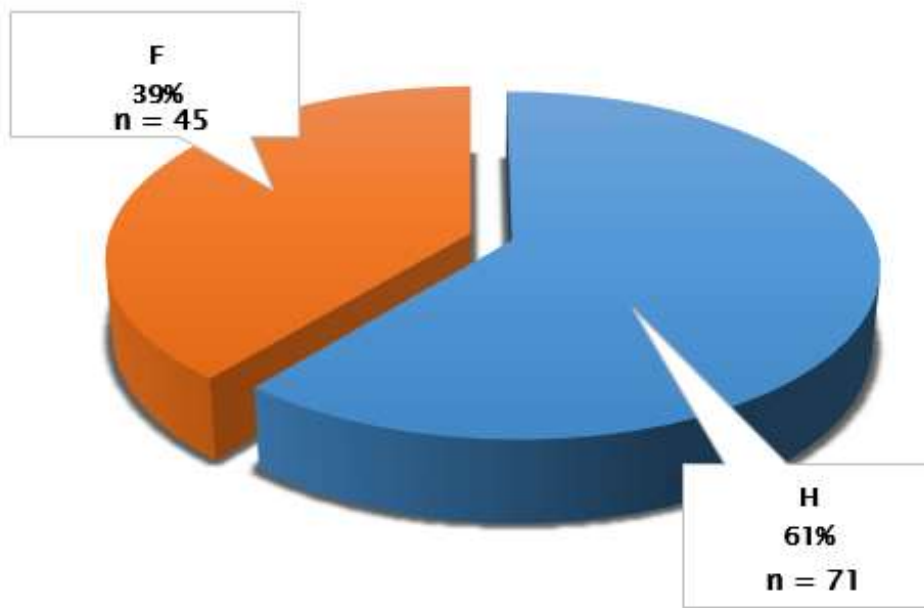


Figure 23 : répartition des patients en fonction du sexe.

2.2. L'âge :

On a enregistré 116 cas avec un âge moyen de 53,57 ans (18 – 115 ans), et un âge médian de 54,5. La tranche d'âge la plus touchée est celle entre 41 et 60 ans (figure

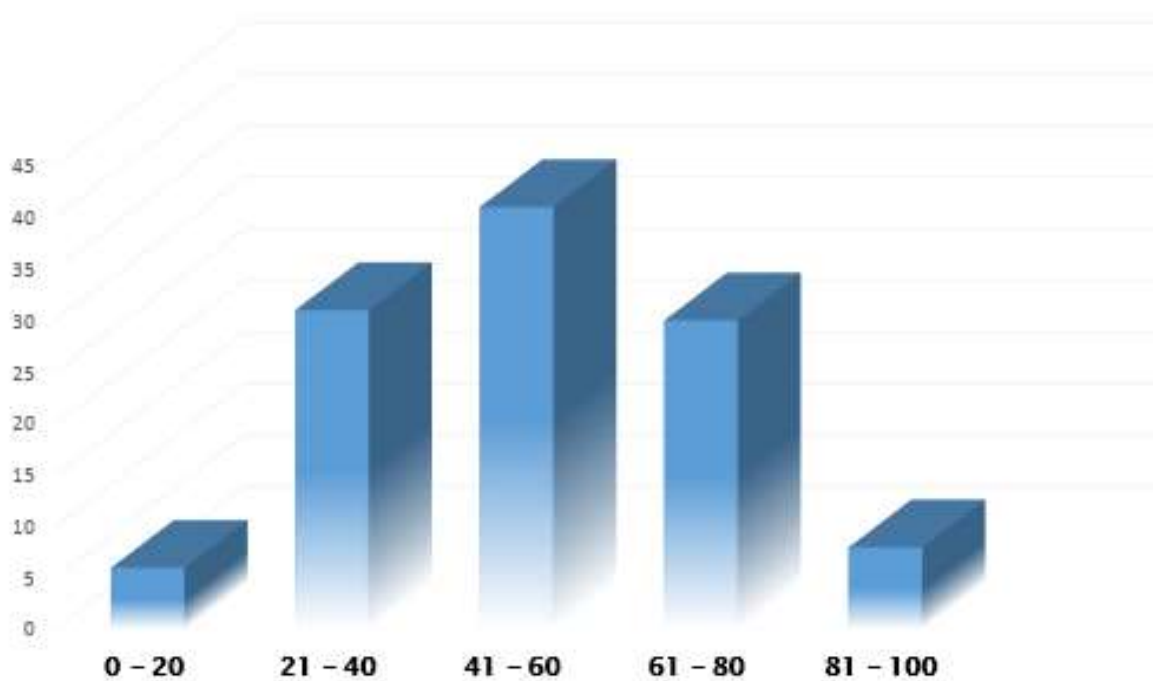


Figure 24 : répartition des patients en fonction des groupes d'âge.

3. Données cliniques :

3.1. Siège de la tumeur :

Parmi les 116 patients, 78,4% avaient une tumeur au niveau du membre inférieur et 21,6% avaient une tumeur au niveau du membre supérieur.

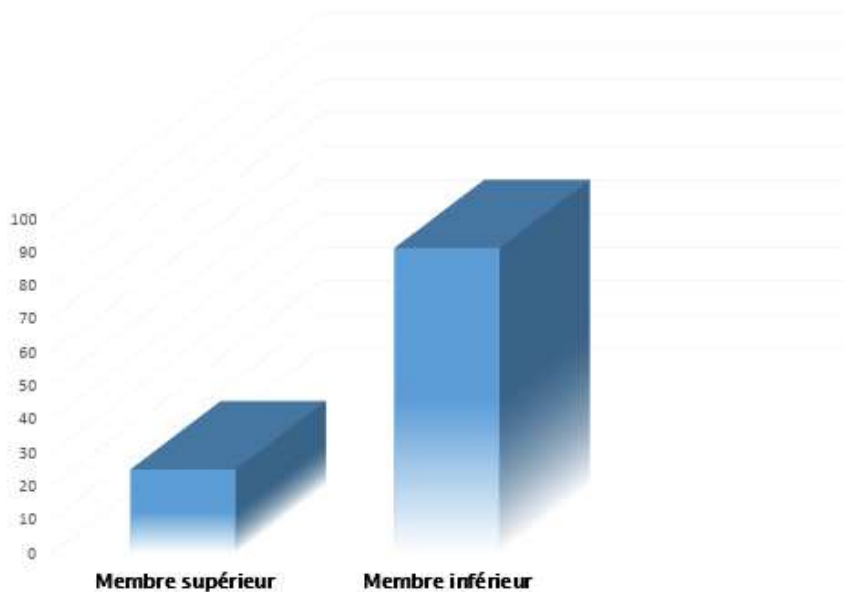


Figure 25 : répartition des patients en fonction du membre atteint.

3.2. Localisation de la tumeur :

111 patients (95,7%) avaient une tumeur profonde, et seulement 5 patients avaient une tumeur de localisation superficielle.

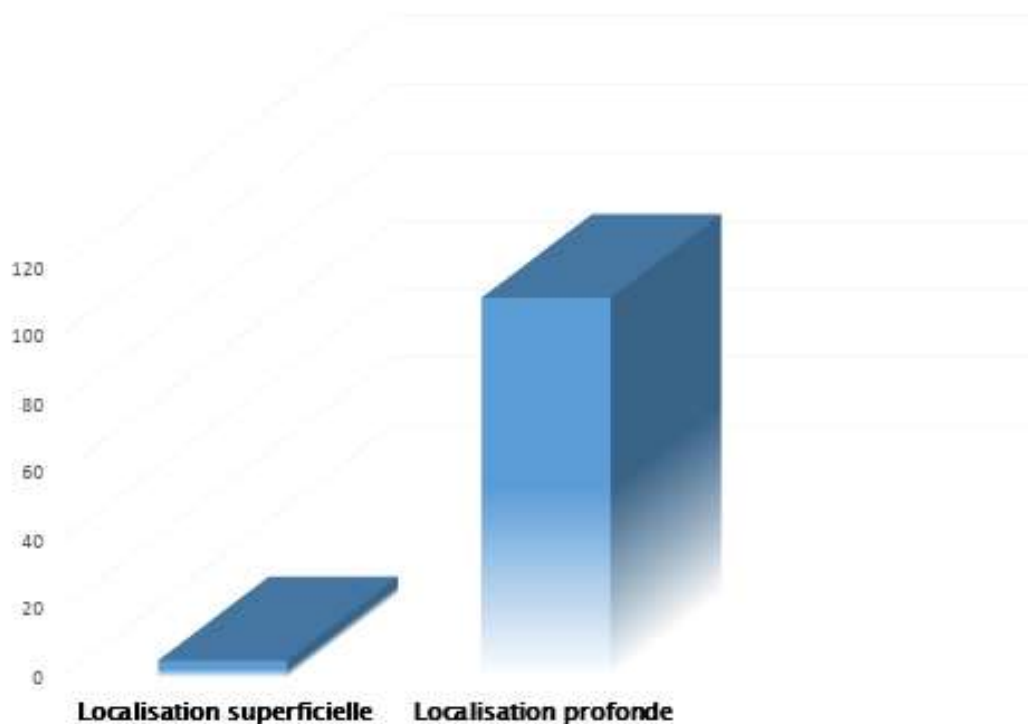


Figure 26 : répartition des patients en fonction de la localisation.

3.3. Taille de la tumeur :

La taille moyenne de la tumeur était de 12,28 cm. La médiane était de 10 cm, avec des extrêmes de 4 cm à 32 cm.

3.4. Réalisation d'une biopsie préalable :

Une biopsie préalable a été réalisée chez la majorité des cas (soit 79,3% des cas).
24 patients (dont 16 sont sur groupe « non RCP ») n'ont pas bénéficié d'une biopsie.

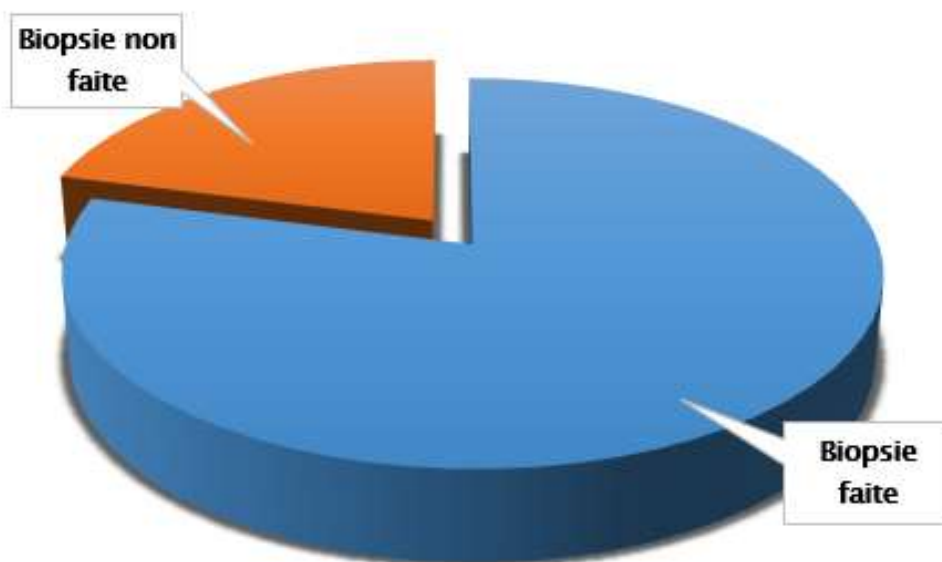


Figure 27: répartition des patients en fonction de la réalisation de la biopsie pré-opératoire.

4. Données anatomopathologiques :

4.1. Type histologique :

Le type histologique prédominant était le liposarcome (31% des cas), dont le liposarcome myxoïde était le plus fréquent. Le synoviosarcome représentait 15%, le léiomyosarcome et le sarcome d'Ewing 9%, le sarcome à cellules pléomorphe inclassé (UPS) 8%, le myxofibrosarcome et le rhabdomyosarcome 3%.

Une étude immunohistochimique a été réalisée chez 76 cas (soit 65,5%).

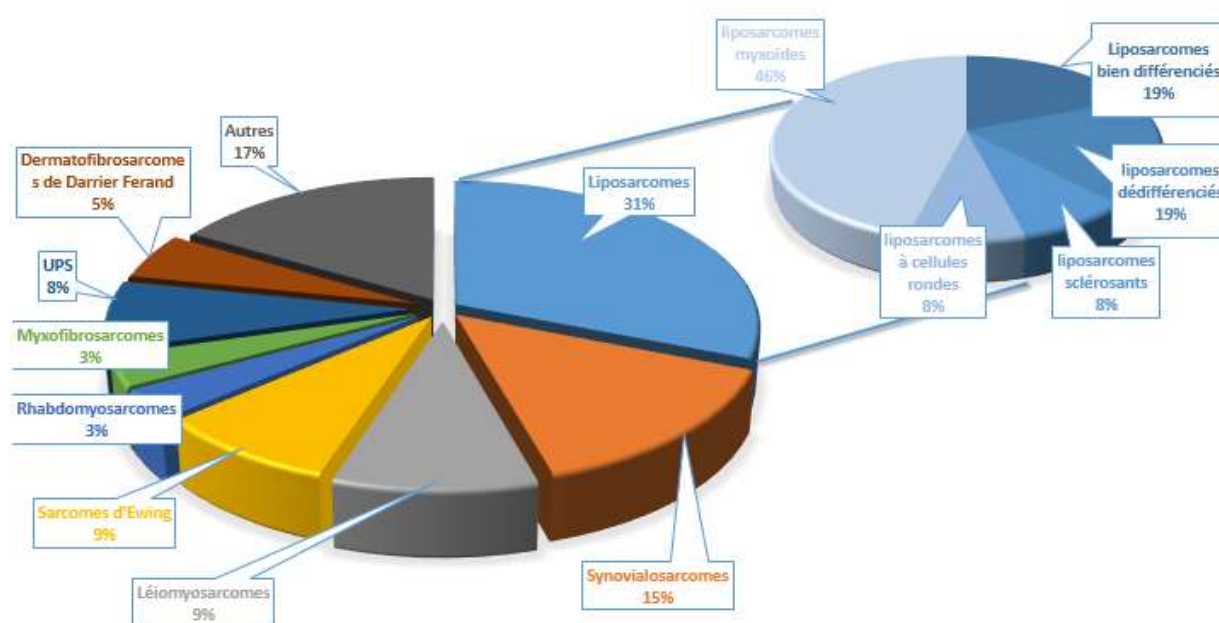


Figure 28 : répartition des patients en fonction du type histologique

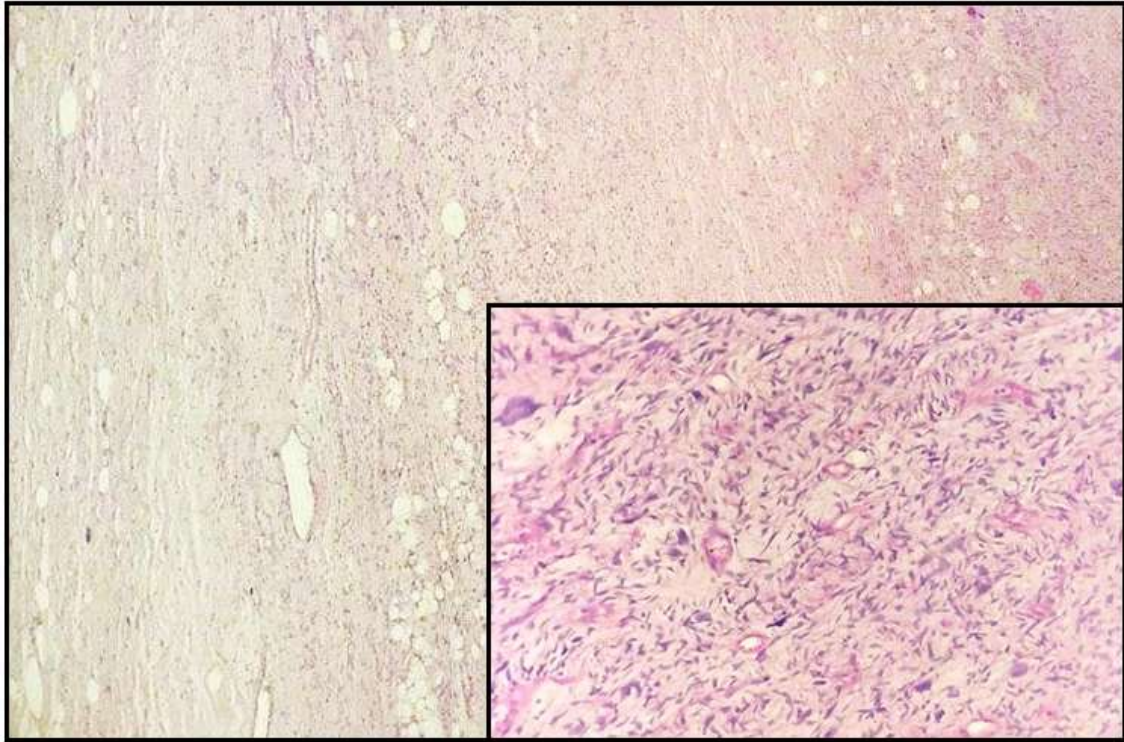


Figure 29 : Image histologique d'un liposarcome dédifférencié.

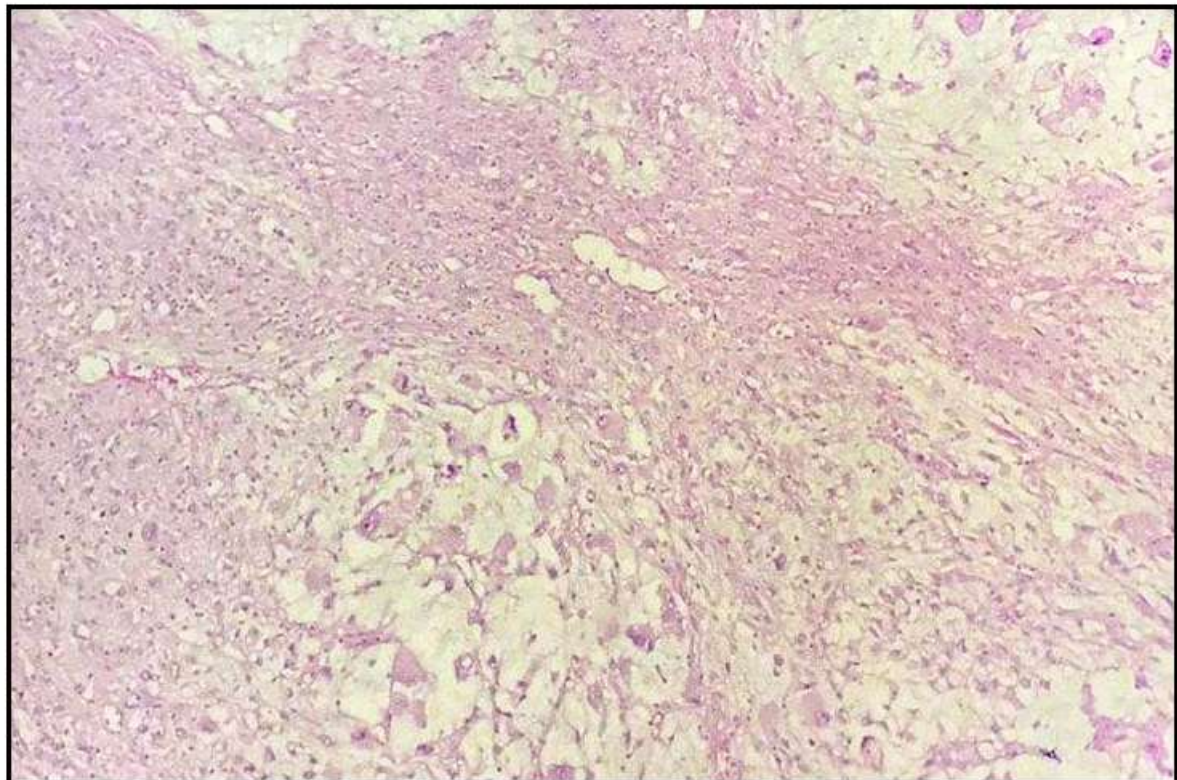


Figure 30 : Image histologique d'un myxofibrosarcome .

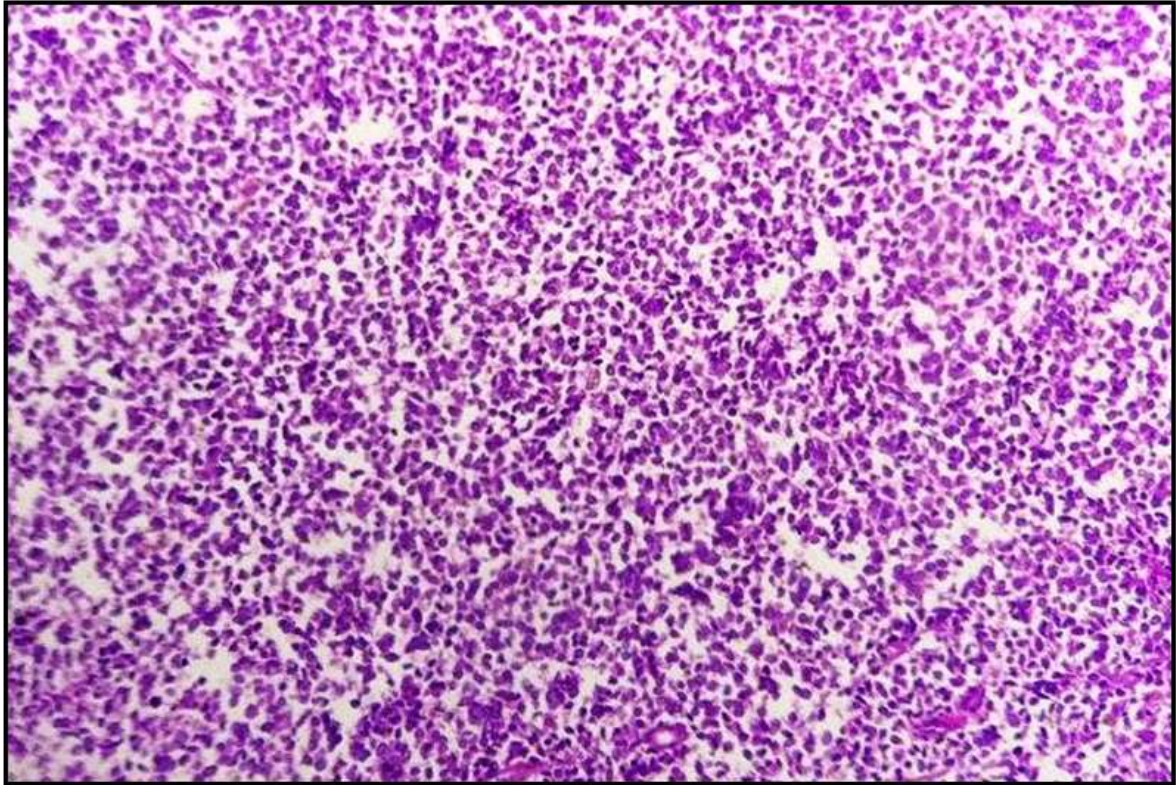


Figure 31: Image histologique d'un sarcome d'Ewing

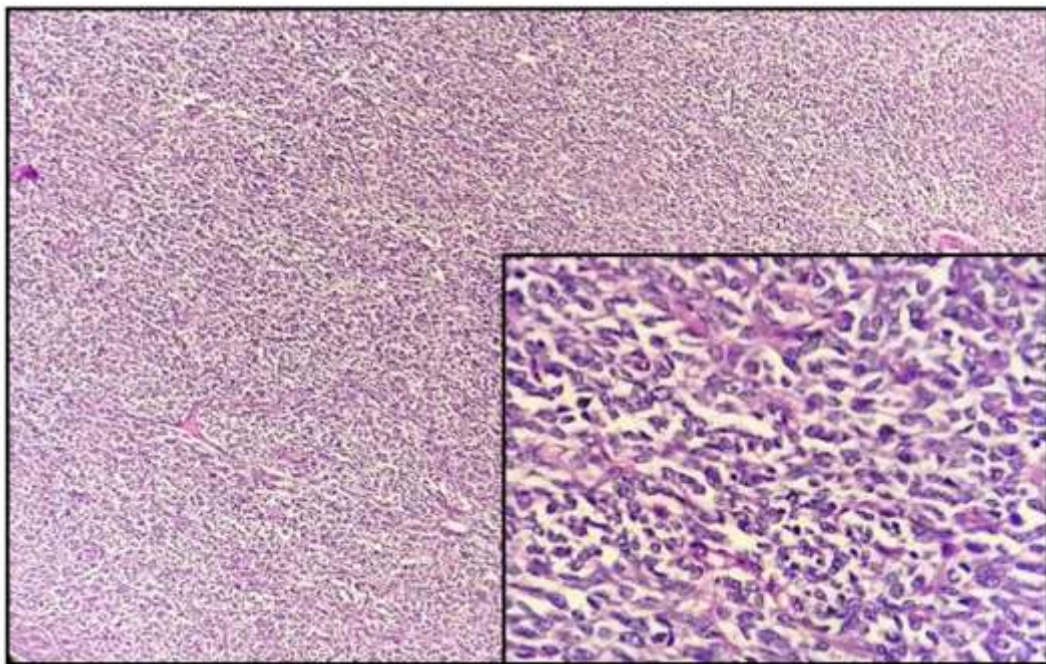


Figure 32: Image histologique d'un synoviosarcome biphasique.

4.2. Grade histologique :

Plus de la moitié des sarcomes ont été gradé « grade II » (soit 58%), 34 cas ont été gradé « grade III » (soit 29,4%) et 15 cas ont été gradé « grade I » (soit 12,9%).

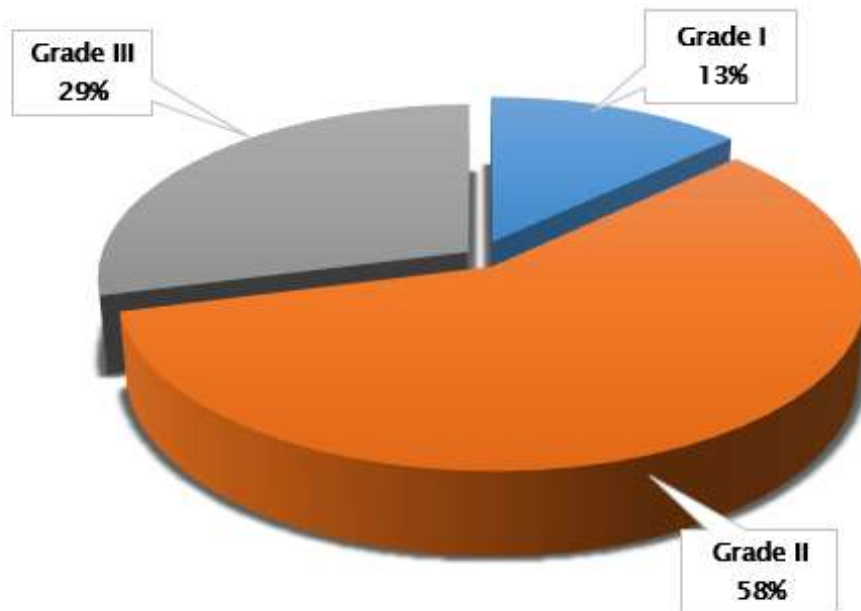


Figure 33 : répartition des patients en fonction du grade histologique.

4.3. Les marges de résection :

Parmi les 63 patients opérés, la résection « in sano » était obtenue chez 37 patients (soit 58,7%). 24 patients avaient une résection R1 (soit 38%), et seulement deux patients avaient une résection R2 (soit 3,3%).

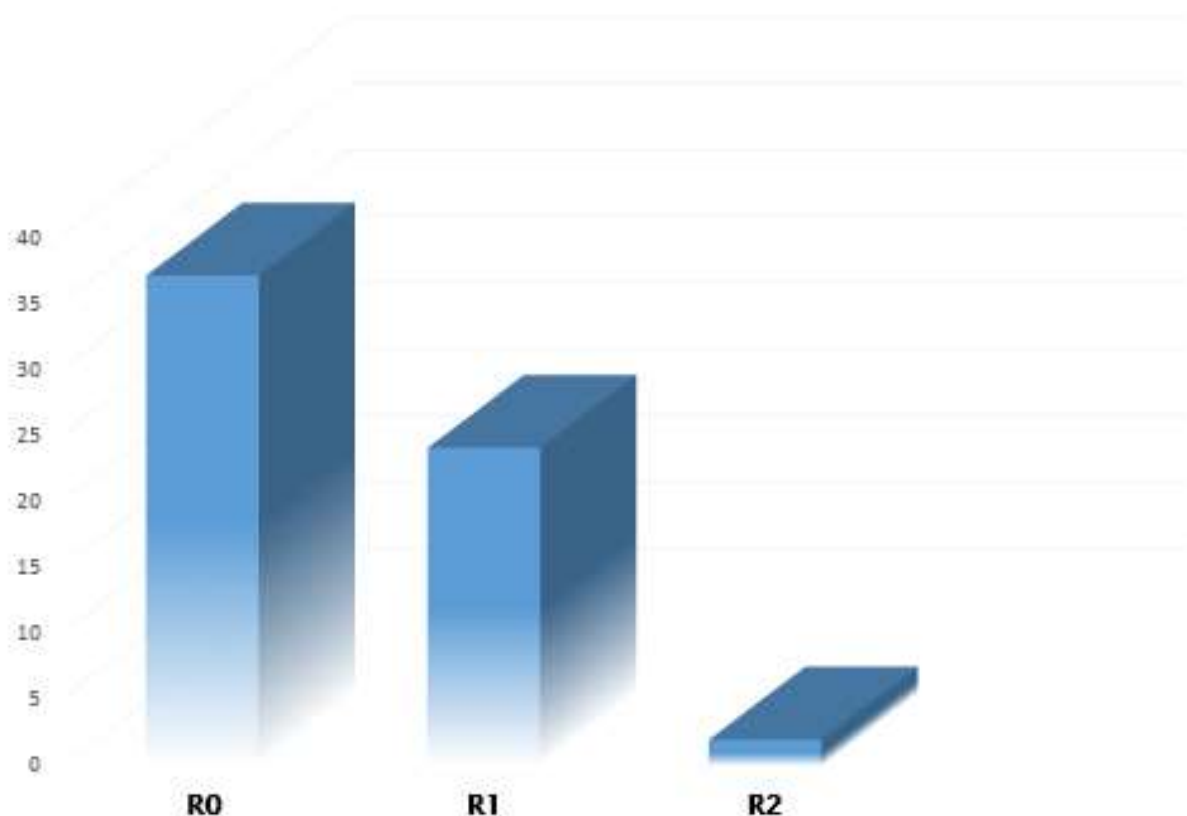


Figure 34 : répartition des patients en fonction de la qualité d'exérèse chirurgicale.

4.4. Etude moléculaire :

4.4.1. L'étude par FISH :

56 patients (soit 48 %) des patients avaient des indications pour réaliser une étude FISH c'est-à-dire un sarcome à génomique simple.

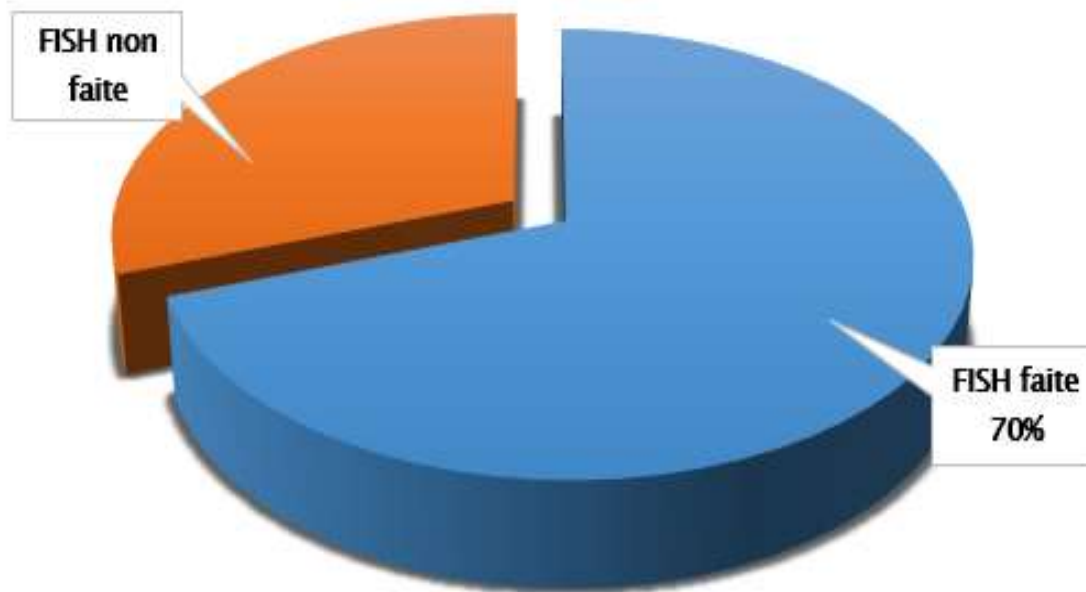


Figure 35 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une étude par FISH.

4.4.2. l'orientation histologique :

La recherche de l'anomalie moléculaire en question s'est basée sur une orientation selon l'aspect morphologique de la tumeur.

Dans notre série, et parmi les 56 patients ayant bénéficié d'une étude par FISH, l'architecture fusiforme était la prédominante (19 cas), suivie par l'architecture ronde (12 cas), l'architecture adipeuse (11 cas), l'architecture pléomorphe (9 cas) et l'architecture myxoïde (5 cas).

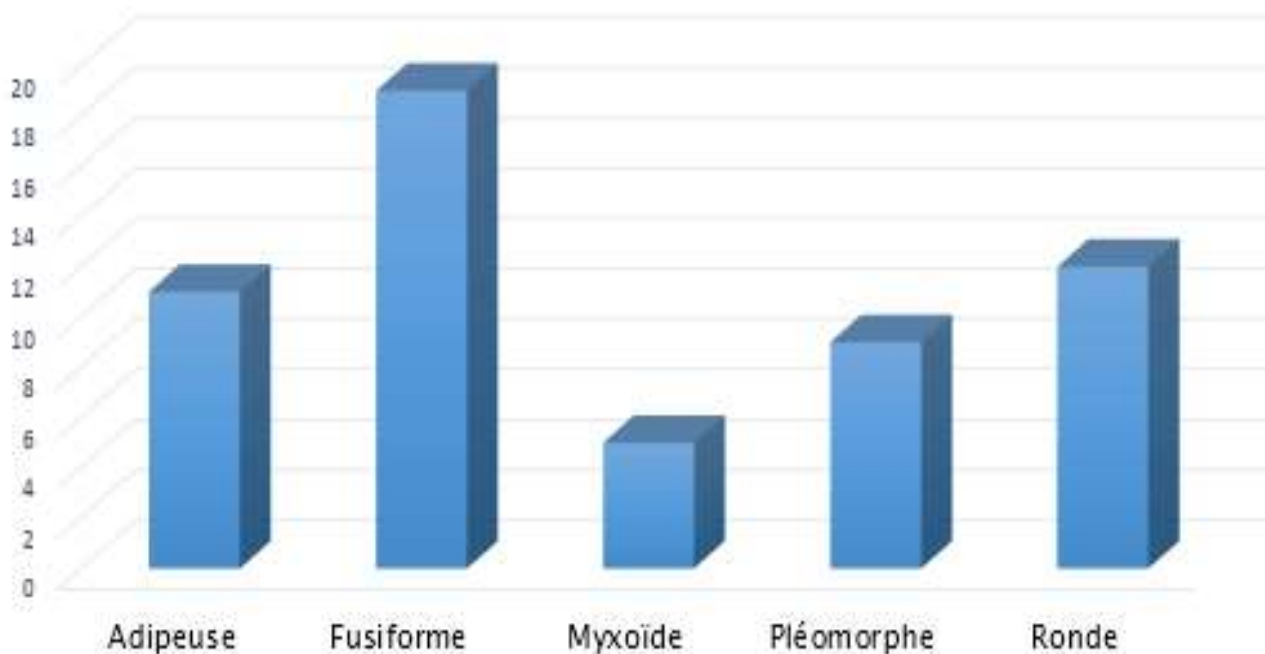


Figure 36 : répartition des patients en fonction de l'aspect morphologique.

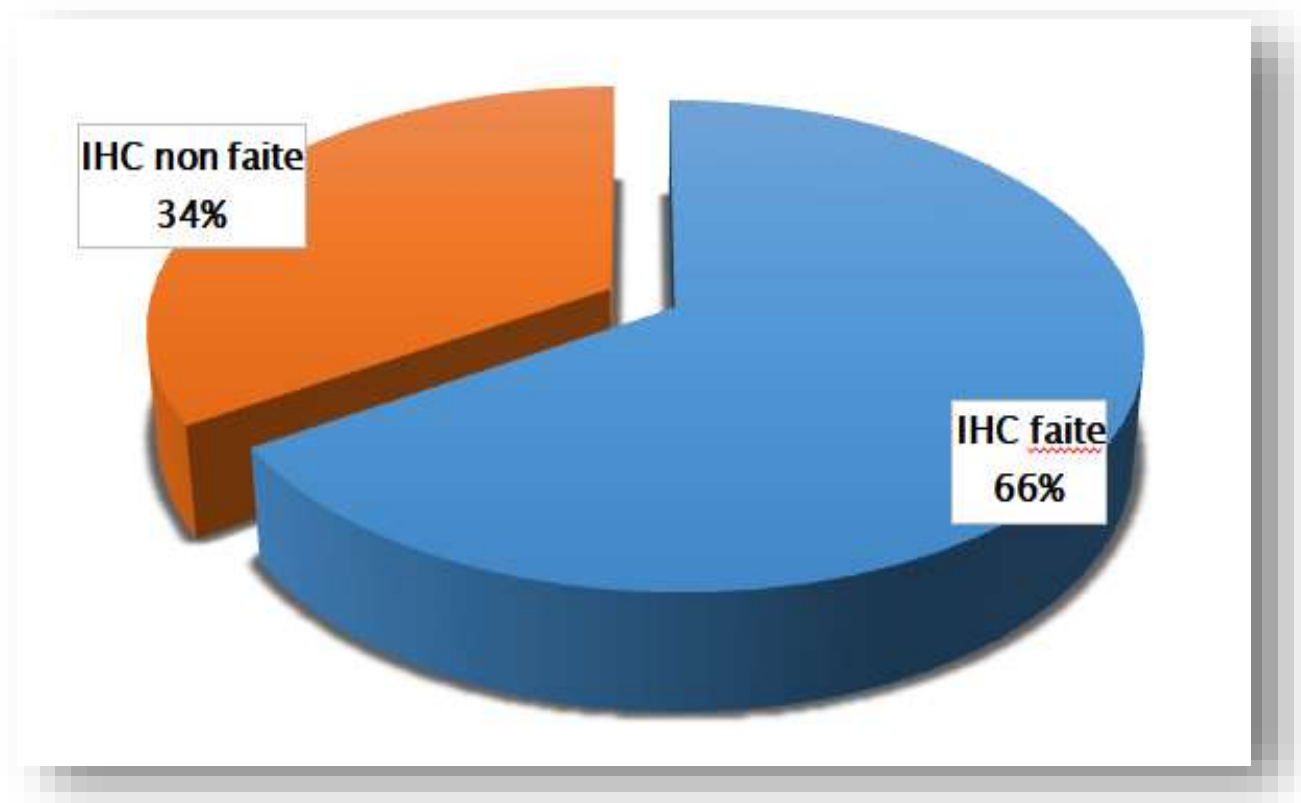


Figure 37 : répartition des cas en fonction de l'indication et la réalisation d'une étude immunohistochimique.

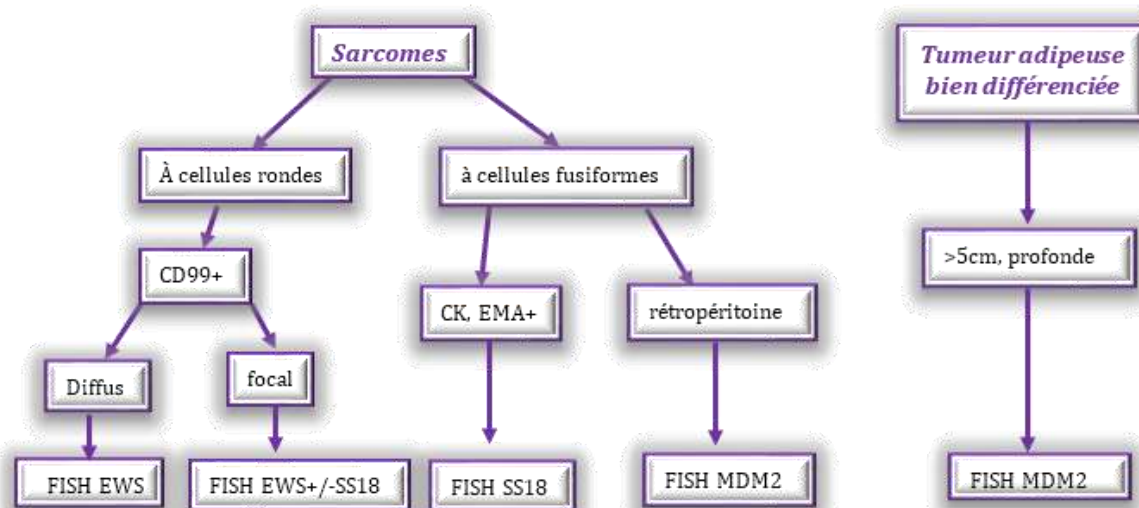


Figure 38 : algorithme appliqué dans notre étude en fonction de l'aspect morphologique.

4.4.3. Types de sondes utilisées :

Nous avons utilisé la sonde MDM2 dans 42% des cas (architecture adipeuse ou pléomorphe). La sonde SS18 était utilisée dans 29% des cas (architecture fusiforme). La sonde EWS était utilisée dans 18% des cas (architecture à cellules rondes). Nous avons utilisé l'ensemble MDM2-SS18 et EWS-SS18 dans 4% et 3% respectivement.

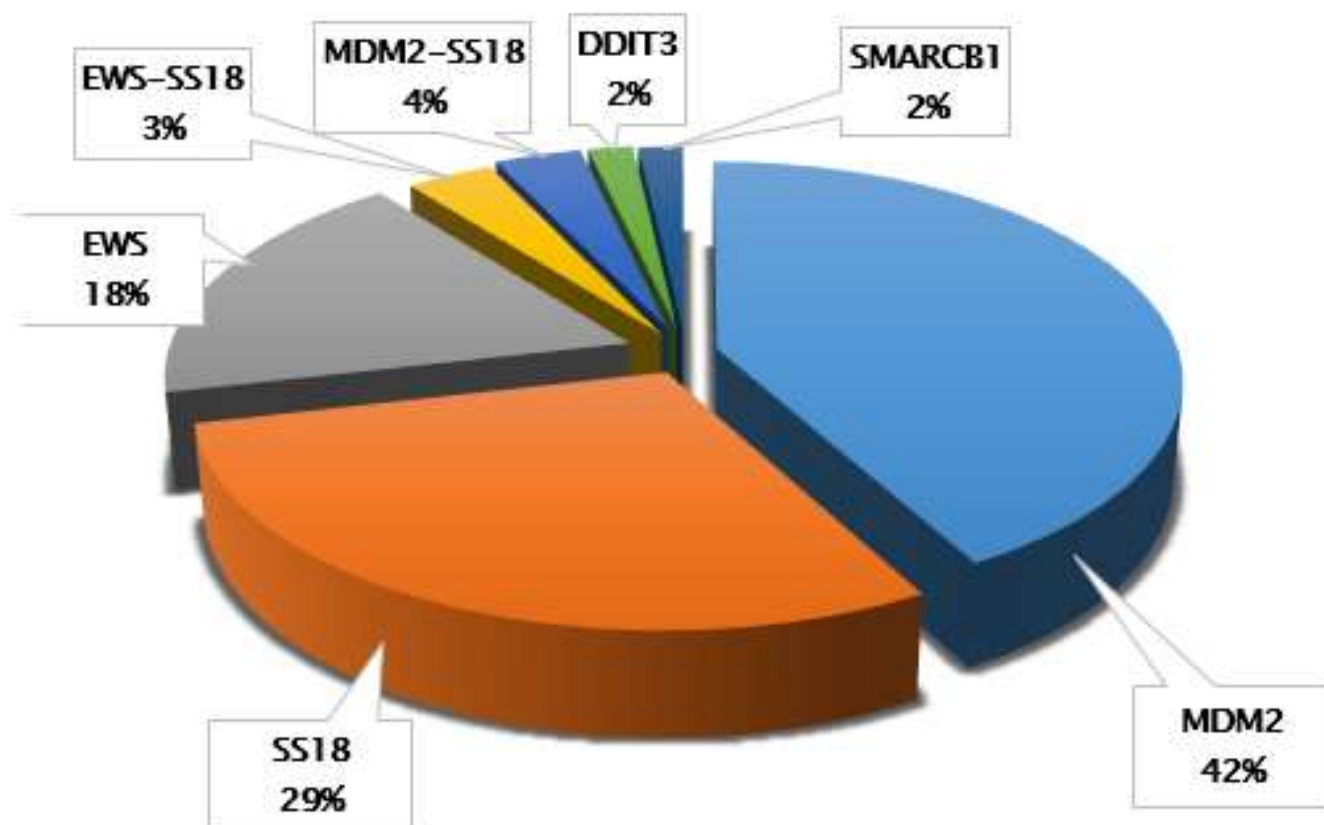


Figure 39: répartition des patients en fonction des sondes utilisées.

4.4.4. Résultats :

Pour les sarcomes d'architecture fusiforme, l'étude immunohistochimique, couplée aux données morphologiques, a permis de distinguer certain nombre d'entités, notamment des léiomyosarcomes, des dermatofibrosarcomes de Darrier Ferand et des rhabdomyosarcomes à cellules fusiformes. La FISH était indispensable pour les cas suspects de synoviosarcomes. Elle a permis de confirmer ce diagnostic chez 13 patients par la présence du réarrangement du gène SS18. L'absence de réarrangement de ce dernier et l'absence d'amplification du gène MDM2 ont confirmé le diagnostic de sarcome à cellules fusiformes inclassé chez 5 patients.

Pour les sarcomes à cellules rondes, la FISH était également indispensable au diagnostic, en permettant par la présence du réarrangement du gène EWS, de retenir le diagnostic d'un sarcome d'Ewing chez 8 patients ayant des sarcomes à cellules rondes CD99+, et le diagnostic d'un chondrosarcome myxoïde extra-squelettique chez un patient. L'absence du réarrangement de ce gène a posé le diagnostic d'un sarcome à cellules rondes inclassé.

Concernant la recherche de l'amplification du gène MDM2, son utilité sur des sarcomes d'architecture pléomorphe et/ou adipeuse, a montré une importance cruciale en matière de diagnostic différentiel entre un liposarcome dédifférencié et un sarcome à cellules pléomorphes inclassé (UPS), et d'autre part, entre un liposarcome bien différencié lipoma-Like et un lipome. Dans notre série, la présence d'amplification de ce gène a permis de confirmer le diagnostic d'un liposarcome dédifférencié chez 7 patients, un liposarcome bien différencié chez 3 patients et un liposarcome sclérosant chez un patient. En revanche, l'absence d'amplification de ce gène, a confirmé le diagnostic d'un sarcome à cellules pléomorphe inclassé (UPS) chez 8 patients et le diagnostic d'un rhabdomyosarcome à cellules pléomorphes chez un seul patient.

La FISH en matière de néoplasie myxoïde dans notre série était utile, en confirmant le diagnostic d'un liposarcome myxoïde chez 4 patients par l'absence d'amplification du gène MDM2, et le diagnostic d'un sarcome fibro-myxoïde de bas grade chez un patient par l'absence de réarrangement du gène SS18.

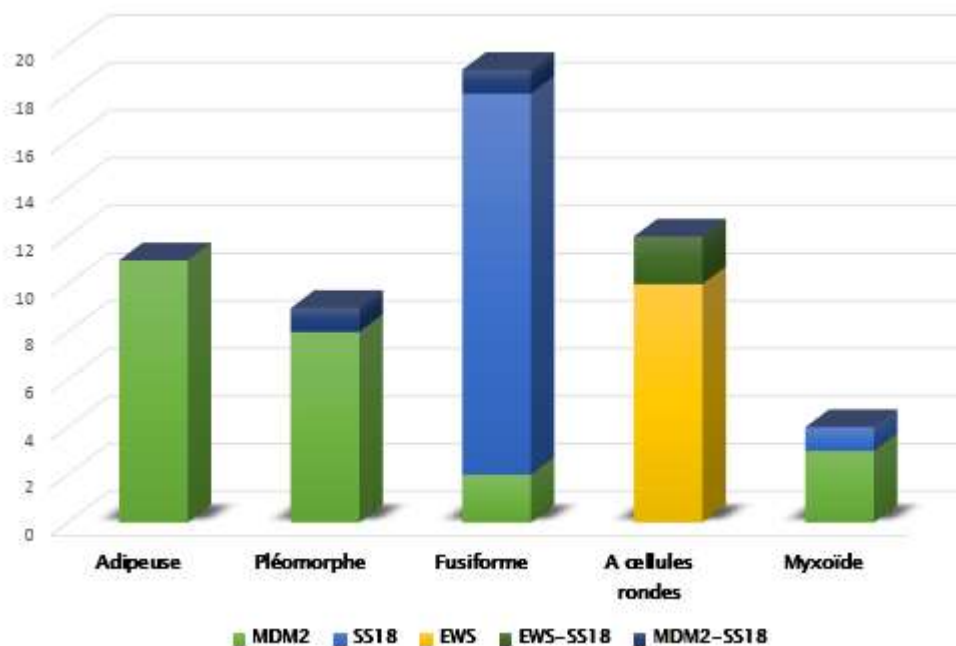


Figure 40 : répartition des sondes utilisées en fonction de l'aspect morphologique.

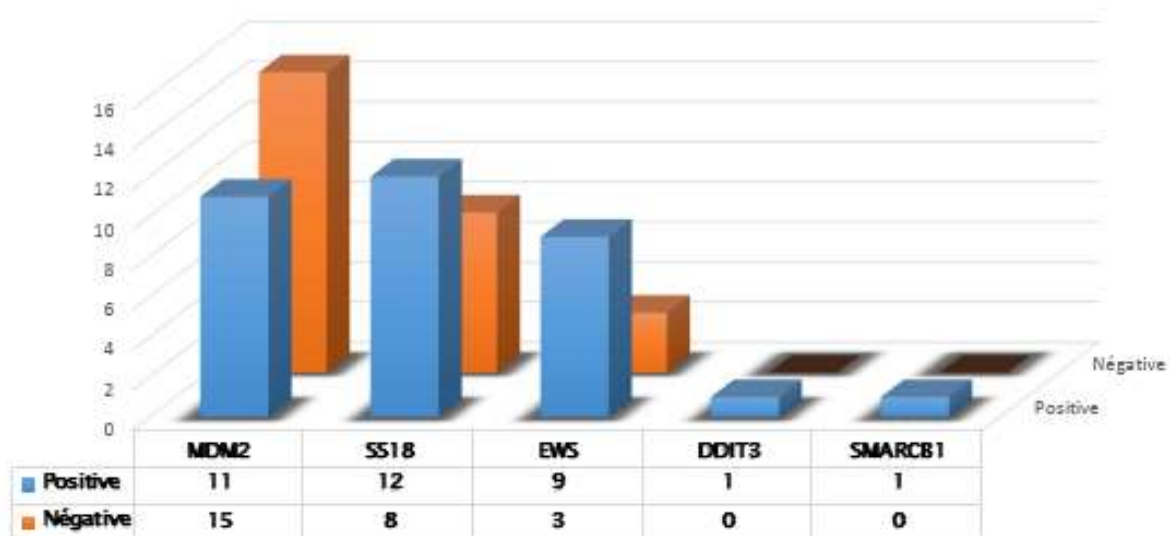


Figure 41 : répartition des patients en fonction des résultats de l'étude FISH.

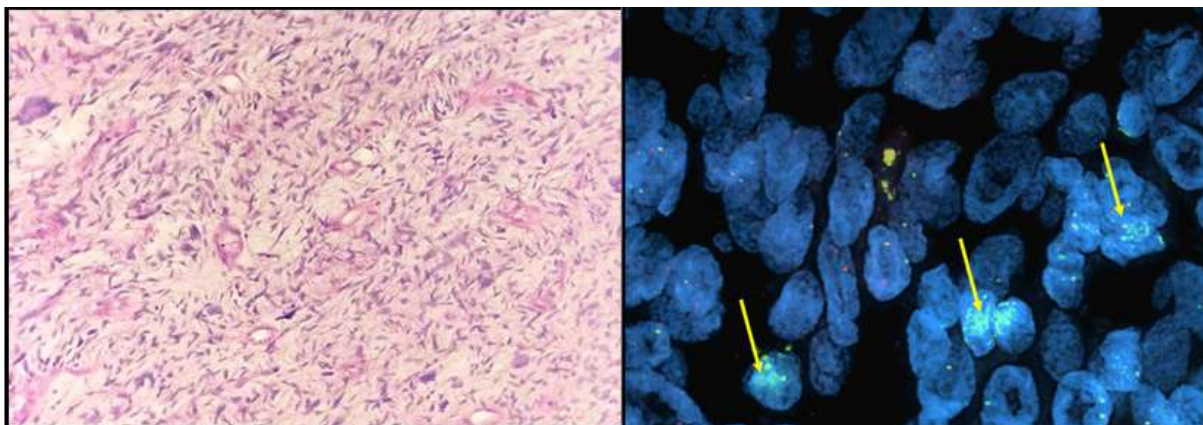


Figure 41 : Image histologique d'un liposarcome dédifférenciée (HESx400) (a), avec une amplification du gène MDM2 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un liposarcome.

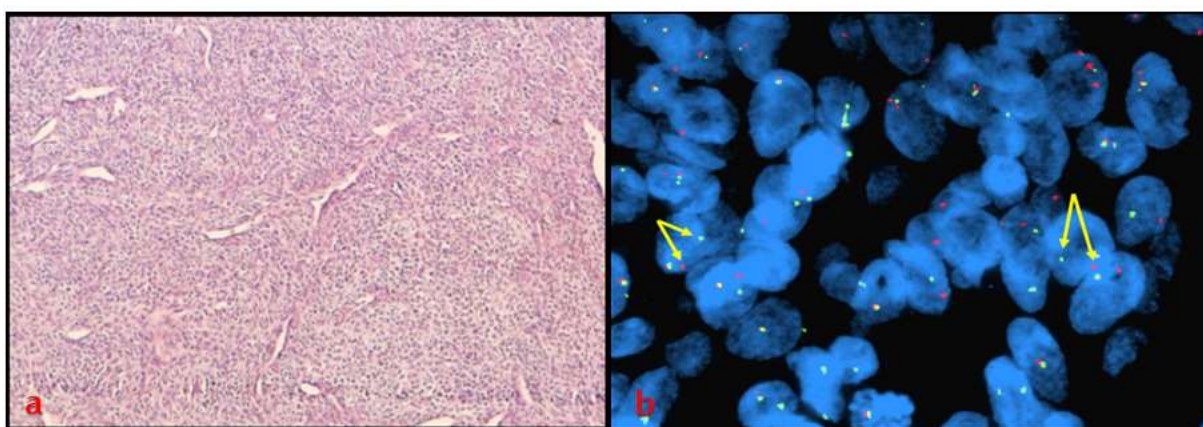


Figure 42 : Image histologique d'un sarcome à cellules fusiformes (HESx200) (a), avec un réarrangement du gène SS18 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un synoviosarcome.

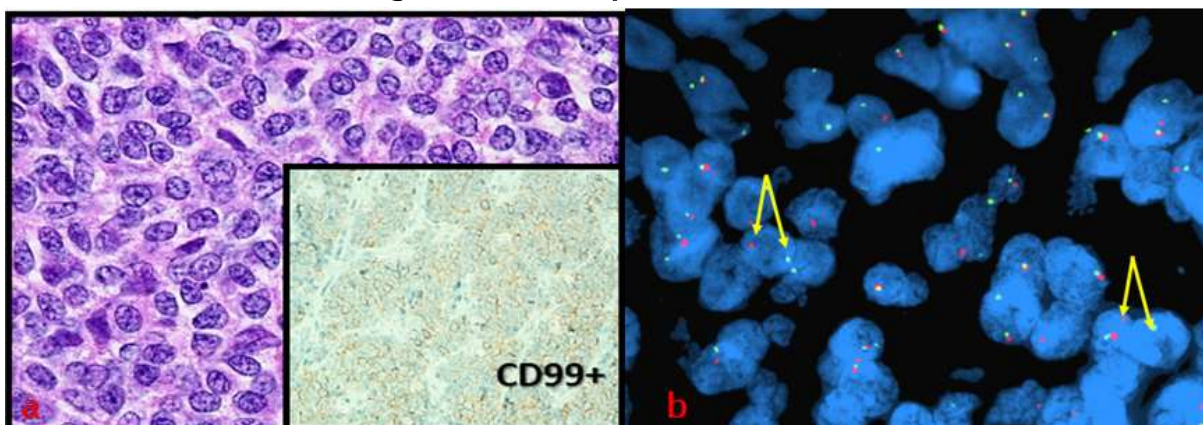


Figure 43 : Image histologique d'un sarcome à cellules rondes (HESx400) exprimant le CD99 sur le plan immunohistochimique (a), avec un réarrangement du gène EWSR1 (flèche) sur le plan cytogénétique (b), confirmant le diagnostic d'un sarcome d'Ewing.

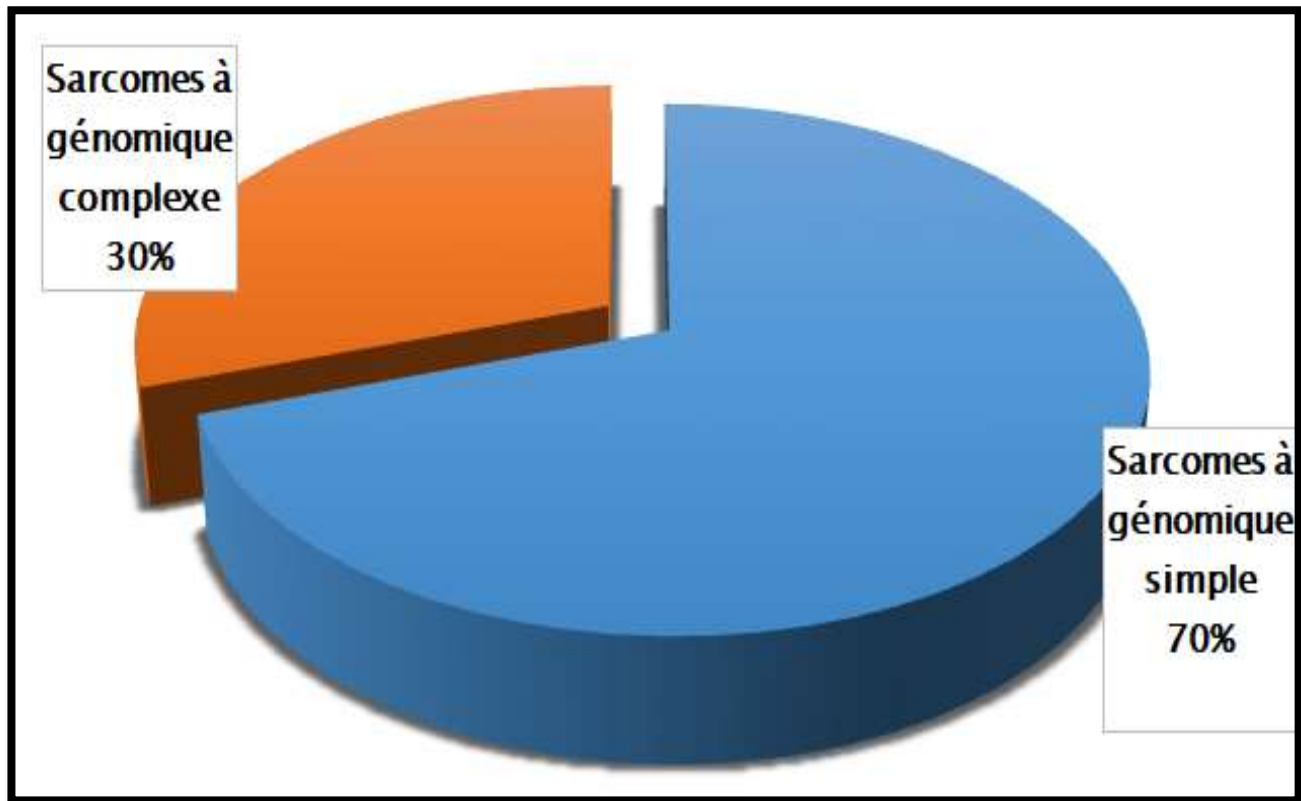


Figure 44: répartition des cas en fonction du groupe génomique.

5. Données thérapeutiques :

5.1. Traitement chirurgical :

63 patients ont été opérés. 49 parmi eux ont bénéficié d'un traitement conservateur (soit 77,8%) et 14 ont bénéficié d'une amputation soit 22,2%). Une reprise chirurgicale devant des marges chirurgicales insuffisantes a été effectuée chez 8 patients (soit 12,7% parmi les patients opérés).

5.2. Radiothérapie :

Vingt-deux patients ont bénéficié d'une radiothérapie externe en adjuvant, exclusive chez 9 cas.

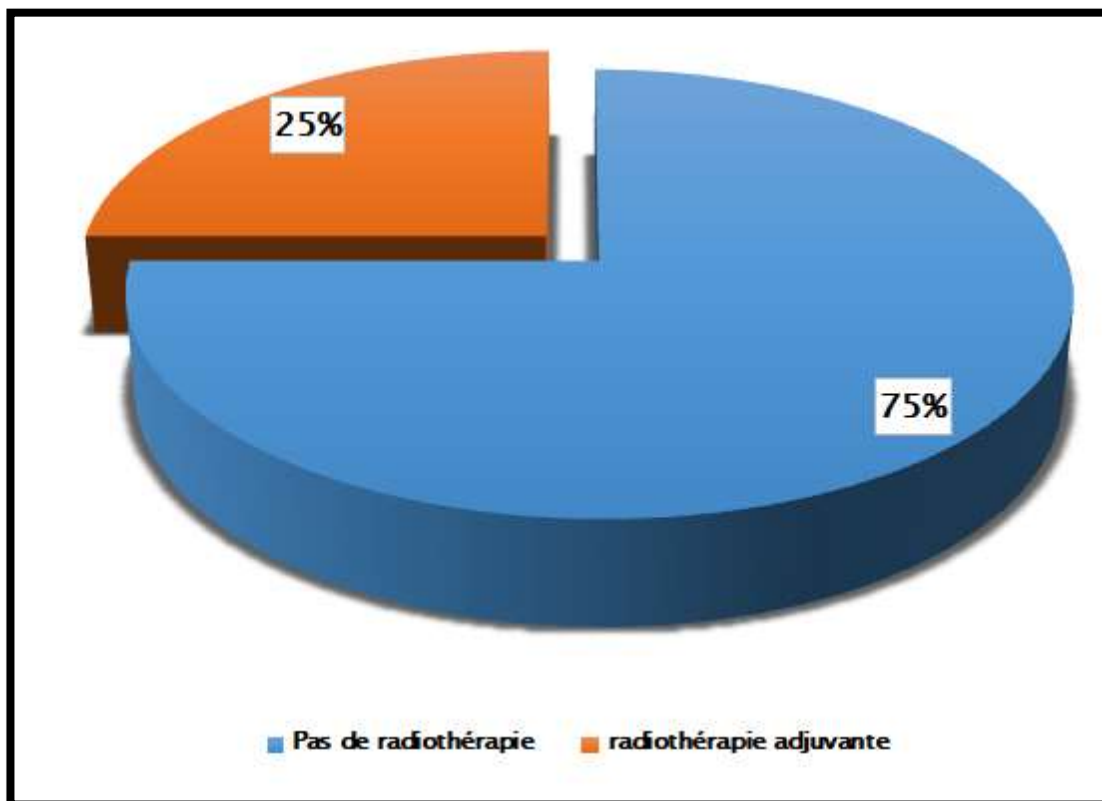


Figure 45: répartition des patients en fonction du traitement adjuvant par radiothérapie.

5.3. Chimiothérapie :

Trente-six patients ont bénéficié d'un traitement par chimiothérapie. Dans la majorité des cas (30 patients), il s'agissait d'une chimiothérapie néo-adjuvante, à base des protocoles MAI (Adriamycine, Isofosfamide, Mesna), VIDE (Vincristine, Isofosfamide, Doxorubicine, Etoposide) et VAC (Vincristine, Doxorubicine, Cyclofosfamide). Pour les 6 autres patients, il s'agissait d'une chimiothérapie adjuvante dont une était une monothérapie à base de Doxorubicine.

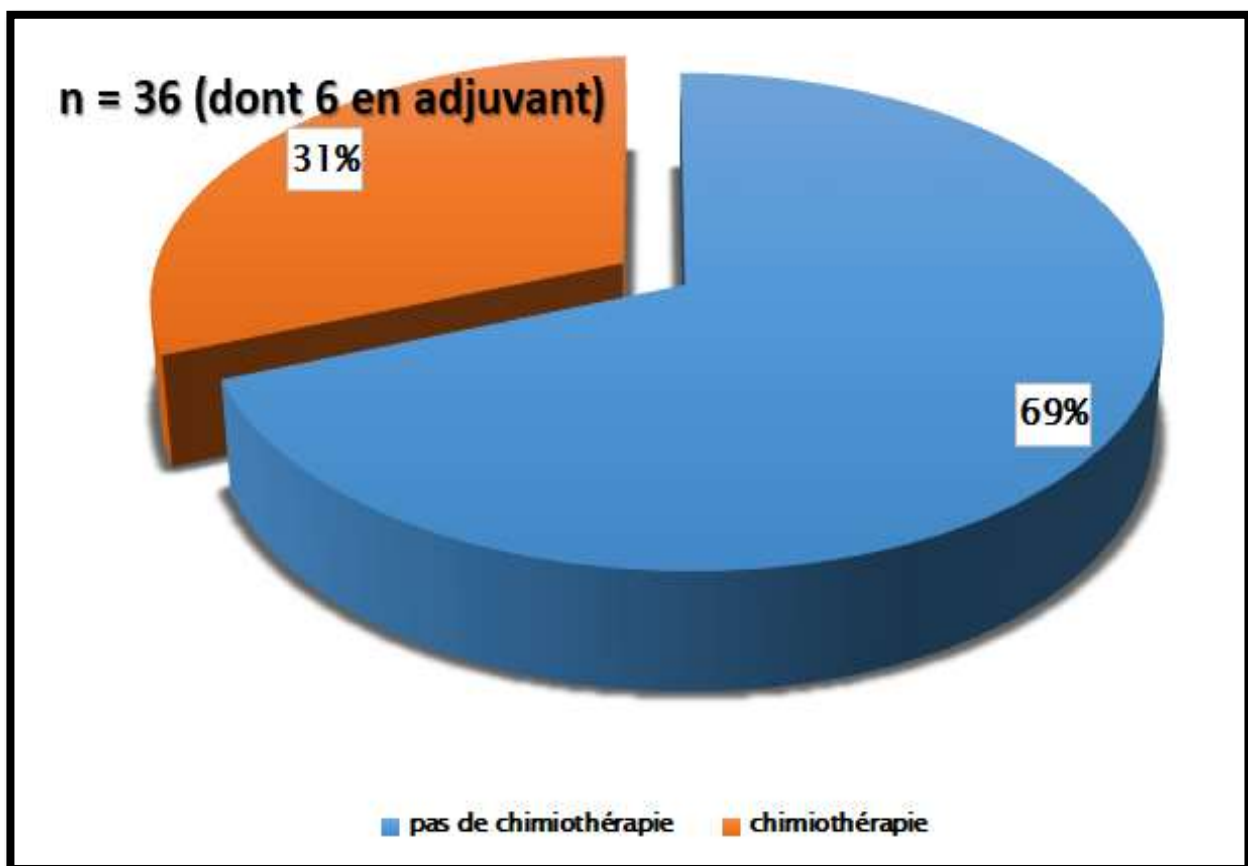


Figure 46: répartition des patients en fonction du traitement par chimiothérapie.

6. Données évolutives :

6.1. Mortalité :

Le taux de mortalité est de 18% (21 cas) dans notre étude. La majorité des patients décédés sont arrivés au stade métastatique.

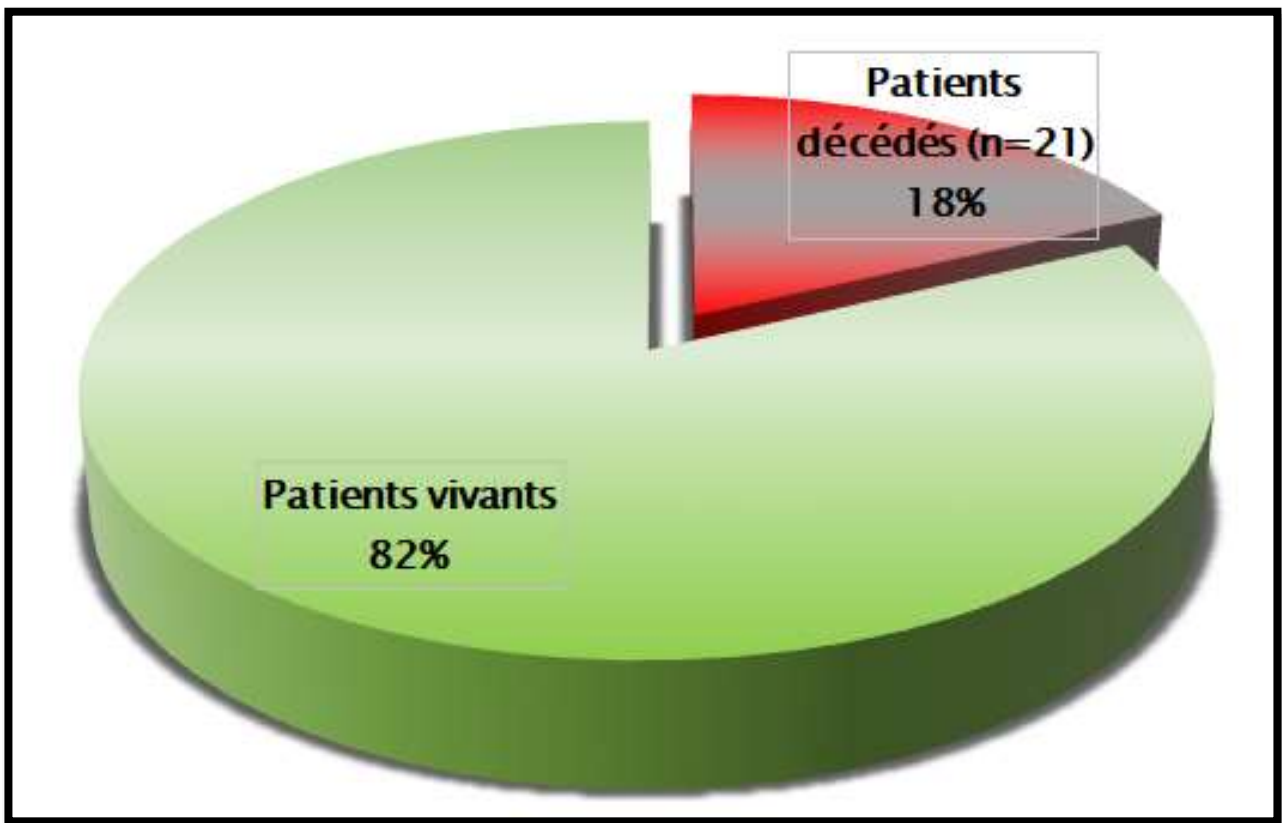


Figure 47: répartition des patients en fonction du statut vivant ou non.

6.2. Statut métastatique :

Vingt patients ont présenté des métastases (soit 17.2%), dont 4 ont développé des métastases au cours de l'évolution, 6 patients avaient des métastases dès l'admission, et 10 patients avaient des métastases révélées sur le bilan d'extension.

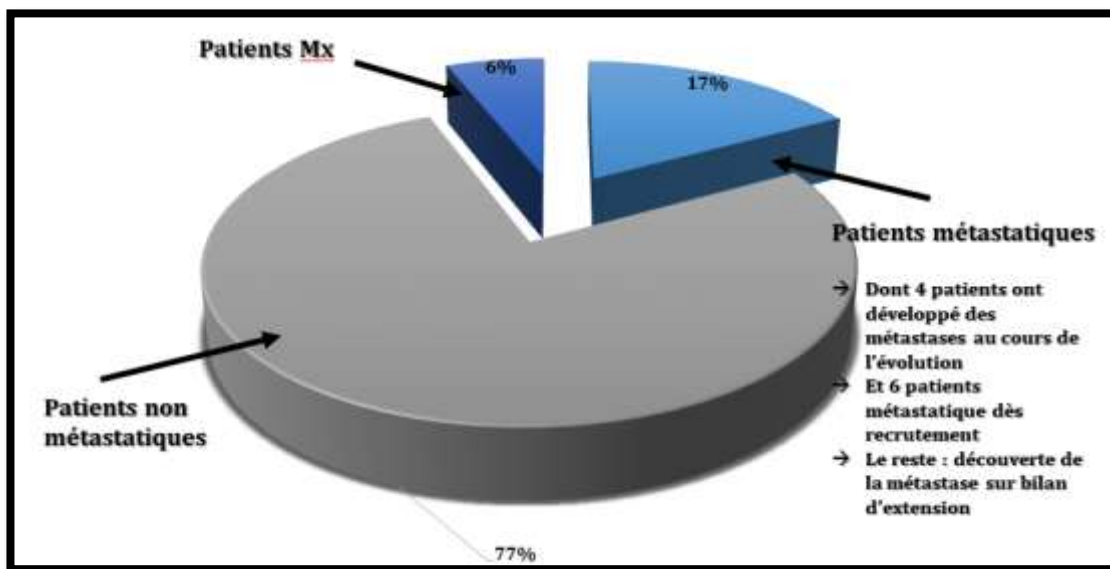


Figure 48: répartition des patients en fonction du statut métastatique.

6.3. Récidive locale :

Une récidive locale a été notée chez 18 patients (soit 15%).

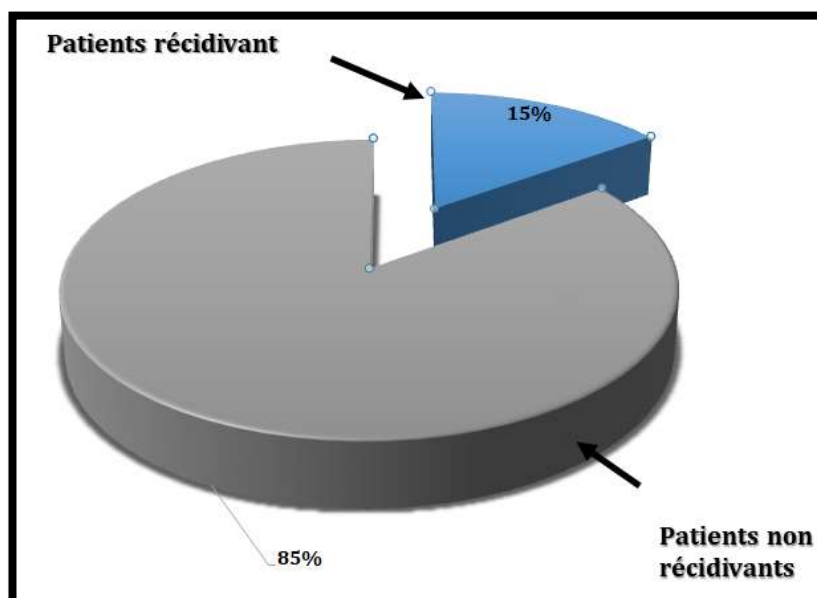


Figure 49: répartition des patients en fonction de la récidive locale.

7. Etude analytique :

7.1. Correlations entre les deux groupes :

7.1.1. Réalisation d'une IRM préalable :

Quatre-vingt-neuf patients ont bénéficié d'une IRM pré-opératoire (soit 85,3%).

On a objectivé une différence significative entre les groupes. Dans le groupe « RCP », 56,9% des patients ont bénéficié d'une IRM, contre seulement 28,4% dans le groupe « non RCP » ($p=0.008$).

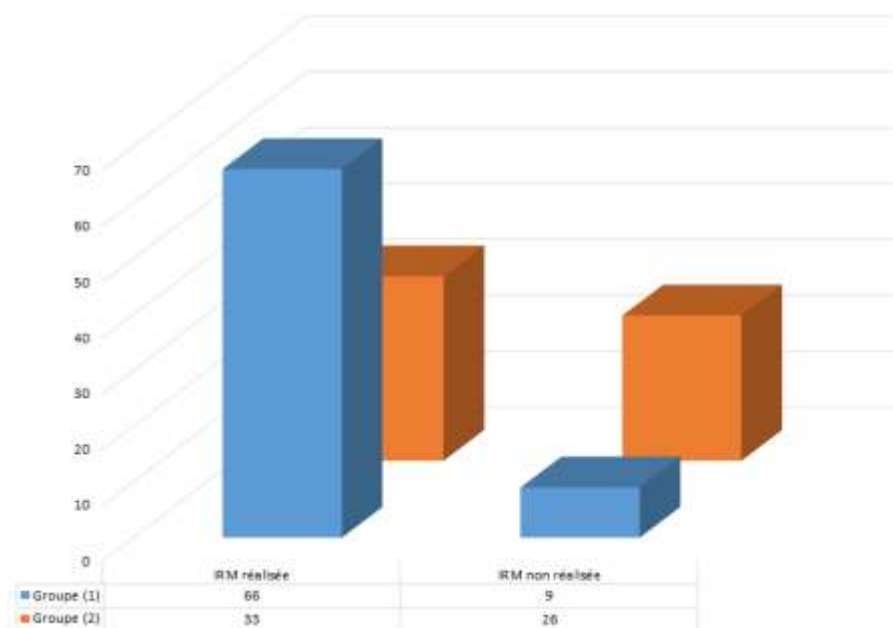


Figure 50 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une IRM dans les deux groupes.

7.1.2. Réalisation d'une biopsie préalable :

On a objectivé une différence significative également entre les deux groupes concernant la réalisation de la biopsie pré-opératoire. 91% des patients du groupe « RCP » ont bénéficié d'une biopsie pré-opératoire, contre seulement 58% dans le groupe « non RCP » ($p < 0.001$).

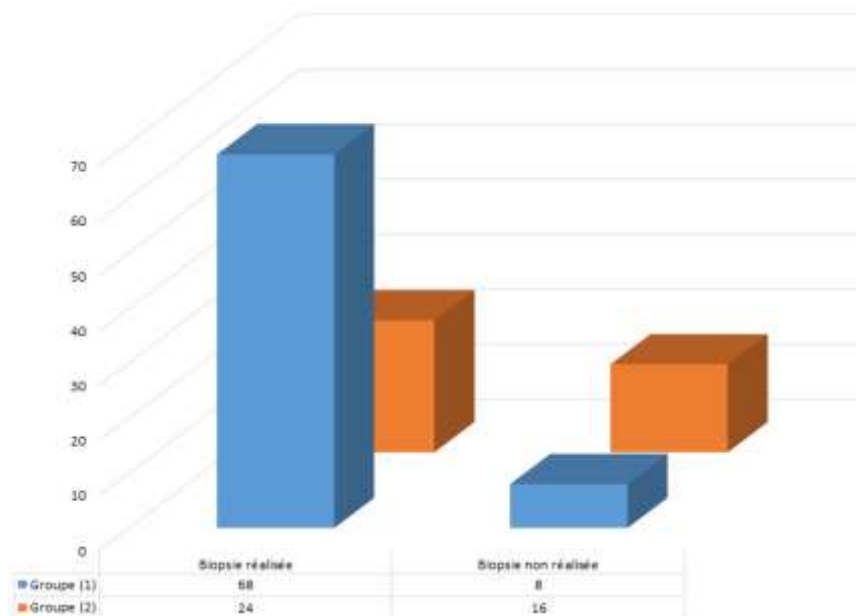


Figure 51 : répartition des patients en fonction de la réalisation d'une biopsie préopératoire dans les deux groupes.

7.1.3. Récidive locale :

Les patients du groupe « RCP » ont présenté moins de récidives locales (10,6%) contre 24,3% du groupe « non RCP » ($p=0.048$)

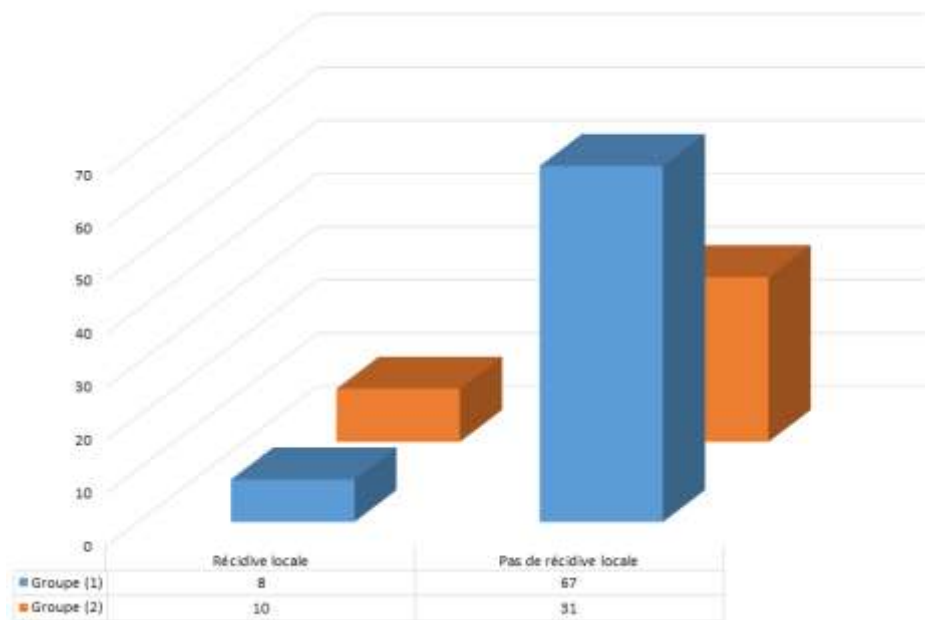


Figure 52 : répartition des patients en fonction de la survenue de la récidive locale dans les deux groupes.

Le tableau ci-dessous résume la comparaison des différents paramètres clinicopathologiques des 2 groupes (RCP et non RCP). Les différences significatives ($p < 0,05$) sont retrouvées en matière de réalisation de biopsie préopératoire, la réalisation d'une IRM préalable et la récurrence locale.

caractéristiques	Total N = 116	Groupe (1) N = 75	Groupe (2) N = 41	p value
Sexe				
Masculin	71 (61,2%)	46 (39,6%)	25 (21,5%)	0,499
Féminin	45 (38,8)	30 (25,8%)	15 (13,1%)	
Age :				
Moyen	53,56	54,81	51,29	0,924
<20	6 (5,2%)	4 (3,4%)	2 (1,7%)	
21-40	31 (26,7%)	18 (15,5%)	13 (11,2%)	
41-60	41 (35,5%)	28 (24,1%)	13 (11,2%)	
61-80	30 (25,9%)	20 (17,2%)	10 (8,6%)	
>80	8 (6,9%)	5 (4,3%)	3 (2,8%)	
Taille de la tumeur (cm)				
Moyenne				0,292
Médiane	12,28	12,3	11	
	10	10	9,5	
Localisation de la tumeur				
Membre supérieur	91 (78,4%)	59 (50,8%)	32 (27,6%)	0,483
Membre inférieur	25 (21,6%)	17 (14,6%)	8 (7%)	
Profondeur				
Tumeur profonde	111 (95,7%)	73 (62,9%)	38 (32,7%)	0,236
Tumeur superficielle	5 (4,3%)	2 (1,7%)	3 (2,7%)	
Type histologique (les plus fréquents)				
Liposarcome	35 (30,1%)	26 (22,4%)	9 (7,7%)	0,238
Léiomyosarcome	11 (9,5%)	8 (6,9%)	3 (2,7%)	
Sarcome d'Ewing	10 (8,6%)	7 (6%)	3 (2,7%)	
synoviosarcome	17 (14,6%)	11 (9,5%)	6 (5,2%)	
UPS	9 (7,7%)	6 (5,2%)	3 (2,7%)	
Grade				
1	15 (12,9%)	8 (6,9%)	7 (6%)	0,525
2	67 (57,7%)	46 (39,6%)	21 (18%)	
3	34 (29,4%)	22 (19%)	12 (10,5%)	

**INTERET DE L'HYBRIDATION IN SITU PAR FLUORESCENCE ET DE LA REUNION DE CONCERTATION
PLURIDISCIPLINAIRE DANS LA PRISE EN CHARGE DES SARCOMES DES PARTIES MOLLES DES EXTREMITES**

Fluorescence in situ hybridization (FISH)				
Faite	56 (48%)	42 (36,2%)	14 (12,1%)	0,030
Non faite	60 (52%)	37 (29,3%)	26 (22,4%)	
IRM avant chirurgie				
Oui	99 (85,3%)	66 (56,9%)	33 (28,4%)	0,008
Non	17 (14,7%)	9 (7,7%)	8 (7%)	
Biopsie avant chirurgie				
Oui				
Non	92 (79,3%)	68 (58,6%)	24 (20,7%)	< 0,001
	24 (20,7%)	8 (7%)	16 (13,7%)	
Marges chirurgicales				
R0				
R1	37 (58,7%)	20 (31,7%)	17 (27%)	0,650
R2	24 (38%)	16 (25,4%)	8 (12,7%)	
	2 (3,3%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	
Statut métastatique				
M0				
M1	89 (76,7%)	62 (53,4%)	27 (23,3%)	0,105
Mx	20 (17,2%)	9 (7,7%)	11 (9,5%)	
	7 (6,1%)	5 (4,3%)	2 (1,8%)	
Récidive locale				
Oui	18 (15,5%)	8 (6,9%)	10 (8,6%)	0,048
Non	98 (84,5%)	67 (57,7%)	31 (26,8%)	

**Tableau6 : Tableau récapitulatif de la comparaison des différents paramètres
clinicopathologiques des 2 groupes de patients.**

Une analyse multivariée a été réalisée (tableau...), incluant tous les paramètres analysée dans l'étude univariée. Cette analyse multivariée a montré une différence significative entre les deux groupes en matière de la réalisation d'une IRM préalable, la réalisation d'une biopsie préalable, la qualité des marges chirurgicales, le statut métastatique, la récurrence locale et le type histologique. Cela confirme que les patients dont les dossiers sont discutés en RCP ont eu une meilleure prise en charge.

Cependant, il n'y avait pas de différence significative en termes d'âge, de sexe, de taille tumorale, de localisation, de profondeur ou de grade histologique.

Paramètres	Analyse univariée	Analyse multivariée
Sexe	0,499	0,836
Age	0,924	0,183
Taille de la tumeur	0,292	0,198
Localisation de la tumeur	0,483	0,765
Profondeur	0,236	0,220
Type histologique	0,238	<i>0,049</i>
Grade histologique	0,525	0,287
FISH	<i>0,030</i>	<i>0,034</i>
IRM avant chirurgie	<i>0,008</i>	<i>0,022</i>
Biopsie avant chirurgie	<i>< 0,001</i>	<i>0,000</i>
Marges chirurgicales	0,650	<i>0,028</i>
Statut métastatique	0,105	<i>0,034</i>
Récidive locale	<i>0,048</i>	<i>0,001</i>

Tableau 7 : résultats de l'étude multivariée

7.2. Etude de la survie :

7.2.1. Survie globale :

La survie globale de nos patients est de 80.732 mois, avec un IC=95% de 73,553 à 86,994.

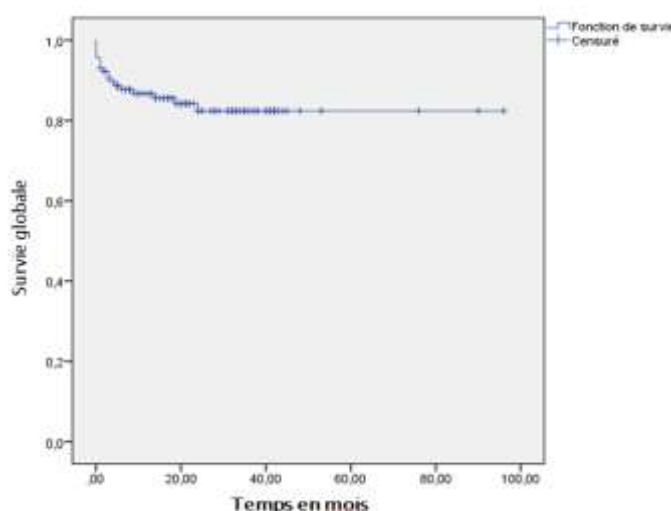


Figure 53: Courbe de survie globale de l'ensemble des patients (n=116).

La comparaison de la survie globale entre les deux groupes a montré que les patients du groupe « RCP » ont une meilleure survie globale (moy=74,253 mois) par rapport aux patients du groupe « non RCP » (moy = 42,516 mois).

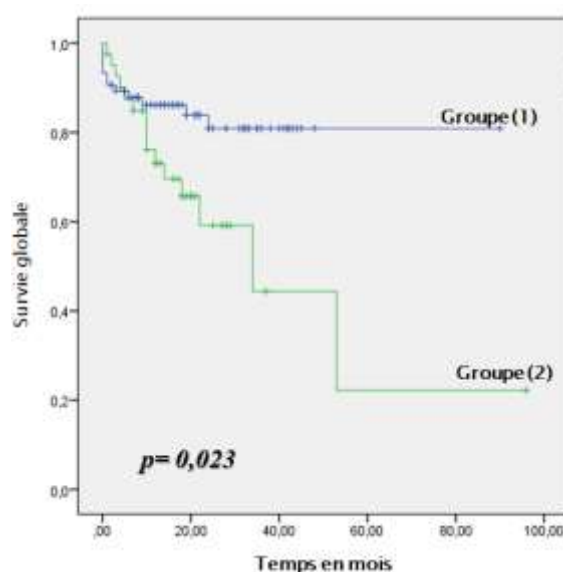


Figure 54 : Courbe de survie globale des deux groupes de patients.

7.2.2. Survie sans récurrence :

La survie sans récurrence était significativement améliorée chez les patients du groupe « RCP » contre le groupe « non RCP » (60,724 vs 35,649 respectivement).

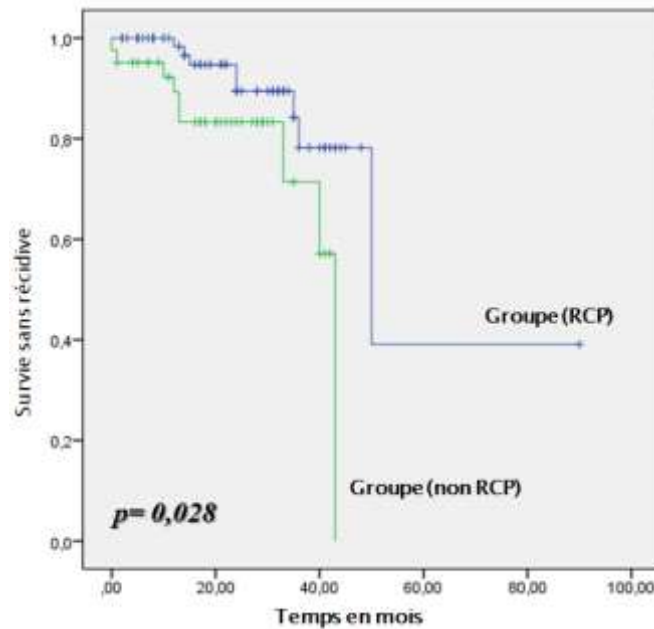


Figure 55 : Courbe de survie sans récurrence des deux groupes de patients 56

7.2.3. Survie sans métastase :

La survie sans métastase était également significativement améliorée chez les patients du groupe « RCP » contre le groupe « non RCP » (78,998 vs 69,949 respectivement).

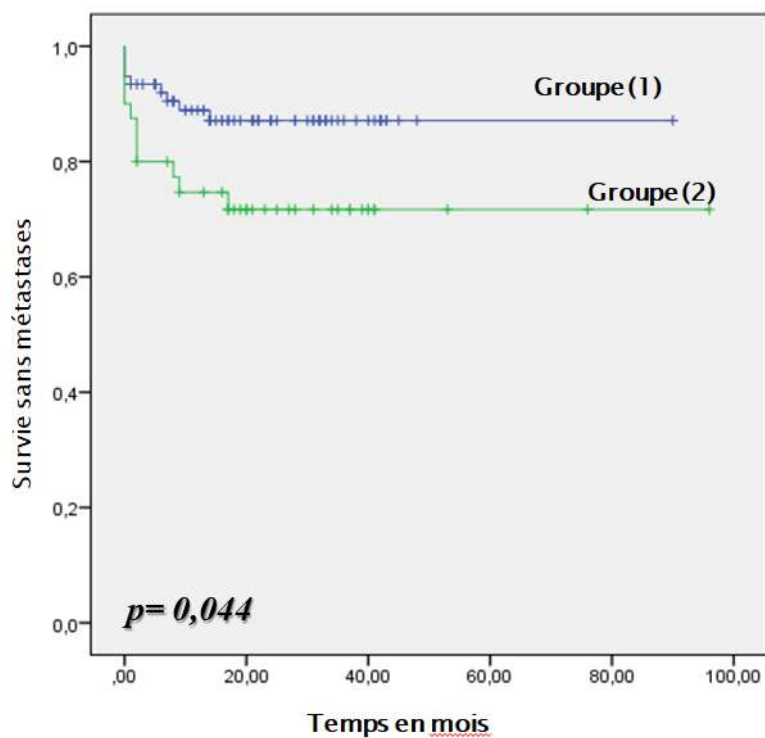


Figure 56: Courbe de survie sans métastase des deux groupes de patients

DISCUSSION

VOLET I : INTERET DE L'HYBRIDATION IN SITU PAR FLUORESCENCE

DANS LES TUMEURS DES TISSUS MOUS :

1. Place de la biologie moléculaire dans les sarcomes des tissus mous :

Compte tenu des implications thérapeutiques lourdes avec le plus souvent une séquence chirurgie–radiothérapie–chimiothérapie, le diagnostic initial doit être le plus fiable possible. La classification des sarcomes, initialement basée sur des critères histologiques et immunohistochimiques, comprend maintenant des critères moléculaires pour certaines entités (31).

Certaines anomalies moléculaires se sont révélées être des marqueurs diagnostiques spécifiques, permettant leur intégration dans la définition d'une entité. L'utilisation systématique de la biologie moléculaire dans des groupes spécialisés en pathologie sarcomateuse a permis de faire évoluer la classification. Ainsi, des entités histologiques distinctes ont été regroupées, comme le sarcome d'Ewing et le neuroépithéliome, l'histiocytofibrome malin inflammatoire et le liposarcome dédifférencié [32].

À l'inverse, des entités comportant une certaine similitude histologique ont été séparées, comme le rhabdomyosarcome embryonnaire peu différencié et le rhabdomyosarcome alvéolaire [33], le liposarcome bien différencié sclérosant d'aspect myxoïde et le liposarcome myxoïde.

1.1. Intérêt de la FISH dans la pratique diagnostique de routine

En pratique de routine, la FISH est utile et parfois indispensable au diagnostic dans trois situations principales :

- Distinguer une tumeur bénigne d'un sarcome ;
- Identifier un type spécifique de sarcome ;

- Affirmer un diagnostic devant des formes cliniques et histologiques inhabituelles.

Il est essentiel dans ces contextes de se rappeler que les résultats de la FISH doivent être interprétés à la lumière des données morphologiques et cliniques pour aboutir à un diagnostic cohérent et intégré.

1.2. Distinguer une tumeur bénigne d'un sarcome :

La FISH permet dans certaines situations de trancher entre une tumeur bénigne et maligne (particulièrement sur microbiopsies). Ainsi, l'identification d'une amplification du gène MDM2 permet de distinguer une tumeur adipeuse atypique/liposarcome bien différencié d'un lipome [34] ; l'identification d'une amplification du gène MYC par FISH permet de distinguer un angiosarcome en territoire irradié d'une lésion vasculaire atypique [35].

Dans notre étude, la FISH a permis de poser le diagnostic d'un liposarcome bien différencié sur une prolifération adipocytaire bien différenciée chez 3 cas.

1.3. Identifier un type de sarcome spécifique

Dans les sarcomes à cellules rondes, en particulier pédiatrique, l'utilisation de la FISH est indispensable pour différencier un sarcome d'Ewing, une tumeur desmoplastique à cellules rondes, un rhabdomyosarcome alvéolaire, un synoviosarcome peu différencié et, éventuellement, un liposarcome à cellules rondes ou un chondrosarcome mésoenchymateux. Cette distinction est bien entendu cruciale dans la mesure où la prise en charge thérapeutique diffère en fonction de ces entités. La technique FISH (en montrant par exemple un réarrangement du gène SS18 pour un synoviosarcome) permet le plus souvent de poser le diagnostic ; cependant, elle peut s'avérer insuffisante pour, par exemple, faire la distinction entre un sarcome d'Ewing et une tumeur desmoplastique à petites cellules qui présentent toutes les deux un

réarrangement du gène EWSR1. Dans cette situation, la recherche par RT-PCR du transcrit spécifique est indispensable au diagnostic. Ainsi, de manière générale, un résultat de FISH doit être interprété en fonction des données cliniques, morphologiques et immunohistochimiques. La seconde situation d'intérêt, fréquemment rencontrée, est celle de l'identification d'un liposarcome dédifférencié notamment en situation rétropéritonéale. En effet, pour poser un diagnostic de liposarcome dédifférencié, il est nécessaire pour le pathologiste d'identifier une composante de liposarcome bien différenciée. Or, cette composante n'est d'une part pas toujours identifiable et, d'autre part, la pratique de plus en plus généralisée des microbiopsies limite la possibilité de visualiser cette composante de liposarcome bien différenciée.

Ainsi, la mise en évidence d'une amplification du gène MDM2 par technique FISH au niveau d'un sarcome pléomorphe indifférencié permet de poser le diagnostic de liposarcome dédifférencié [36]. Cette distinction est importante tant en terme thérapeutique (une stratégie chirurgicale agressive avec est indiquée dans le liposarcome dédifférencié du fait d'un risque de récurrence local très élevé) que pronostique (les sarcomes pléomorphes indifférenciés ont un pronostic beaucoup plus péjoratif que les liposarcomes dédifférenciés).

Parmi 13 cas dont la morphologie étaient pléomorphe dans notre série, la FISH a permis de retenir le diagnostic d'un liposarcome dédifférencié par une amplification du gène MDM2.

1.4. Affirmer un diagnostic face à des formes histologiques et cliniques inhabituelles :

L'utilisation de la FISH de manière de plus en plus systématique permet de poser un diagnostic formel dans un contexte inattendu et différent de la présentation clinique classique : un diagnostic de sarcome d'Ewing chez un sujet âgé, un sarcome d'Ewing de localisation inhabituelle ou un diagnostic de synoviosarcome au niveau d'un viscère.

De manière plus générale, l'utilisation systématique de la FISH dans des groupes spécialisés en pathologie sarcomateuse a permis :

- d'améliorer la classification. Ainsi, mieux classer les sarcomes permet de proposer aux patients une thérapeutique plus précise, voire ciblée ; mais aussi d'améliorer l'efficacité des essais cliniques (l'identification de protocoles thérapeutiques spécifiques et adaptés à une entité dans le cadre d'un essai clinique est dépendante de l'exactitude diagnostique des tumeurs incluses) ;
- de faire évoluer la classification. En effet, des entités distinctes ont été regroupées comme le sarcome d'Ewing et le neuroépithéliome ou l'histiocytofibrome malin inflammatoire et le liposarcome dédifférencié.

À l'inverse, des entités qui présentaient des ressemblances morphologiques ont été séparées comme le rhabdomyosarcome alvéolaire et le rhabdomyosarcome embryonnaire peu différencié [30].

1.5. Place de la FISH dans les prélèvements cytologiques :

L'utilisation de la FISH sur des prélèvements cytologiques a montré un grand succès ces dernières années, ainsi que par la disponibilité d'une grande variété de sondes. Vu la diversité des types histologiques de sarcomes des tissus mous, l'accessibilité et la faisabilité de la FISH pour poser un diagnostic précis a un grand

intérêt et un grand bénéfice. L'étude par FISH sur des prélèvements cytologiques, va permettre non seulement de faire un diagnostic précis permettant une meilleure prise en charge thérapeutique, mais également d'encourager de faire ce type de prélèvements chez des patients pour lesquels un traitement plus agressif ne peut être réalisé, à condition que ce type de prélèvement soit suffisamment représentatif et assez cellulaire (37).

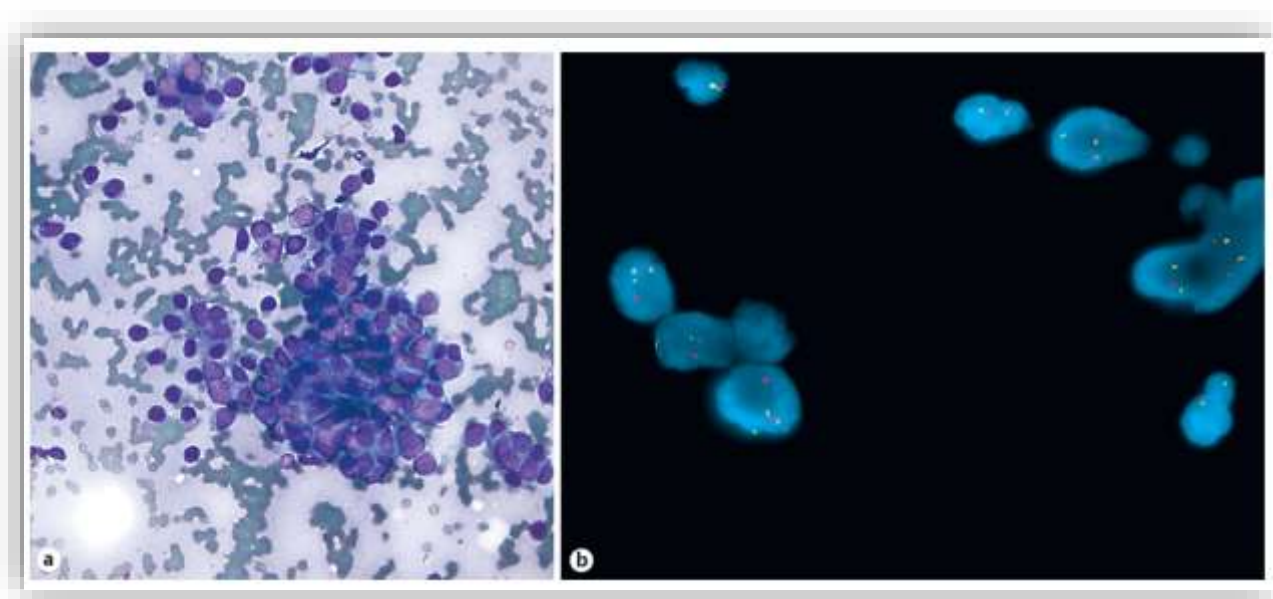


Figure 57 : Image cytologique d'un sarcome d'EWING. a : prolifération tumorale à petites cellules rondes. b : étude FISH réalisée, montrant un réarrangement du gène EWSR1.

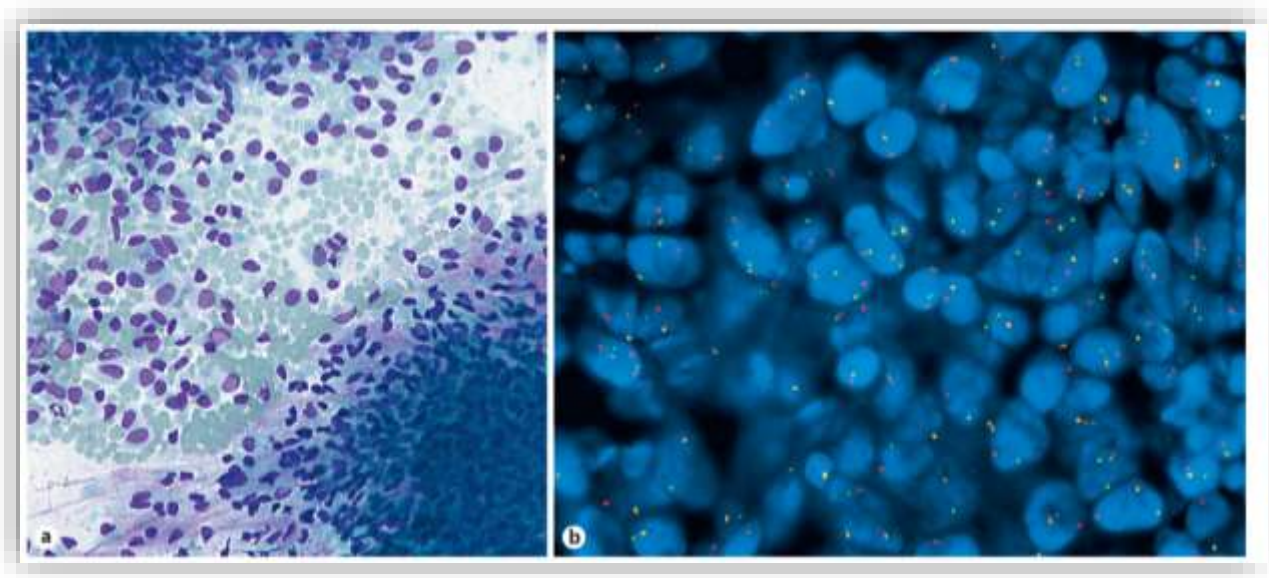


Figure 58 : Image cytologique d'un synoviosarcome. a prolifération tumorale faite de cellules aux noyaux ronds ou ovales. b l'étude par FISH a montré un réarrangement du gène SS18

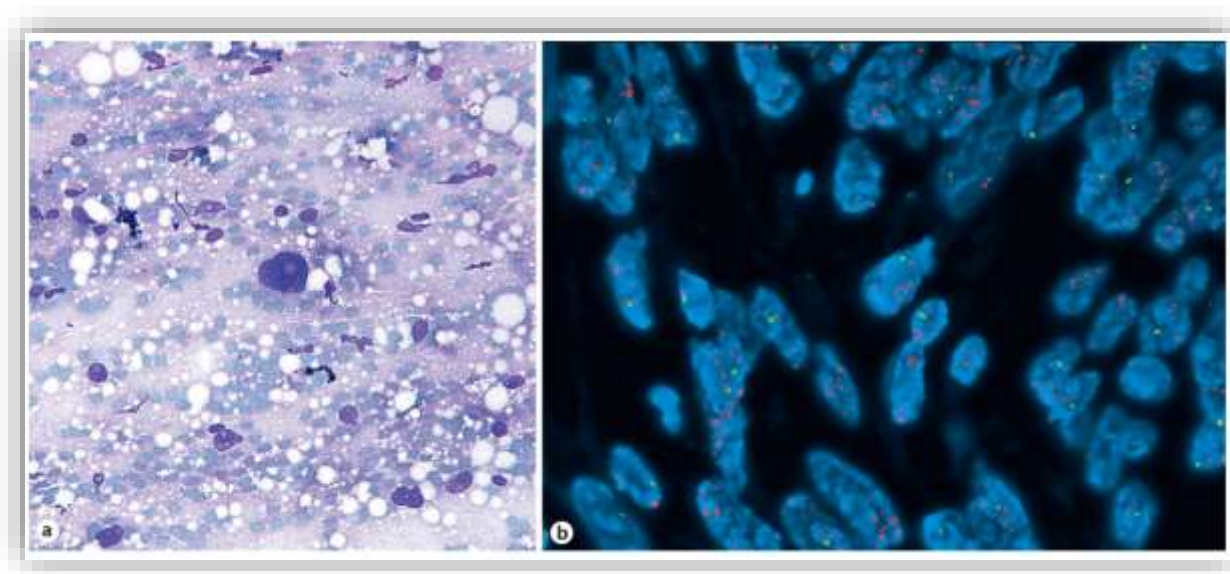


Figure 59 : Image cytologique d'un liposarcome dédifférencié. a prolifération tumorale faite de cellules pléomorphes sur un fond myxoïde. b L'étude par FISH a montré une amplification du gène MDM2.

Soft tissue tumors		
Lipoblastoma	8q11-13 rearrangements	<i>PLAG1</i>
Myxoid liposarcoma	t(12;16) (q13;p11) t(12;22)(q13;p11)	<i>FUS-DDIT3</i> <i>EWSR1-DDIT3</i>
Dedifferentiated liposarcoma	Chromosome 12 amplifications	<i>MDM2</i>
Nodular fasciitis	t(17;22)(p13;q13.1)	<i>MYH9-USP6</i>
Myxoid liposarcoma	t(12;16) (q13;p11) t(12;22)(q13;p11)	<i>FUS-DDIT3</i> <i>EWSR1-DDIT3</i>
Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12)	<i>EWSR1-NR4A3</i>
Inflammatory myofibroblastic tumor	t(1;2)(q22;p23)	<i>TPM3-ALK</i>
Giant cell fibroblastoma/dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q21.3;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
Congenital/infantile fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
Synovial sarcoma	t(X;18)(p11.2;q11.2)	<i>SYT-SSX1</i> <i>SYT-SSX2</i>
Extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma	inv(8)(q13q21)	<i>HEY1-NCOA2</i>
Solitary fibrous tumor	12q13 rearrangements	<i>NAB2-STAT6</i>
Low-grade fibromyxoid sarcoma/sclerosing epithelioid fibrosarcoma	t(7;16)(q33;p11) t(11;16)(p11;p11) / +MUC4 immunostain	<i>FUS-CREB3L2</i> <i>FUS-CREB3L1</i>
Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma/atypical myxoinflammatory fibroblastic tumor	t(1;10)(p22;q24)	<i>TGFBR3-MGEA5</i>
Epithelioid sarcoma	22q11.2 anomalies –INI1 immunostain	<i>SMARCB1</i>
Alveolar soft part sarcoma	der(17)t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPCSR1-TFE3</i>
Alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX3-FKHR (70%)</i> <i>PAX7-FKHR (20%)</i>
Embryonal rhabdomyosarcoma	LOH at the 11p15 locus of the <i>IGF2</i> gene 1p deletion	<i>IGF2 gene</i>
Ewing sarcoma/PNET	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWSR1-FLI1</i>
Desmoplastic small round cell tumor	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWSR1-WT1</i>
Undifferentiated round cell sarcoma	t(4;19)(q35;q13) t(10;19)(q26;q13)	<i>CIC-DUX4</i>

Tableau 8 : Tableau résumant les différentes anomalies génétiques détectables par étude FISH sur des prélèvements cytologiques de STS (37).

1.6. La FISH : utile ou nécessaire au diagnostic ?

Dans une étude épidémiologique réalisée dans le cadre du réseau d'excellence européen Conticanet [38], l'analyse moléculaire systématique pour toute suspicion de sarcome avec anomalie génétique spécifique a montré qu'elle était utile, c'est-à-dire qu'elle venait confirmer un diagnostic probable, dans 4 % des GIST, 26 % des sarcomes avec suspicion de translocation et 31 % des tumeurs adipeuses atypiques/liposarcomes bien différenciés et liposarcomes dédifférenciés, et qu'elle était nécessaire, c'est-à-dire qu'elle permettait d'établir un diagnostic possible, dans 1 % des GIST, 12 % des sarcomes avec suspicion de translocation et 9 % des tumeurs adipeuses atypiques/liposarcomes bien différenciés et liposarcomes dédifférenciés.

Dans notre étude, la FISH était jugée nécessaire chez 61,3% des cas, et utile chez 38,7% des cas.

2. Rôle de la FISH dans le pronostic

La FISH permet en effet de classer correctement et précisément un sarcome et d'évaluer son pronostic. Par exemple, une tumeur qui histologiquement correspond à un sarcome indifférencié et qui présente une amplification du gène MDM2 correspond en fait à un liposarcome dédifférencié dont le pronostic est bien meilleur que celui d'un sarcome indifférencié [30].

3. Indications de la biologie moléculaire

La FISH étant techniquement possible en routine et utile, voire indispensable, en termes diagnostiques et pronostiques, de nombreux pathologistes et cliniciens ont recours à cette technique complémentaire de façon de plus en plus systématique. La FISH est en passe de devenir un standard et offre plusieurs avantages et la confrontation histologie/biologie moléculaire augmente les compétences des

pathologistes.

Cependant, des inconvénients tels que le coût et le faible nombre d'analyses par laboratoire ont pour l'instant limité son utilisation à grande échelle. Mais compte tenu de l'importance que va prendre la détection des différentes anomalies génétiques pour la prise en charge thérapeutique et du différentiel entre le coût des thérapies et celui de cette technique, son utilisation est hautement recommandée chaque fois que cela est possible.

Lors de l'établissement d'un diagnostic de sarcome, le pathologiste doit se rappeler que l'histologie et la génomique sont liées, la morphologie étant le reflet des modifications génétiques et épigénétiques. L'histologie est le plus souvent la clé pour orienter les anomalies génétiques à rechercher. Même si certains cas difficiles, dont l'histologie n'est pas spécifique ou est trompeuse, requièrent des techniques complémentaires pour aboutir au diagnostic, la FISH seule ne peut pas différencier deux tumeurs caractérisées par la même translocation. Le contexte clinique et l'histologie resteront toujours le gold standard pour le diagnostic (20).

VOLET II : L'INTERET DE LA PRISE EN CHARGE MULTIDISCIPLINAIRE DES SARCOMES DES TISSUS MOUS :

Les sarcomes sont des cancers pour lesquels une prise en charge multidisciplinaire dans un centre de référence est indiquée dans toutes les recommandations de pratique clinique [39–41].

Ces tumeurs sont à la fois rares et hétérogènes (50 types histologiques différents, plus de 150 types moléculaires), induisant différentes problématiques :

- Ils sont fréquemment d'interprétation et de classement difficiles, conduisant à des erreurs de diagnostic pouvant orienter vers un traitement non optimal (8 à 25 % de discordances avant et après relecture selon les études) [42] ;
- La chirurgie initiale est l'élément clé du pronostic. La rareté de ces tumeurs et les signes cliniques peu évocateurs conduisent fréquemment à des chirurgies minimalistes sans discussion pluridisciplinaire et sans respect des marges de sécurité adéquates pour les sarcomes. Les rattrapages par la radiothérapie ou la chimiothérapie d'une chirurgie inadéquate ne sont satisfaisants ni pour la survie ni pour la fonction [43]. Pour que la chirurgie soit optimale, le sarcome doit avoir été identifié, d'où la nécessité d'une imagerie et d'une biopsie préalables. La chirurgie doit ensuite être planifiée au sein d'une équipe entraînée qui connaît les stratégies de traitement et les pièges techniques [44,45];

La prise en charge est multidisciplinaire impliquant oncologue, radiologue, anatomopathologiste, radiothérapeute et chirurgien réunis à chaque étape de la prise en charge : imagerie, biopsie, chirurgie, traitements adjuvants ou néoadjuvants, suivis. La prise en charge des STM est bien codifiée au travers de référentiels et de recommandations (39–41).

1. Intérêt de l'imagerie :

La prise en charge optimale débute dès la suspicion de sarcome. La triade diagnostique (plus ou moins complète) associe masse, douleur et gêne fonctionnelle. Le diagnostic différentiel clinique est parfois difficile avec les tumeurs bénignes. Comme 70 % des sarcomes mesurent plus de 5 cm au moment du diagnostic, toute masse de plus de 5 cm doit être considérée et explorée comme un sarcome jusqu'à preuve du contraire.

Devant une telle présentation clinique, une imagerie destinée à apprécier la taille et l'extension locale de la tumeur est réalisée et permet de conforter la suspicion diagnostique, de juger de l'opérabilité, d'établir le stade de la tumeur et guider une biopsie. Pour les masses superficielles et limitées, l'échographie peut être une première approche, alors qu'une masse profonde nécessite une scanographie, ou une IRM.

En raison du risque de métastase, un bilan d'extension par scanographie thoracique, voire abdominopelvienne, est obligatoire. La TEP-scanographie, actuellement en cours d'évaluation, semble performante pour le bilan d'extension des sarcomes et l'analyse de la réponse aux traitements (46).

Dans notre série, 66 patients (88%) du groupe « RCP » ont eu une exploration radiologique par IRM (52% dans l'étude de Ray-Coquard et al. [47], et 76,5% dans l'étude de Haddad J, et al. [48]) contre 33 patients (80%) dans le groupe « non RCP ». Tous les patients discutés en MDM ont bénéficié d'un scanner thoracique à la recherche de métastases à distance (82% dans l'étude de Ray-Coquard et al, Et 100% dans l'étude de Haddad J et al.).

Plusieurs études [49, 50] ont clarifié les caractéristiques radiologiques qui devraient être discutées en RCP:

- Diamètre > 50 mm;
- Localisation profonde;
- Contours irréguliers ou lobulés;
- Présence de parois et de septa intratumoraux irréguliers et épais;
- Hétérogénéité sur les séquences T1 et T2;
- Prise de contraste précoce et prolongée;
- Présence de nécrose.

Les résultats de notre étude concernant la réalisation d'un examen IRM avant traitement ont montré qu'il existe une différence significative entre les deux groupes ($p = 0,008$), ce qui signifie qu'un grand nombre de patients atteints de sarcomes reçoivent un traitement sans imagerie préalable, et sont exposés à un risque élevé de chirurgie inappropriée et à une rechute locale. Ceci a été prouvé sur nos résultats concernant ces deux derniers paramètres avec une différence significative ($p = 0,028$ et $p = 0,001$ respectivement) entre les deux groupes.

2. Intérêt de la biopsie préalable :

Après une évaluation radiologique appropriée, une biopsie doit être réalisée avant toute décision chirurgicale, et selon les recommandations (39–41), elle doit être réalisée par une aiguille de 16G au minimum, car sur cette biopsie, il faut distinguer une tumeur bénigne d'une tumeur maligne, (cette distinction est nécessaire pour la planification chirurgicale (excision marginale ou simple vs excision large)), établir un diagnostic précis (impliquant souvent une étude immunohistochimique +/- moléculaire complémentaire), établir un grade histologique et évaluer l'indication d'un traitement néoadjuvant.

La biopsie doit être réalisée par un radiologue ou un chirurgien entraîné. Le site de la biopsie ainsi que sa cicatrice doivent être enlevés en toute sécurité lors de la

chirurgie définitive, d'où l'intérêt de tatouer le site de la biopsie.

Dans notre série, 79,3% des patients (n=92) ont bénéficié d'une biopsie préalable, radioguidée dans la majorité des cas (66%), avec une différence significative entre nos deux groupes de patients ($p < 0,001$).

Il faut également noter, que pour des tumeurs dont la taille est inférieure à 5 cm, une biopsie-exérèse peut être effectuée d'emblée.

3. Le traitement chirurgical et l'importance des marges de résection :

Près de la moitié des patients atteints d'un sarcome des tissus mous est mal prise en charge sur le plan chirurgical, ce qui expose à des reprises chirurgicales qui auraient pu être évitées, à des surcoûts [51], et surtout des récives qui peuvent compromettre la vie du patient [52].

La chirurgie comporte toute la partie de réflexion quant au diagnostic et à l'indication opératoire. L'une des particularités des sarcomes est la complexité de son anatomopathologie. Des erreurs de diagnostic bénin-malin ou sarcome-carcinome-lymphome sont courantes, et il est donc nécessaire (voire légal...) d'avoir une lecture par un pathologiste spécialisé, avec l'immunohistochimie et éventuellement l'apport de la biologie moléculaire [53].

Une imagerie adaptée est nécessaire au début, en ayant en tête ses pièges principaux : sous-évaluation de l'extension dans les défilés de part et d'autre de frontières anatomiques (arcade crurale, trous de conjugaison, hiatus oesophagien, etc.) ; et surtout méconnaissance de la partie bien différenciée de la tumeur, en particulier dans les liposarcomes dédifférenciés [54] : la partie dédifférenciée est bien visible, c'est souvent celle qui est décrite par le radiologue, alors que la partie bien différenciée est méconnue et source de reliquat macroscopique (et donc d'effraction tumorale).

Il faut prendre l'habitude de regarder toute l'imagerie et tous les organes ainsi

que leur déplacement éventuel pour « voir » l'ensemble de la tumeur, et de ce qu'elle englobe [54]. L'imagerie initiale permet donc de suspecter un éventuel sarcome, et c'est là que doit se poser la question de référer le patient dans un centre spécialisé.

Dans le cas des sarcomes des tissus mous des membres, la qualité de l'exérèse est appréciée par la quantité de la berge minimum de tissu sain autour de la tumeur qui doit être indiquée par le pathologiste [55,56]. L'objectif pour le chirurgien étant de réséquer la tumeur « sans la voir ».

Une exérèse fragmentaire a le même pronostic qu'une exérèse macroscopiquement incomplète.

L'évaluation des marges de résection chirurgicales doit être faite en collaboration avec les chirurgiens. Le rapport chirurgical doit être détaillé, comportant le diagnostic pré-opératoire, l'acte chirurgical (tumeur ouverte ou non), exhaustivité chirurgicale vis-à-vis des marges de résection planifiées.

En cas de traitement néoadjuvant, l'évaluation de la réponse thérapeutique doit être faite en collaboration avec les radiologiques, surtout qu'il n'y a pas de consensus concernant le seuil de cellules tumorales viables.

Dans notre série, la chirurgie « in sano » (R0) était obtenue dans 58,7% des cas, une résection R1 dans 38% des cas et une résection R2 dans 4% des cas.

Ces résultats étaient statistiquement significatives entre les deux groupes dans l'analyse multivariée ($p = 0,028$) avec un risque moindre de récurrence locale dans le groupe (1) par rapport au groupe (2) ($p = 0,001$) ainsi que de métastases à distance ($p = 0,034$).

Ainsi, notre étude a également démontré que la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans métastase étaient significativement plus élevées chez les patients du groupe « RCP » ($p = 0,023$, $p = 0,028$ et $p = 0,044$ respectivement).

4. Le diagnostic anatomopathologique :

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs des tissus mous et de l'os a organisé les différentes entités en fonction de l'origine de différenciation. Cependant, cette dernière n'est pas très évidente pour de nombreux types histologiques. En plus, il y a certains types de tumeurs dont l'origine de différenciation est incertaine [57]. En outre, des tumeurs de diverses origines peuvent présenter des aspects histologiques similaires, ce qui rend difficile de distinguer les néoplasmes mésenchymateux bénins ou malins.

D'autre part, le grade histologique peut être sous-estimé sur un prélèvement biopsique, d'où l'intérêt de confronter avec les données de l'imagerie et surtout de chercher des signes d'agressivité et de malignité (par ex. la présence ou non de la nécrose).

Parmi les dernières guidelines de prise en charge des sarcomes des tissus mous, un second avis par un pathologiste expérimenté est recommandé, et il est impératif si le diagnostic initial a été fait hors du centre spécialisé. Dans notre série, 30 patients (26% des cas) ont bénéficié d'une biopsie hors du centre hospitalier, pour lesquels une relecture a été effectuée avant toute prise en charge.

Le grading histologique doit être fait selon la classification de la FNCLCC, sachant que l'index mitotique doit être fourni indépendamment.

Dans notre série, 57,7% de notre patient avaient un grade II, 39,4% avaient un grade III et 12,9% avaient un grade I. Ces résultats ont été comparables à l'étude réalisée par Genet J. (58) (34,4% grade II, 30,8% grade III et 13,8% grade I). Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes ($p=0,525$).

5. Le traitement adjuvant / néo-adjuvant :

Les dernières recommandations de l'ESMO (59) concernant la prise en charge diagnostique et thérapeutique des sarcomes des tissus mous et des viscères sont résumées ci-dessous :

5.1. Prise en charge des stades locaux ou locorégionaux :

- ☞ La chirurgie est le traitement standard de tous les patients atteints d'un STS localisé. Elle doit être réalisée par un chirurgien expérimenté. La procédure chirurgicale standard est une large excision avec des marges saines [II, A] ;
- ☞ L'excision large typique est suivie d'une RT comme traitement standard des lésions de haut grade (G2-3), profondes, > 5 cm [II, B]. Des exceptions peuvent être faites après discussion multidisciplinaire ;
- ☞ Les options pour la chirurgie de préservation des membres incluent une chimiothérapie et / ou une ra [III, A], ou perfusion de membre hyperthermique isolée avec administration du TNF [III, A], ou hyperthermie régionale associée à une chimiothérapie [I, B] ;
- ☞ La chimiothérapie adjuvante n'est pas un traitement standard. Elle peut être proposée au cas par cas chez des patients à haut risque [II, C] ;
- ☞ La chimiothérapie néoadjuvante avec les anthracyclines plus ifosfamide pendant au moins 3 cycles est une option chez les patients à haut risque [II, Ca]

5.2. Prise en charge des stades avancées / métastatiques :

- ☞ Métachrones (survie sans maladie ≥ 1 an), les métastases pulmonaires résécables sans maladie extrapulmonaire sont prises en charge par la chirurgie comme traitement standard, si une exérèse complète de toutes les lésions est possible [IV, B] ;

- ☞ La chimiothérapie standard est basée sur les anthracyclines comme traitement de première intention [I, A]. La chimiothérapie multi-agents avec des anthracyclines à dose adéquate plus l'ifosfamide peut être le traitement de choix, en particulier dans les sous-types sensibles à l'ifosfamide, lorsqu'une réponse tumorale est jugée potentiellement avantageuse et que le patient est bien portant [I, B] ;
- ☞ L'association de la doxorubicine avec un agent anti-PDGFRα, l'olaparatumab peut être une option [II, Cb; Score ESMO-MCBS v1.1: 4] ;
- ☞ L'association gemcitabine / docétaxel n'est généralement pas recommandée comme traitement de première intention chez les patients atteints de STS à un stade avancé [I, D] ;
- ☞ L'imatinib est un traitement médical standard pour les patients atteints de dermatofibrosarcome protuberans [III, A] ;
- ☞ La trabectédine est une option pour la deuxième ligne et au-delà [I, B] et est approuvée pour les STS avancés précédemment traités ;
- ☞ Le pazopanib est une option dans le STS non adipogène [I, B] ;
- ☞ Eribuline est une option chez les patients atteints de liposarcomes et de LMS [II, A; Score ESMO-MCBS v1.1: 4] ;
- ☞ L'association dacarbazine et gemcitabine ou gemcitabine / docétaxel est une option chez les patients prétraités à la doxorubicine [II, B] ;
- ☞ Le régorafénib est une option chez les patients atteints de STS avancés non adipogènes prétraités à la doxorubicine [II, C] ;
- ☞ Il existe des preuves sur l'activité de plusieurs agents moléculaires ciblés:
 - ☞ inhibiteurs de mTOR dans les PEComes malins [IV, C];
 - ☞ Crizotinib dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires associées

à des translocations d'ALK [IV, C];

⇒ Sunitinib et cédiranib dans le sarcome alvéolaire des parties molles, dont la cible moléculaire n'est pas encore claire [IV, C]; et

⇒ Sunitinib dans les tumeurs fibreuses solitaires [IV, C].

Ci-dessous, des arbres décisionnelles récapitulatives des différentes recommandations citées ci-dessus.

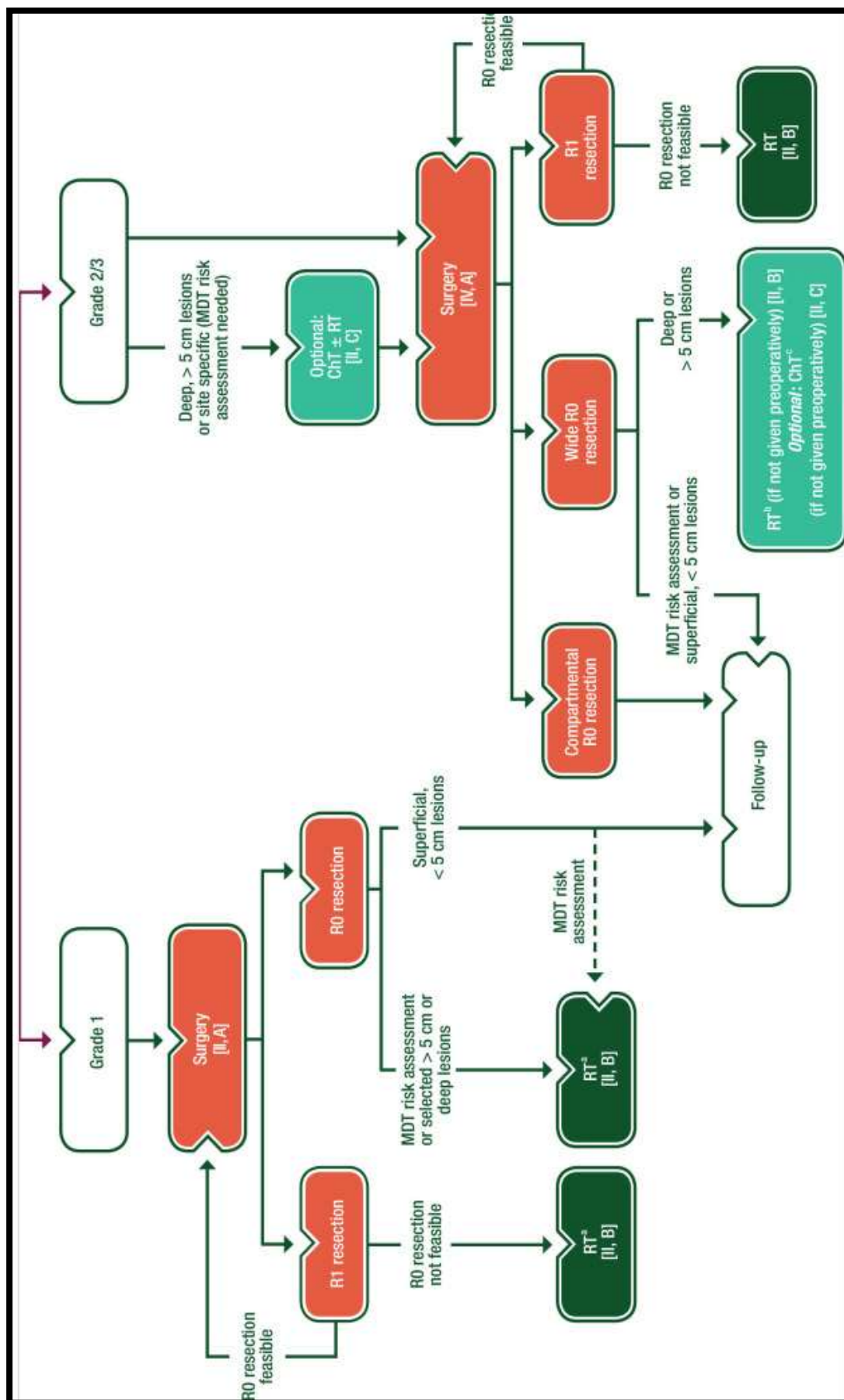


Figure 60 : Prise en charge des STS localisés et cliniquement résécables. ^aRT peut être omise dans certains cas; optionnel: perfusion de membre isolé dans des cas hautement sélectionnés. ^bRT peut être omise dans certains cas profonds et ajouté dans certains cas superficiels; à administrer en préopératoire en cas de problème postopératoire. ^c Extrême et tronc superficiel, G3, profond, > 5 cm. ChT, chimiothérapie; MDT, équipe multidisciplinaire; RT, radiothérapie; STS, sarcome des tissus mous.

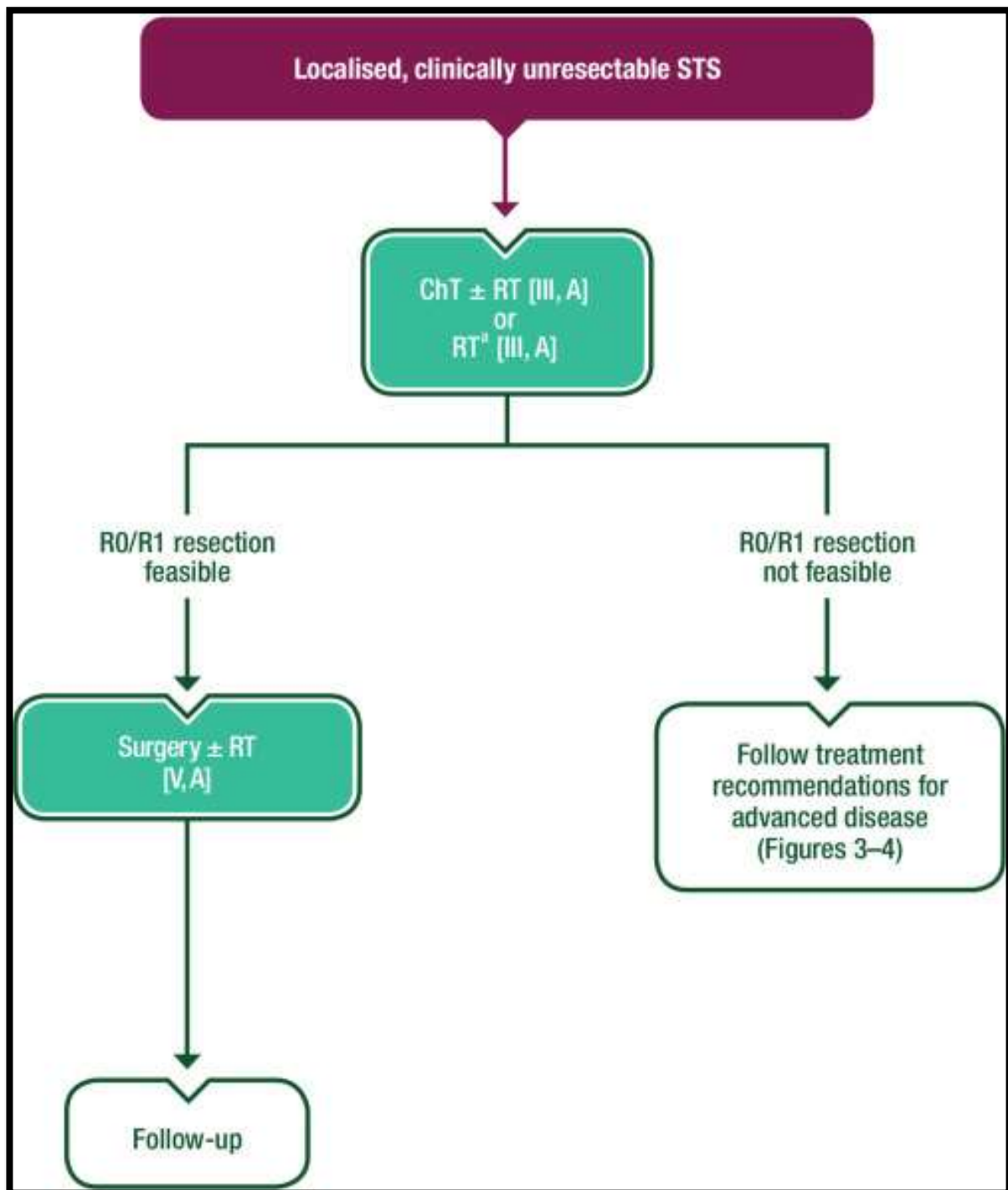


Figure 61 : Prise en charge des STS localisés et cliniquement non résécables.

^aOptionnel: perfusion de membre isolé dans certains cas. ChT, chimiothérapie; RT, radiothérapie; STS, sarcome des tissus mous.

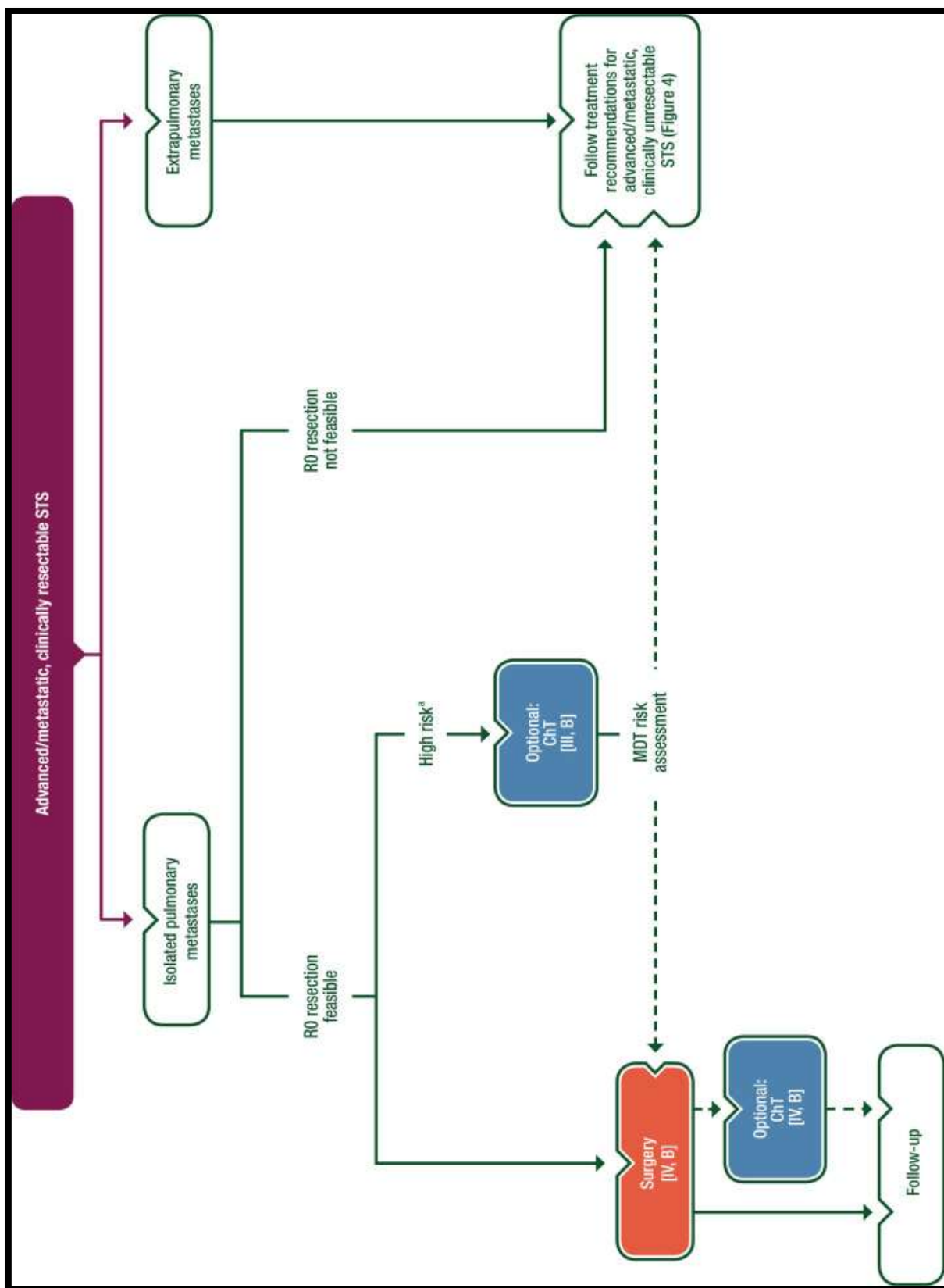


Figure 62 : Prise en charge du STS avancé / métastatique, cliniquement résecable. ^aMétastases pulmonaires synchrones et / ou multiples et / ou bilatérales. ChT, chimiothérapie; MDT, équipe multidisciplinaire; STS, sarcome des tissus mous.

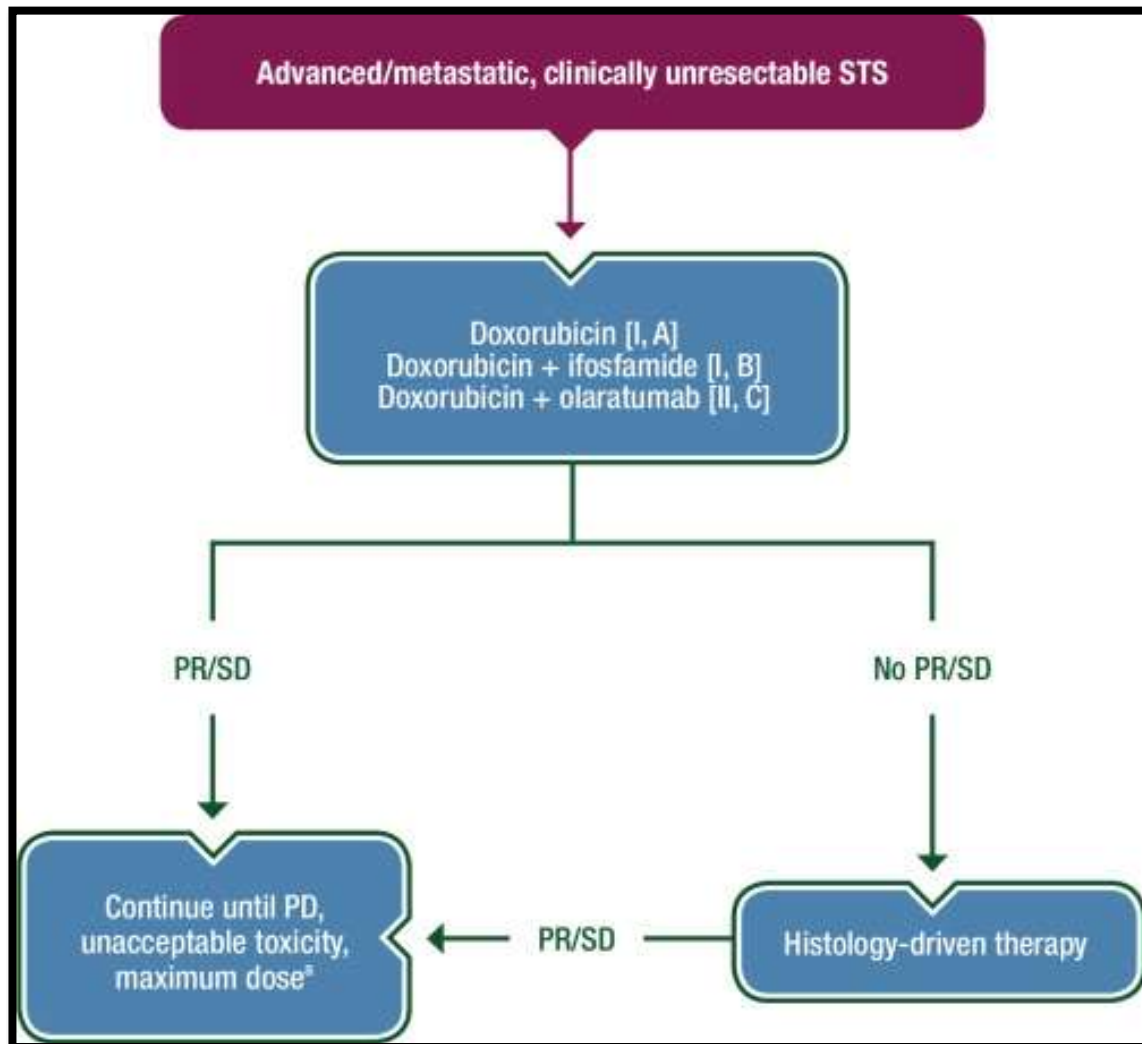


Figure 63 : Prise en charge du STS avancé / métastatique, cliniquement non résécable. *Olaratumab (s'il est utilisé) à maintenir en monothérapie après avoir atteint la toxicité limitant la dose de la doxorubicine. PD, maladie progressive; PR, réponse partielle; SD, maladie stable; STS, sarcome des tissus mous.

CONCLUSION

En pratique diagnostique de routine, la biologie moléculaire est utile et parfois indispensable pour distinguer une tumeur bénigne d'un sarcome, pour identifier un type spécifique de sarcome mais aussi pour affirmer un diagnostic face à des formes cliniques et histologiques inhabituelles.

Le recours à la biologie moléculaire de manière systématique est indiqué face à tout sarcome suspect de présenter une anomalie moléculaire spécifique (essentiellement les sarcomes constitués de cellules monomorphes) et/ou pour lequel le diagnostic est incertain. Cette stratégie permet d'améliorer la qualité diagnostique et, de ce fait, la prise en charge des patients.

D'autre part, la prise en charge des patients avec des sarcomes des tissus mous est actuellement bien encadrée et doit être conforme aux dernières recommandations de bonne pratique clinique, et qui se résume en une prise en charge multidisciplinaire dans un centre spécialisé, de niveau tertiaire.

Notre étude a montré que la prise en charge multidisciplinaire de ces patients améliore nettement la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans métastase ainsi que le risque de rechute locale.

RESUME

Introduction: Les sarcomes des tissus mous sont des tumeurs malignes nécessitant une prise en charge dans des centres spécialisés. Notre étude a pour but d'évaluer l'intérêt de la réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) sur la prise en charge de ces tumeurs et de démontrer la place de la biologie moléculaire la prise en charge des sarcomes des parties molles.

Objectif principal : Evaluer l'intérêt de la FISH dans la prise en charge des sarcomes des parties molles.

Objectifs secondaires :

- Analyser les aspects épidémiologiques des sarcomes des parties molles.
- Analyser les aspects anatomopathologiques et les différents sous types histologiques des sarcomes des parties molles.
- Evaluer la place de la réunion de concertation pluridisciplinaire et son impact sur la prise en charge des sarcomes des parties molles.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude prospective, réalisée au centre hospitalier universitaire HASSAN II de Fès, sur une période de 28 mois, et dans le cadre d'un projet de recherche.

Tous les dossiers des patients inclus de novo ont été discutés en réunion de concertation multidisciplinaire.

L'analyse anatomopathologique a été effectuée sur des lames colorées par HES (hématoxyline-éosine-safran). On a complété notre procédure de diagnostic par une étude immunohistochimique, puis par une étude par FISH (fluorescence in situ hybridization), devant des sarcomes à cellules rondes, des sarcomes à cellules fusiformes , des néoplasies myxoïdes ou des néoplasies adipocytaires, en utilisant des

sondes BREAK-APART Vysis, pour analyser les gènes MDM2, SS18 et EWS. L'analyse de survie était réalisée pour deux groupes, avec prise en charge multidisciplinaire et sans discussion en RC" P.

Résultats : 105 cas de sarcomes des parties molles ont été retenus, la moyenne d'âge était de 49 ans. Le membre inférieur est le siège le plus fréquent (74%) avec une localisation profonde dans 92,8% des cas. 85% ont bénéficié d'une biopsie préalable. 88% ont bénéficié d'une IRM préalable. 56 patients ont été opérés, avec une résection R0 chez 34 patients, R1 chez 16 patients et R2 chez 6 patients. Les liposarcomes étaient les plus fréquents (37.2%), suivi des synovialosarcomes (13,4%), des sarcomes inclassés (13.3%) des léiomyosarcomes (11.4%) et des sarcomes d'Ewing (8.6%).

Parmi les patients inclus, 57% ont bénéficié d'une étude par FISH. Toutes les tumeurs lipomateuses atypiques et les liposarcomes dédifférenciés étaient positifs et avaient une amplification du gène MDM2, alors que tous les lipomes étaient négatifs. Tous les synovialosarcomes monophasiques étaient positifs et avaient un réarrangement du gène SS18. Parmi les sarcomes à cellules rondes, 96% des sarcomes d'EWING avaient des réarrangements EWS. L'étude par FISH était jugée nécessaire chez 61,3% des cas, et utile chez 38,7% des cas.

Le traitement néo-adjuvant par chimiothérapie a été indiqué chez 30 patients. Le traitement adjuvant par chimiothérapie et/ou radiothérapie a été indiqué chez 22 patients. Le taux de survie globale était de 15,19 mois, avec une amélioration significative de la survie chez les patients dont la prise en charge était multidisciplinaire.

Conclusion :

Les données de notre étude sont comparables à celles de la littérature, concernant l'intérêt de la prise en charge multidisciplinaire des sarcomes des tissus mous sur le pronostic et la survie de ces patients.

Pour la certitude diagnostique, la FISH reste un moyen incontournable pour la certitude diagnostique et vu les implications thérapeutiques.

REFERENCES

- [1]. NCa, Agence technique de l'information sur l'Hospitalisation (ATIH), Francim, Institut de veille sanitaire (InVS), l'Association pour la recherche sur le cancer (ARC), la Ligne nationale contre le cancer, et al. La situation du cancer en France en 2010 collection rapports et synthèses. Boulogne-Billancourt: Ouvrage collectif édité par l'INCa; 2010: 193—5.
- [2]. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn CW, Mertens F. WorldHealth Organization. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press; 2013.
- [3]. La situation du cancer en France en 2010 collection rapportset synthèses; 2010. p. 193—5.
- [4]. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Globalcancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69—90.
- [5]. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: principles andpractice of oncology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins; 2001. p. 1841—91.
- [6]. Ray-Coquard I, Montesco MC, Coindre JM, et al. (2012) Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. Ann Oncol 23: 2442-9
- [7]. Stoeckle E, Coindre JM, Kind M, et al. (2009) Evaluating surgery quality in soft tissue sarcoma. Recent Results Cancer Res 179: 229-42
- [8]. Bonvalot S, Rivoire M, Castaing M, et al. (2009) Primary retroperitoneal sarcomas: a multivariate analysis of surgical factors associated with local control. J Clin Oncol 27: 31-7

- [9]. Derbel O, Heudel PE, Cropet C, et al. (2016) Survival impact of centralization and clinical guidelines for soft tissue sarcoma (a prospective and exhaustive population-based cohort). Accepted PLoS One
- [10]. Rossi CR, Vecchiato A, Mastrangelo G, et al. (2013) Adherence to treatment guidelines for primary sarcomas affects patient survival: a side study of the European Connective Tissue Cancer Network (CONTICANET). *Ann Oncol* 24: 1685–91
- [11]. Demicco EG. Sarcoma diagnosis in the age of molecular patho–logy. *Adv Anat Pathol* 2013;20:264—74.
- [12]. Guseva NV, Tanas MR, Stence AA, Sompallae R, Schade JC, Bossler AD, Bellizzi AM, Ma D. The NAB2–STAT6 gene fusion in solitary fibrous tumor can be reliably detected by anchored multiplexed PCR for targeted next generation sequencing. *Cancer Genet* 2016 Jul–Aug;209(7e8):303e12.
- [13]. Mertens F, Antonescu CR, Hohenberger P, Ladanyi M, Modena P, D'Incalci M, Casali PG, Aglietta M, Alvegård T. Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol* 2009 Aug;36(4):312e23.
- [14]. Miura Y, Keira Y, Ogino J, Nakanishi K, Noguchi H, Inoue T, Hasegawa T. Detection of specific genetic abnormalities by fluorescence in situ hybridization in soft tissue tumors. *Pathol Int* 2012 Jan;62(1):16e27.
- [15]. Sugita S, Hasegawa T, Practical use and utility of fluorescence in situ hybridization in the pathological diagnosis of soft tissue and bone tumors, *Journal of Orthopaedic Science* (2017).
- [16]. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma. *CR Seances Acad Sci III* 1983 ; 296 : 1105–7.

- [17]. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G. Chromosomal translocation (11;22) in cell of Ewing's sarcoma. CR Seances Acad Sci III 1983: 1101-3.
- [18]. Riggi N, Cironi L, Suvà ML, Stamencovic I. Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins Part 1: the fellowship of TET. J Pathol 2007 ; 213 : 4-20.
- [19]. Suvà ML, Cironi L, Riggi N, Stamencovic I. Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins. Part 2: TET-independent fusion proteins and receptor tyrosine-kinase mutations. J Pathol 2007 ; 213 : 117-30.
- [20]. Coindre JM. Biologie moléculaire des sarcomes [Molecular biology of soft-tissue sarcomas]. *Bull Cancer*. 2010;97(11):1337-1345.
- [21]. Noguchi H, Mitsuhashi T, Seki K, Tochigi N, Tsuji M, Shimoda T, Hasegawa T. Fluorescence in situ hybridization analysis of extraskeletal myxoid chondrosarcomas using EWSR1 and NR4A3 probes. Hum Pathol 2010 Mar;41(3): 336e42.
- [22]. Nakayama R, Miura Y, Ogino J, Susa M, Watanabe I, Horiuchi K, Anazawa U, Toyama Y, Morioka H, Mukai M, Hasegawa T. Detection of HEY1-NCOA2 fusion by fluorescence in-situ hybridization in formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a possible diagnostic tool for mesenchymal chondrosarcoma. Pathol Int 2012 Dec;62(12):823e6.
- [23]. Coindre JM, Pédeutour F, Aurias A. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. Virchows Arch 2010 ; 456 : 167-79.
- [24]. Mariani O, Brennetot C, Coindre JM, Ganem C, Gruel N, Delattre O, et al. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. Cancer Cell 2007 ; 11 : 361-74.

- [25]. Park JK, Sugita S, Soma T, Yamashiro K, Hasegawa T. Malignant peripheral nerve sheath tumor coexisting with congenital melanocytic nevus in an elderly man. *Pathol Int* 2016 May;66(5):309e10.
- [26]. Nabeshima K, Matsumoto S, Hamasaki M, Hida T, Kamei T, Hiroshima K, Tsujimura T, Kawahara K. Use of p16 FISH for differential diagnosis of mesothelioma in smear preparations. *Diagn Cytopathol* 2016 Sep;44(9):774e80.
- [27]. Matsumura T, Yamaguchi T, Seki K, Shimoda T, Wada T, Yamashita T, Hasegawa T. Advantage of FISH analysis using FKHR probes for an adjunct to diagnosis of rhabdomyosarcomas. *Virchows Arch* 2008 Mar;452(3):251e8.
- [28]. Guillou L, Aurias A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch* 2010 ; 456 : 201–17.
- [29]. J-M. Coindre. Biologie moléculaire des sarcomes. *Bull Cancer* vol. 97. N° 11. novembre 2010 ; 1337–1345.
- [30]. Le Guellec, S. Biologie moléculaire dans le diagnostic des tumeurs des tissus mous et de l'os et apport au pronostic des sarcomes. *Oncologie* 18, 201–210 (2016).
- [31]. Neuville A, et al. Biologie moléculaire en pathologie des tissus mous : utile ou nécessaire ? *Annales de pathologie* (2014).
- [32]. Foulkes WD, Clarke BA, Hasselblatt M, Majewski J, Albrecht S, McCluggage WG. No small surprise – small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type, is a malignant rhabdoid tumour. *JPathol* 2014;233:209–14.

- [33]. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, et al. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2010;28:2151—8.
- [34]. Zhang H, Erickson-Johnson M, Wang X, et al. (2010) Molecular testing for lipomatous tumors: critical analysis and test recommendations based on the analysis of 405 extremity-based tumors. *Am J Surg Pathol* 34: 1304–11.
- [35]. Guo T, Zhang L, Chang NE, et al. (2011) Consistent MYC and FLT4 gene amplification in radiation-induced angiosarcoma but not in other radiation-associated atypical vascular lesions. *Genes Chromosomes Cancer* 50:25–33.
- [36]. Le Guellec S, Chibon F, Ouali M, et al. (2014) Are peripheral purely undifferentiated pleomorphic sarcomas with MDM2 amplification dedifferentiated liposarcomas? *Am J Surg Pathol* 38: 293–304.
- [37]. Bui MM, Pantanowitz L (eds): *Modern Techniques in Cytopathology*. Monogr Clin Cytol. Basel, Karger, 2020, vol 25, pp 19–33
- [38]. Neuville A, Ranchère-Vince D, Dei Tos AP, Hostein I, Toffolatti L, Chibon F, et al. Impact of molecular analysis on the final sarcoma diagnosis. A study on 763 cases collected during a European epidemiological study. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1259—68.
- [39]. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 3): iii102–iii112.
- [40]. von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS et al. Soft tissue sarcoma, version 2.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016; 14: 758–786.

- [41]. Dangoor A, Seddon B, Gerrand C et al. UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. Clin Sarcoma Res 2016; 6: 20–25.
- [42]. Ray-Coquard I, Montesco MC, Coindre JM, et al. (2012) Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. Ann Oncol 23: 2442–9
- [43]. Qureshi YA, Huddy JR, Miller JD, et al. (2012) Unplanned excision of soft tissue sarcoma results in increased rates of local recurrence despite full further oncological treatment. Ann Surg Oncol 19: 871–7
- [44]. Stoeckle E, Coindre JM, Kind M, et al. (2009) Evaluating surgery quality in soft tissue sarcoma. Recent Results Cancer Res 179: 229–42
- [45]. Bonvalot S, Rivoire M, Castaing M, et al. (2009) Primary retroperitoneal sarcomas: a multivariate analysis of surgical factors associated with local control. J Clin Oncol 27: 31–7
- [46]. Fayette J, Blay JY, Ray-Coquard I. Les sarcomes des tissus mous: bonnes pratiques médicales pour une prise en charge optimale ; Cancer Radiother. 2006 Feb–Mar;10(1–2):3–6
- [47]. Ray-Coquard I, Thiesse P, Ranchère-Vince D, Chauvin F, Bobin J–Y, Sunyach M–P, et al. Conformity to clinical practice guide–lines, multidisciplinary management and outcome of treatment for soft tissue sarcomas. Ann Oncol 2004;15(2):307–15.
- [48]. Haddad J, et al. Évaluation de la prise en charge des sarcomes des tissus mous en Franche–Comté depuis l'instauration d'une réunion de concertation pluridisciplinaire au CHRU. À propos de 47 cas. Ann Chir Plast Esthet (2016).

- [49]. Peabody TD, Monson D, Montag A, Schell MJ, Finn H, Simon MA. A comparaison of the prognosis for deep and subcutaneous sarcomas of the extremities. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76(8):1167—73.
- [50]. Rydholm A, Berg NO. Size, site and clinical incidence of lipoma. Factors in the differential diagnosis of lipoma and sarcoma. *Acta Orthop Scand* 1983;54(6):929—34.
- [51]. Perrier L, Buja A, Mastrangelo G, et al. (2012) Clinicians' adherence versus non adherence to practice guidelines in the management of patients with sarcoma: a cost-effectiveness assessment in two European regions. *BMC Health Serv Res* 12: 82
- [52]. Rossi CR, Vecchiato A, Mastrangelo G, et al. (2013) Adherence to treatment guidelines for primary sarcomas affects patient survival: a side study of the European CONnective Tissue Cancer NETwork (CONTICANET). *Ann Oncol* 24: 1685–91
- [53]. Lurkin A, Ducimetière F, Vince DR, et al. (2010) Epidemiological evaluation of concordance between initial diagnosis and central pathology review in a comprehensive and prospective series of sarcoma patients in the Rhone-Alpes region. *BMC Cancer* 10: 150
- [54]. Morosi C, Stacchiotti S, Marchianò A, et al. (2014) Correlation between radiological assessment and histopathological diagnosis in retroperitoneal tumors: analysis of 291 consecutive patients at a tertiary reference sarcoma center. *Eur J Surg Oncol* 40: 1662–70
- [55]. Stoeckle E, Coindre JM, Kind M, et al. (2009) Evaluating surgery quality in soft tissue sarcoma. *Recent Results Cancer Res* 179: 229–42

- [56]. Wardelmann E, Haas RL, Bovée JV, et al. (2015) Evaluation of response after neoadjuvant treatment in soft tissue sarcomas; the European Organization for Research and Treatment of Cancer–Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC–STBSG) recommendations for pathological examination and reporting. Eur J Cancer 153: 84–95
- [57]. Fletcher C, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO Classification of tumours of soft tissue and bone. IARC Press, Lyon; 2013.
- [58]. Genet J, et al. Évaluation et impact du respect du référentiel ESMO sur la prise en charge des lésions des tissus mous, étude menée au centre de référence de Lorraine. Ann Chir Plast Esthet (2018).
- [59]. Casali PG, et al; ESMO Guidelines Committee and EURACAN. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018 Oct 1;29(Suppl 4):iv268–iv269.