



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>6</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>10</b>
I. Les sarcomes .....	11
1. Généralités sur les sarcomes .....	11
2. Epidémiologie .....	13
Facteurs étiologiques .....	14
➤ Irradiation .....	14
➤ Facteurs génétiques .....	14
➤ Autres facteurs .....	15
3. Différents types de sarcomes .....	15
➤ Classification histologique selon l’OMS .....	16
• Grade histologique de la FNCLCC.....	18
• Stade TNM de l’AJCC et UICC .....	19
➤ Classification histo-moléculaire .....	22
II. Sarcome d’Ewing .....	24
1. Particularités épidémiologiques et historiques .....	24
2. Rappel anatomique des tissus mous .....	29
3. Clinique .....	32
4. Radiologie .....	34
5. Anatomopathologie .....	37
a. Examen macroscopique :.....	39
b. Examen microscopique : .....	39
6. Les limites de l’histologie et de l’immunohistochimie .....	41
7. Biologie moléculaire : intérêt et nouveautés .....	44
a. Impact diagnostique de la biologie moléculaire .....	44

b. Les techniques de pointe identifiant les anomalies caractéristiques des sarcomes .....	45
c. Indications de la biologie moléculaire.....	48
d. La biologie moléculaire dans les sarcomes d'Ewing .....	49
8. Traitement et Pronostic .....	53
a.Chirurgie.....	53
b.Chimiothérapie.....	56
c.Radiothérapie .....	59
➤ Protocoles Euro-Ewing 99 .....	63
d.Pronostic.....	67
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>72</b>
I. Matériel :.....	73
II. Méthodes : .....	73
1. Fiche d'exploitation : .....	73
2. Etude macroscopique : .....	73
3. Histologie .....	74
✓ Fixation .....	74
✓ Imprégnation et inclusion : .....	75
✓ Coupes et colorations : .....	76
4. Immunohistochimie : .....	78
5. Cytogénétique moléculaire : hybridation in situ fluorescente (FISH) ...	80
✓ Principe général et caractérisation des sondes.....	80
✓ Protocole standard de la technique FISH.....	82
6. Biologie moléculaire .....	84
✓ RT-PCR .....	84
✓ Réaction de polymérisation en chaine (PCR) .....	85

III. Analyse statistique : .....	86
<b>RESULTATS .....</b>	<b>87</b>
1. Répartition selon l'âge .....	88
2. Répartition selon le sexe .....	89
3. Répartition selon la localisation .....	89
4. Répartition selon le résultat anatomopathologique.....	90
5. Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine CD-99 .....	91
6. Répartition du diagnostic PNET/EWING selon la technique FISH .....	92
7. Sensibilité et spécificité de la FISH par rapport au diagnostic histologique .....	93
8. Sensibilité et spécificité de la FISH par rapport à l'immunoréactivité de la CD99 .....	94
9. Répartition selon le transcrite de fusion par biologie moléculaire (RT-PCR) .....	94
10. Répartition selon la durée du suivi .....	96
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>108</b>
<b>RESUMES.....</b>	<b>110</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>117</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

CCG	: Childhood Cancer Group
CGH	: Hybridation génomique comparative
DFSP	: Dermatofibrosarcoma protuberans
DSRCT	: Desmoplastic small round cell tumor
ESMO	: European society for medical oncology
FISH	: Hybridation in situ fluorescente
GCT	: Giant cell tumor
IMT	: Inflammatory myofibroblastic tumor
IPP	: Irradiation bi-pulmonaire prophylactique
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PCR	: Réaction de polymérisation en chaine
PNET	: Tumeur neuro-ectodermique primitive
POG	: Pediatric Oncology Group
SARC	: Sarcoma Alliance for Research through Collaboration
SE	: Sarcome d'Ewing
SEPM	: Sarcome d'Ewing des parties molles
SPM	: Sarcomes parties molles
TEP	: tomographie par émission de positrons
TNF	: Tumor Necrosis Factor
VPN	: Valeur prédictive négative
VPP	: Valeur prédictive positive

# INTRODUCTION

## GENERALE

Les tumeurs de la famille d'Ewing ou tumeurs neuro ectodermiques primitives sont des sarcomes agressifs majoritairement osseux mais survenant également au niveau des tissus mous, qui présentent des caractéristiques communes :

- Morphologique sous la forme de tumeurs à cellules rondes basophiles avec ou sans rosettes.
- Immunophénotypique avec une positivité membranaire du CD99 malgré la non spécificité de cet anticorps.
- Génétique avec présence d'une translocation impliquant les gènes EWS et FLI1 dans environ 90% des cas. Cette translocation peut être détectée soit en cytogénétique ou en biologie moléculaires.

A la suite de ces définitions, on retrouve donc sur le versant le plus indifférencié, le sarcome d'Ewing osseux ou des parties molles, exprimant peu ou pas l'immunophénotype neuro ectodermique, et sur le versant le plus différencié, le neuro épithélium périphérique l'exprimant fortement.

Le sarcome d'Ewing des parties molles (SEPM) ou le sarcome d'Ewing extra osseux a été décrit pour la première fois par Tefft et al (1969). C'est une tumeur primitive maligne à fort potentiel métastatique qui touche préférentiellement l'adulte jeune avec une légère prédominance masculine.

Le sarcome d'Ewing des parties molles prend naissance au niveau des tissus de soutien non osseux. Son siège est variable, mais il est surtout retrouvé au niveau de la région para vertébrale, de la paroi thoracique et des extrémités.

Les signes d'appel cliniques sont peu spécifiques : douleur ou tuméfaction à croissance rapide. La douleur ne survient que dans un tiers des cas, elle est secondaire à une atteinte des nerfs périphériques ou de la moelle avec possibilité de troubles moteurs et sensitifs, elle peut également être secondaire à une hémorragie intra tumorale. La tuméfaction est une lésion à croissance rapide qui mesure environ 5 à



10 cm au moment du diagnostic. Plus rarement, il peut s'agir d'un tableau fébrile ou d'une altération de l'état général.

En imagerie, les lésions ne sont pas spécifiques. L'IRM est l'examen clé. Elle objective une tumeur bien limitée avec un aspect en pseudo capsule, polylobée, parfois très volumineuse en hyposignal T1, hypersignal T2.

Vu la non spécificité des signes cliniques et radiologiques, le diagnostic reste tributaire de l'examen anatomopathologique complété par la cytogénétique et la biologie moléculaire.

L'aspect anatomopathologique rapproche le sarcome d'Ewing des tumeurs neuro ectodermiques primitives (PNET). Certains anatomopathologistes les considèrent comme une entité tumorale unique, pour d'autres, il s'agit d'une évolution tumorale différente d'une même cellule.

L'immunohistochimie permet, grâce à l'utilisation de marqueurs cellulaires de différenciation, d'antigène de membrane, de distinguer le sarcome d'Ewing des autres tumeurs malignes à petites cellules rondes. En effet, le CD99 est exprimé dans 85 % des sarcomes d'Ewing et des tumeurs du groupe des TNEP. Toutefois, cet anticorps n'est pas spécifique, il est exprimé dans d'autres tumeurs à cellules rondes.

La FISH est une nouvelle technique moléculaire, dont la spécificité est plus importante que le test d'immunohistochimie, elle permet de déterminer la cassure chromosomique du gène EWSR1 du chromosome 22, qui est en faveur d'un sarcome d'Ewing dans 85 à 90 % des cas. Par ailleurs, la recherche des transcrits de fusion EWS-Fli1 par RT-PCR sert non seulement dans la confirmation de la positivité de la FISH pour le diagnostic du sarcome d'Ewing, mais aussi au diagnostic d'extension métastatique par l'analyse des prélèvements de moelle osseuse et pour l'évaluation du pronostic des malades.

La chirurgie est la base du traitement du SEPM. Le but du traitement chirurgical est d'obtenir une exérèse complète de la tumeur, tout en conservant le plus possible la fonction du membre atteint. La qualité de l'exérèse initiale a un rôle important dans le devenir du patient à la fois sur le plan des récurrences locales et des métastases. La radiothérapie et la chimiothérapie sont introduites dans l'arsenal thérapeutique pour améliorer le contrôle locorégional, et réduire la diffusion métastatique, et par conséquent, améliorer la survie globale. Dans le même sens, une nouvelle ère d'immunothérapie et de thérapie ciblée basée sur la détection des transcrits de fusion recherchés par biologie moléculaire donne l'espoir à ces pathologies rares.

Le but de notre travail est de montrer l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des sarcomes d'Ewing extra-osseux. Une évaluation de la sensibilité et de la spécificité du test moléculaire « FISH » a été réalisée par rapport à l'histologie et l'immunohistochimie qui sont considérées comme tests de routine pour le diagnostic de ces tumeurs. La connaissance des anomalies moléculaires des sarcomes d'Ewing, notamment les transcrits de fusion, a réellement révolutionné l'approche de ces tumeurs que ce soit sur le plan du diagnostic, pronostic ou de la prise en charge thérapeutique. Ce qui nous a poussé à déterminer les différents transcrits de fusion des patients de l'étude.

# ETUDE

# BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. Les sarcomes**

### **1. Généralités sur les sarcomes**

Les sarcomes sont des tumeurs malignes rares qui représentent 1 à 2% des cancers de l'adulte. Ces tumeurs se développent à partir des tissus qui recouvrent le squelette des membres. Ces tissus sont représentés par le tissu conjonctif commun et ses variétés spécialisées, qui sont :

- Le tissu adipeux ;
- Le tissu musculaire strié et lisse ;
- Le tissu vasculaire ;
- Le tissu synovial et aponévrotique ;
- Le tissu des enveloppes des nerfs périphériques. (Mustapha Mahfoud 2009)  
(Fletcher CDM, Bridge JA et al 2013)

Les tumeurs sarcomateuses sont le plus souvent localisées au niveau des tissus mous à un pourcentage d'environ 60% des cas, mais peuvent également être localisées au niveau des viscères ou des os. La répartition des sarcomes des tissus mous est très large du moment qu'ils affectent le tissu mésenchymateux, se retrouvant ainsi au niveau de tout le corps.

A peu près, les 3/4 des sarcomes sont profonds, situés sous l'aponévrose superficielle (S.Heymann, G.M.Jung et al 2007). Selon Chang et Sandak près de 60% des sarcomes des tissus mous siègent au niveau des extrémités, par ordre de fréquence décroissante, ils intéressent :

- les MI « 50% surtout la cuisse »,
- les régions profondes du tronc « médiastin, retro-péritoine 20% »,
- les MS « 15% »,
- la paroi du tronc « 10% »,
- tête -cou « 5% » (Bonvalot S, Vanel et al 2004) (Jong Hoon Park, Chang HO Kang et al 2010)

Les sarcomes des tissus mous constituent un groupe très hétérogène avec plus de 100 types et sous-types histologiques différents qui ont été décrits (Fayette J, J-Y. Blay 2005) selon la nouvelle classification de l'OMS (2013). La variabilité des types et sous types histologiques explique les problèmes quotidiens de diagnostic et les discordances inter observateurs.

La difficulté diagnostic de ces sarcomes est due d'une part à leur rareté et d'autre part au polymorphisme du syndrome tumoral. La compréhension de la genèse et l'évolution naturelle des cancers objectivant la détermination des facteurs oncogènes responsables de la maladie semble être très importante dans le domaine des sarcomes, vu leur rareté et leur variation phénotypique.

Des progrès récents sont survenus dans ce domaine avec une meilleure connaissance des anomalies moléculaires des sarcomes, l'utilisation de thérapies ciblées et l'organisation en réseau pour le diagnostic.

La classification internationale de l'organisation mondiale de la santé OMS (2013) repose sur la mise en évidence d'une ligne de différenciation phénotypique révélée par l'étude histologique, immuno-histochimique et particulièrement la présence d'anomalies génétiques spécifiques. Ainsi, il a été établi que les sarcomes les plus fréquents sont les liposarcomes suivi des sarcomes pléomorphes (M.Bui, Nguyen Binh et al 2006) (F.Collin, M.Gelly-Marty et al 2006). Les sarcomes d'Ewing des parties molles sont des tumeurs rares qui constituent moins de 1% des tumeurs sarcomateuses.

La description en 1983 par Alain Aurias d'une translocation réciproque dans le sarcome d'Ewing a été la première anomalie moléculaire spécifique décrite dans une tumeur solide humaine. Cette translocation spécifique a ensuite conduit à la description des gènes partenaires intervenant et à une meilleure compréhension de cette tumeur. Cette anomalie génétique spécifique constitue actuellement le critère majeur de définition du sarcome d'Ewing.

En ce qui concerne le traitement de ces tumeurs, c'est l'acte chirurgical qui est considéré jusqu'au jour d'aujourd'hui la base du traitement curatif des sarcomes des tissus mous. Le but du traitement est d'obtenir une exérèse complète de la tumeur, tout en conservant le plus possible la fonction du membre atteint. La place de la radiothérapie et de la chimiothérapie n'est pas encore codifiée et n'améliore pas la survie globale.

Les sarcomes des tissus mous ont un pronostic sombre, leur prise en charge ne peut se concevoir en dehors d'une concertation pluridisciplinaire.

## **2. Epidémiologie**

Les sarcomes des parties molles sont des tumeurs malignes rares et représentent moins de 1% de tous les cancers (Fayette J, J-Y.blay 2005). Dans la population hospitalière, Etzinger et Weiss avancent la proportion approximative de 100 lésions bénignes pour une lésion maligne (Babin SR, Simon.P et al 1999)

Suivant les séries, la répartition des sarcomes selon le sexe est plus ou moins équilibrée, ou montre une légère prédominance masculine (Bonvalot S, Vanel et al 2004)

Selon Suit, 68% des sarcomes des parties molles surviennent après la troisième décennie (Fayette J, J-Y.blay 2005) (F.Collin, M.Gelly-Marty et al 2006) (Bonvalot S, Vanel et al 2004). Néanmoins il existe des variations de répartition des types histologiques des sarcomes des tissus mous en fonction de l'âge (Fayette J, J-Y.blay 2005)

### **Facteurs étiologiques**

Le mécanisme de la genèse des sarcomes des tissus mous ne sont pas encore bien élucidés. Toutefois, certains facteurs favorisants sont connus et d'autres sont suspectés (Van der Woude HJ, Vanderschueren G 1999). Le rôle exact d'un facteur précis est difficile à déterminer en raison de la rareté des sarcomes, du grand temps

de latence entre l'exposition à ce facteur et la survenue de la tumeur, l'intrication possible de différents facteurs environnementaux et enfin la prédisposition génétique à développer un sarcome. L'ensemble de ces facteurs seront décrits et détaillés ci-dessous :

➤ Irradiation

Environ 0,1% des patients ayant bénéficié d'une radiothérapie curative pour une tumeur maligne et ayant survécu plus de 5ans, développent en zone irradiée un sarcome des os ou des tissus mous (Eleuqc, Penel N et al 2004). Le point commun de ces sarcomes est la forte agressivité de la tumeur associée à un mauvais pronostic.

➤ Facteurs génétiques

La large majorité des sarcomes apparait de façon sporadique (Eleuqc, Penel N et al 2004) (E.Stoekle, J.M.Coindre et al 2007), mais différentes maladies génétiques sont associées au développement d'un sarcome :

- **Dans la neurofibromatose de type I ou la maladie de Von-Recklinghausen** qui est : Une maladie autosomique dominante, 1 à 5% des patients présentent des sarcomes des gaines des nerfs périphériques correspondant à la dégénérescence maligne des neurofibromes préexistants. Le gène NF1, localisé sur le chromosome 17 est considéré comme un gène suppresseur de la tumeur qui interviendrait dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. (Pinson S, Wolkersteinp 2005) (Burningham Z, Mia H et al 2012)
- **Le syndrome de li-Fraumeni** (M.Bui, Nguyen Binh et al 2006) (Robert J Canter, Shannon Beal et al 2010) (F.Lintz, A.Moreau et al 2009) Est un syndrome familial rare qui comporte une fréquence élevée de tumeur maligne chez des sujets jeunes, intéressant les tissus mous ainsi que les os. Ce syndrome est associé à des modifications germinales et à des altérations acquises du gène suppresseur des tumeurs : P53.

- **La mutation du gène Rb-1** (Robert J Canter, Shannon Beal et al 2010) (F.Lintz, A.Moreau et al 2009) Est responsable du rétinoblastome héréditaire bilatéral, peut s'accompagner de la survenue ultérieure d'un sarcome des tissus mous.

➤ Autres facteurs

Certains facteurs sont fréquemment ou plus épisodiquement évoqués (F.Lintz, A.Moreau et al 2009) :

- Les traumatismes, souvent mentionnés par les patients ou leur entourage, semblent essentiellement révélateurs. Ils ont exceptionnellement fait la preuve de leur responsabilité directe.
- Des produits chimiques, dont la Dioxine qui est à l'origine d'une plus grande incidence des sarcomes des tissus mous dans certaines catégories professionnelles (agriculteurs, forestiers..) sans que des preuves formelles aient été retenues.
- Le rôle de certains virus, Cytomégalo virus et human herpes virus HHV8 sont suspectés dans la survenue du sarcome de KAPOSÍ.

### **3. Différents types de sarcomes**

Une classification adéquate des sarcomes des tissus mous est impérative pour la prise en charge. Elle permet d'établir le bilan diagnostique, topographique et pronostique sur la base duquel le plan thérapeutique peut être défini.

La classification des sarcomes des tissus mous se base donc sur un ensemble d'éléments qui prend en compte, outre le recueil d'informations cliniques générales comme l'âge et la localisation de la tumeur primitive, 4 facteurs :

- L'analyse descriptive histologique rapportée selon les termes de la dernière classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ;



- L'analyse moléculaire complémentaire à l'histologie est nécessaire en cas d'existence d'anomalie caractéristique d'un type de sarcome ;
- L'analyse de l'agressivité tumorale évaluée par le grade histologique de la fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) ;
- L'évaluation de l'extension tumorale résumée par le stade TNM de l'American Joint Cancer Committee (AJCC) et de l'Union internationale contre le cancer (UICC).

a. **Classification histologique selon l'OMS**

La classification histologique de référence des sarcomes des tissus mous est celle de l'OMS qui a été mise à jour en 2013 (Fletcher CDM, Bridge JA et al 2013). Elle répertorie les tumeurs bénignes et malignes des tissus mous en 12 grandes classes, secondairement subdivisées en 113 sous-types histologiques. Cette classification est analogique : elle se base non pas sur une tentative d'identification du tissu d'origine de la tumeur mais sur l'identification de la ligne de différenciation (adipeuse, musculaire lisse, musculaire striée, cartilagineuse...) que la tumeur a prise, c'est-à-dire en d'autres termes sur l'aspect du tissu normal auquel la tumeur ressemble le plus. Cette classification repose sur des arguments histologiques obtenus en microscopie optique avec un complément d'analyse immunohistochimique.

Pour les sarcomes où aucune ligne de différenciation n'est clairement identifiable, la biologie moléculaire permet de faire le tri car des anomalies moléculaires spécifiques ont été caractérisées dans presque la majorité des sarcomes.

**Tableau 1 : Classification de l'OMS des sarcomes des parties molles**

Ligne de différenciation	Tumeurs à malignité intermédiaire (rarement métastasiées)	Tumeurs malignes
Tumeurs adipeuses	*Tumeur lipomateuse atypique *Liposarcome bien différencié	*Liposarcome dédifférencié *Liposarcome myxoïde *Liposarcome à cellules rondes *Liposarcome pléomorphe *Liposarcome mixte *Liposarcome (sans autre spécification)
Tumeurs fibroblastiques myofibroblastiques	*Tumeur fibreuse solitaire *Hémangiopéricytome *Tumeurs myofibroblastique inflammatoire *Sarcome myélofibroblastique de faible grade *Sarcome fibroblastique myxo-inflammatoire *Fibrosarcome infantile	*Fibrosarcome de type adulte *Myxofibrosarcome *Sarcome fibromyxoïde de faible grade Et tumeur hyalinisante à cellules fusiformes *Fibrosarcome épithélioïde sclérosant
Tumeurs dites fibrohistiocytaires	*Tumeur fibrohistiocytaire plexiforme *Tumeur à cellules géantes des tissus mous	*Sarcome indifférencié pléomorphe (« MFH pléomorphe ») *Sarcome indifférencié pléomorphe à cellules géantes (« MFH à cellules géantes ») *Sarcome indifférencié pléomorphe inflammatoire (« MFH inflammatoire »)
Tumeurs du muscle lisse		*Léiomyosarcome
Tumeurs péricytaires (périvasculaires)		*Tumeur glomique maligne
Tumeurs du muscle strié		*Rhabdomyosarcome embryonnaire (y compris à cellules fusiformes, botryoïde, anaplasique) *Rhabdomyosarcome alvéolaire (y compris solide, anaplasique) *Rhabdomyosarcome pléomorphe
Tumeurs vasculaires	*Hémangioendothéliome rétiforme *Angioendothéliome papillaire  *Hémangioendothéliome composite *Sarcome de kaposi	*Hémangioendothéliome épithélioïde *Angiosarcome
Tumeurs chondro-osseuses		* Chondrosarcome mésoenchymateux * Ostéosarcome extrasquelettique
Tumeurs à différenciation incertaine	*Histicytofibrome angiomatoïde *Tumeur fibromyxoïde ossifiante *Tumeur mixte- myoépithéliome- parachondrome	*Sarcome synovial *Sarcome épithélioïde *Sarcome alvéolaire des parties molles *Sarcome à cellules claires des tissus mous *PNET (tumeur périphérique neuroectodermique) *Tumeur d'Ewing extrasquelettique *Tumeur desmoplastique à cellules rondes *Tumeur rhabdoïde extra-rénale *Mésoenchymome malin *Tumeurs à différenciation périvasculaire épithélioïde ( PECome) *Sarcome intimal

➤ **Grade histologique de la FNCLCC**

A quelques exceptions près, la classification histologique n'apporte pas suffisamment d'informations pour prédire l'évolution clinique de la maladie, à savoir le risque métastatique.

Plusieurs systèmes de grading et de l'agressivité tumorale ont été proposés depuis les travaux de Broders en 1939 (van Unnik J.A., Coindre J.M 1993), mais le plus précis le plus reproductible et le plus prédictif reste le grade de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) décrit en 1984 par Trojani et al .Puisqu'il est corrélé avec la survie et la récurrence.

Ce grade repose sur l'évaluation de la différenciation tumorale, de l'index mitotique et de l'étendue de la nécrose tumorale. A chacun de ces paramètres est attribué un score et la somme de ces scores détermine le grade.

**Tableau 2 : Système de grade histologique de la FNCLCC (Méthode de calcul des grades)**

<b>Différenciation tumorale :</b> <b>Score 1 :</b> sarcomes qui ressemblent à du tissu adulte normal <b>Score 2 :</b> sarcomes pour lesquels le type histologique est certain <b>Score 3 :</b> sarcomes embryonnaires, synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes, sarcome à cellules claires, sarcomes alvéolaires des tissus mous, sarcomes indifférenciés, sarcome pour lesquels le type histologique est incertain
<b>Index mitotique :</b> <b>Score 1 :</b> 0 à 9 mitoses par champ <b>Score 2 :</b> 10 à 19 mitoses par champ <b>Score 3 :</b> 20 mitoses ou plus par champ (un champ mesure 0,1734mm <sup>2</sup> )
<b>Nécrose tumorale :</b> <b>Score 1 :</b> pas de nécrose <b>Score 2 :</b> < 50% de nécrose tumorale <b>Score 3 :</b> > 50% de nécrose tumorale
<b>Grading histologique :</b> <b>Grade 1 :</b> score 2–3 <b>Grade 2 :</b> score 4–5 <b>Grade 3 :</b> score 6–8

**Source :** B. N. Bui et al. Recommandations pour la pratique clinique : Standards, Options, Recommandations 2002 pour la prise en charge des patients adultes atteints de sarcome des tissus mous.

➤ **Stade TNM de l’AJCC et UICC**

Le système de l’American Joint Cancer Committee (AJCC) et de l’Union Internationale Contre le Cancer(UICC), repose sur l’évaluation de la taille et l’extension de la tumeur primitive (T1, T2, T3), l’envahissement des ganglions lymphatiques régionaux (N0, N1), la présence de métastases (M0, M1) et le grade du sarcome (G1, G2, G3).

Il définit 5 stades (I, II, III, IV, V) en fonction du nombre de paramètres de bon ou de mauvais pronostic.

**Tableau 3 : Classification TNM 2010 pour les sarcomes**

T	
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Tumeur primitive non retrouvée
T1	Tumeur <5 cm dans son plus grand diamètre
T1a	Tumeur superficielle
T1b	Tumeur profonde
T2	Tumeur ≥ 5 cm dans son plus grand diamètre
T2a	Tumeur superficielle, qui respecte le fascia superficiel
T2b	Tumeur profonde, qui atteint le fascia superficiel ou s'étend au-delà
N	
N0	Absence de ganglion envahi
N1	Envahissement ganglionnaire
M	
M0	Absence de métastase
M1	Métastase(s) à distance

Stades pronostiques

Stades	T	N	M	G
<b>Stade IA</b>	T1a	N0	M0	G1, Gx
	T1b	N0	M0	
<b>Stade IB</b>	T2a	N0	M0	G1, Gx
	T2b	N0	M0	
<b>Stade IIA</b>	T1a	N0	M0	G2, G3
	T1b	N0	M0	
<b>Stade IIB</b>	T2a	N0	M0	G2
	T2b	N0	M0	
<b>Stade III</b>	T2a	N0	M0	G3
	T2b	N0	M0	G3
	tout T	N1	M0	tout G
<b>Stade IV</b>	tout T	tout N	M1	tout G

## **b. Classification histo-moléculaire**

La classification des sarcomes, initialement basée sur des critères histologiques et immunohistochimiques, comprend maintenant des critères moléculaires pour certaines entités. Depuis l'identification de la translocation du sarcome d'Ewing, de nombreuses anomalies génétiques simples ou complexes ont été décrites dans les sarcomes et sont utilisés au quotidien.

Les sarcomes et les tumeurs bénignes et à malignité intermédiaire des tissus mous comportent deux grandes catégories d'anomalies moléculaires : des anomalies moléculaires simples récurrentes (environ 50% des sarcomes), faciles à détecter et pouvant constituer des marqueurs diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques, et des anomalies moléculaires complexes, non récurrentes.

Les anomalies moléculaires simples sont de quatre ordres (Agnès Neuvillea,b et al 2014) :

- les mutations activatrices (20%),
- les translocations réciproques (15%),
- les amplifications simples (15%) et
- les mutations inactivatrices (1%).

**Les mutations activatrices** sont les plus fréquentes bien que présentes dans un faible nombre de tumeurs : les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), les tumeurs desmoides, les myxomes et les polypes fibroïdes inflammatoires. Par exemple, la recherche de mutation des gènes KIT ou PDGFRa a un faible intérêt diagnostique pour les GIST, la sensibilité et la spécificité de la co-expression immunohistochimique de KIT et DOG1 étant excellente. Leur valeur est avant tout pronostique et thérapeutique.

**Les translocations** concernent le plus grand nombre d'entités, avec actuellement au moins 35 tumeurs pour lesquelles une ou plusieurs translocations ont été décrites. Les sarcomes les plus fréquemment réarrangés sont le dermato-fibrosarcome de Darier et Ferrand, le liposarcome myxoïde, le sarcome d'Ewing et le synovialosarcome.

Les translocations aboutissent à un gène chimérique qui code pour une protéine de fusion spécifique de tumeur qui a un rôle central dans la transformation tumorale. Ces gènes de fusion peuvent correspondre à des facteurs de transcription chimériques (ex : EWS1-FLI1 dans le sarcome d'Ewing), à des protéines de fusion de type tyrosine kinase (ex : ETV6-NTRK dans le fibrome sarcome infantile) ou à des facteurs de croissance autocrine (ex : COL1Q-PDGFB dans le dermato-fibrosarcome de Darier et Ferrand).

**Les amplifications simples** concernent essentiellement les tumeurs adipeuses atypiques, liposarcomes bien différenciés et liposarcomes dédifférenciés, avec un ou plusieurs amplicons de la région q13-q15 du chromosome 12. Le gène le plus fréquemment amplifié est MDM2. La présence de cette amplification permet de porter un diagnostic de certitude de liposarcome bien différencié lipoma-like, en particulier sur micro-biopsies, et de liposarcome dédifférencié en l'absence de composante bien différencié. Cette amplification MDM2 est également présente dans le sarcome cardiaque intimal, mais le profil génomique de cette tumeur est plus complexe et son intérêt serait plutôt à visée thérapeutique.

**Les mutations inactivatrices** de SMARCB1 sont rares, présentes de façon quasi systématique dans les tumeurs rhabdoïdes avec souvent une mutation germinale préexistante, et beaucoup plus inconstantes dans les sarcomes épithélioïdes, bien que les deux sarcomes comportent une perte d'expression immunohistochimique de INI1.



## **II. Sarcome d'Ewing**

### **1. Particularités épidémiologiques et historiques**

En 1921, James Ewing (1866–1943) décrit une nouvelle famille de tumeurs qui portera son nom, sarcomes d'Ewing, en les distinguant des lymphomes et des autres types de cancers connus à cette époque. Cependant, Le terme de "sarcome" est impropre, puisqu'il s'agit d'une tumeur neuro-ectodermique primitive (PNET). Les sarcomes d'Ewing (SE) sont donc des tumeurs mésenchymateuse apparentées aux PNET, mais présentent une anomalie génétique caractéristique « la translocation t(11,22)»

Le sarcome d'Ewing des parties molles (SEPM) ou sarcome d'Ewing extra squelettique(EES) est une pathologie rare de l'adulte jeune. En effet, quatre cas de tumeurs para vertébrales dont l'aspect histologique évoquait un sarcome d'Ewing sans atteinte osseuse ont été rapportées pour la première fois en 1969 par Tefft et ses collaborateurs. En 1988, 150 cas qui avaient été décrits (Enzinger FM et al), puis Angervall et al ont également confirmé l'existence de cette entité à partir de plusieurs observations similaires.

Au fil du temps, la littérature s'est enrichie de nouvelles observations et de plusieurs séries faisant état de l'absence de l'atteinte osseuse radiologique initiale tomodensitométrique et en imagerie par résonance magnétique (Allam K, Sze G et al 1994) (Thebert A, Francis et al 1993), confirmant ainsi le développement de ces tumeurs dans les tissus mous, et excluant toute diffusion locorégionale d'un sarcome d'Ewing initialement osseux.

En 1975, La première série conséquente collige 39 cas avec un âge médian de 20 ans et dont 77% de patients sont âgés de 10 à 30 ans. Le patient le plus jeune est un homme de 20 ans et le plus âgé est une femme de 63 ans. (Angervall I, Enzinger

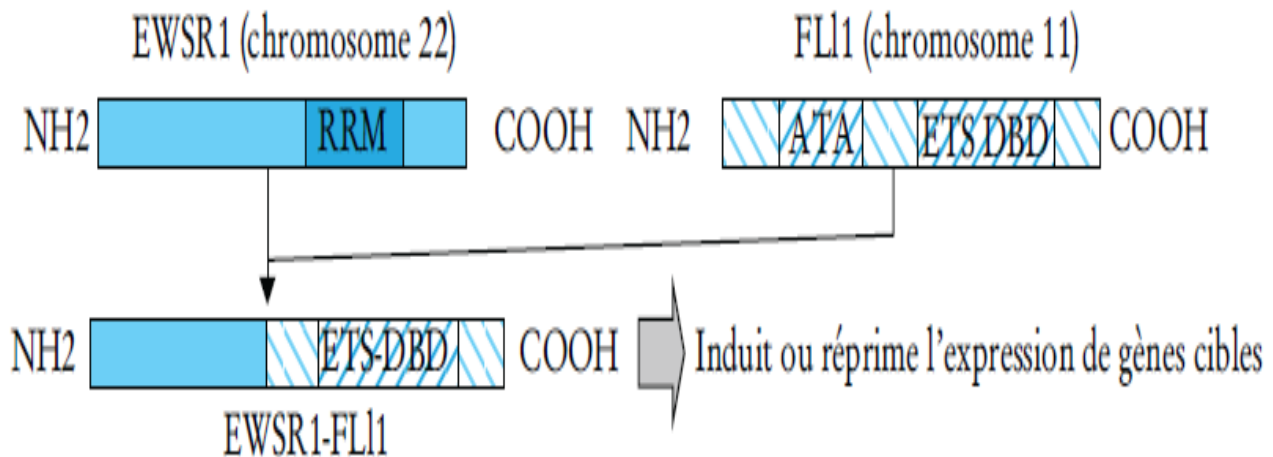
FM et al 1975). Une autre série présentée par Pritchard (Pritchard DJ et al 1974) montre que 70% des patients ont moins de 20 ans et ont également montré que la population noire est la moins affectée.

Concernant la répartition selon le sexe, différentes études sont marquées par une légère prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,5, cela a été confirmé par le travail d'O'keefe réalisé sur 22 cas de sarcomes d'Ewing (O'keefe F, Loringan JG, et al 1990).

Les sarcomes d'Ewing (SE) sont des tumeurs mésenchymateuses apparentées aux PNET avec la particularité de la présence d'une translocation chromosomique caractéristique de ces sarcomes. En 1983, les français Hullias et Turc-Carel étaient les premiers à rapporter l'existence d'une translocation réciproque (11,22) (q24, q12) dans plusieurs cas de sarcome d'Ewing osseux (Aurias A, Rimbaut C et al 1983) (Turc-Carel C, Philip I et al 1983). Whong-Peng puis Beekoft ont confirmé la présence de la même anomalie génétique dans un sarcome d'Ewing extra osseux (Becroft DMO, Pearson A 1984).

La translocation t(11,22) retrouvée dans le SE survient après une cassure chromosomique aboutissant à un gène de fusion chimérique « EWSR1-FLI1 » sous la dépendance d'un promoteur différent. Ce gène est retrouvé dans 85-95% des tumeurs d'Ewing et est supposé être directement responsable de l'apparition et du développement de la tumeur. D'autres gènes de fusion sont retrouvés dans les sarcomes d'Ewing « EWSR1-ERG » avec un pourcentage de 5-10% et «EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4, EWSR1-FEV» avec un pourcentage qui ne dépasse pas 1%.

- Gènes de fusion codant pour un facteur de transcription chimérique aberrant : EWSR1-FLI1



**Figure 1 : Translocation réciproque observée dans les sarcomes d'Ewing.**

**(Coindre JM. Molecular biology of soft-tissue sarcomas. 2010)**

RRM : RNA recognition motif ;

ATA : amino-terminal transactivation domain ;

ETS-DBD : Ets DNA-binding domain

Cette caractéristique cytogénétique du SEPM est très proche si non identique de celle retrouvée dans des processus lésionnels neuro-ectodermiques, cela a permis de résumer les hypothèses histogénétiques de ces variétés tumorales à deux possibilités : les sarcomes dérivent d'une cellule pluripotente pouvant se différencier en éléments mésenchymateux, épithéliaux ou neuro-ectodermiques selon des proportions variables, ou que tous les sarcomes d'Ewing sont d'origines neuro-ectodermiques, mais il s'agit alors d'une tumeur neurale faiblement différenciée voir totalement indifférenciées (Rud NP, Reihman HM 1989).

Les sarcomes d'Ewing sont constitués histologiquement de petites cellules rondes ou fusiformes monomorphes, sont souvent agressives et présentent manifestement une translocation réciproque.

La mise en évidence de cette translocation constitue actuellement un outil de diagnostic majeur, il est utilisé en routine et de manière systématique pour confirmer l'histologie d'un sarcome d'Ewing et éliminer tout diagnostic différentiel

Dans les différentes formes de translocations retrouvées dans le sarcome d'Ewing des parties molles, la protéine chimérique résultante de l'expression des gènes de fusion entraîne une activation continue du récepteur membranaire de l'hormone de croissance IGF-1, (Insuline Growth factor) responsable de la prolifération cellulaire. A l'adolescence, au moment de la poussée de croissance, les cellules normales sont soumises à une intense signalisation par l'hormone de croissance « l'IGF », qui a pour conséquence une perte de contrôle de régulation, suivie d'une prolifération anarchique cellulaire et à la fin l'apparition d'une tumeur ou d'un sarcome d'Ewing,

L'histoire naturelle des sarcomes d'Ewing des tissus mous a été décrite par Bowden et Booher en 1958, puis complétée par Enneking et al en 1981. En effet, La croissance de la tumeur se fait de façon centrifuge. Elle se développe initialement au niveau d'une loge entourée par des barrières anatomiques solides, et est alors dite intra-compartimentale. Ces barrières, notamment les aponévroses, les fascias intermusculaires et le périoste sont de grande résistance et ne seront franchis que tardivement, rendant ainsi la tumeur extra-compartimentale. Cependant, pour certaines localisations, la tumeur est d'emblée extra-compartimentale, notamment au niveau du creux poplité et du scarpa, du fait de l'absence d'une loge bien délimitée.

L'évolution naturelle des sarcomes d'Ewing des tissus mous se fait vers l'extension par contiguïté aux tissus adjacents notamment les vaisseaux, les nerfs, les muscles et les os. Cependant, la dissémination peut également se faire par voie hématogène et donne des métastases à distance, particulièrement au niveau des poumons dans 80% des sarcomes, ou rarement par voie lymphatique où l'atteinte ganglionnaire est observée dans moins de 5% des cas (Cormier JN, Pollock RE. 2004)

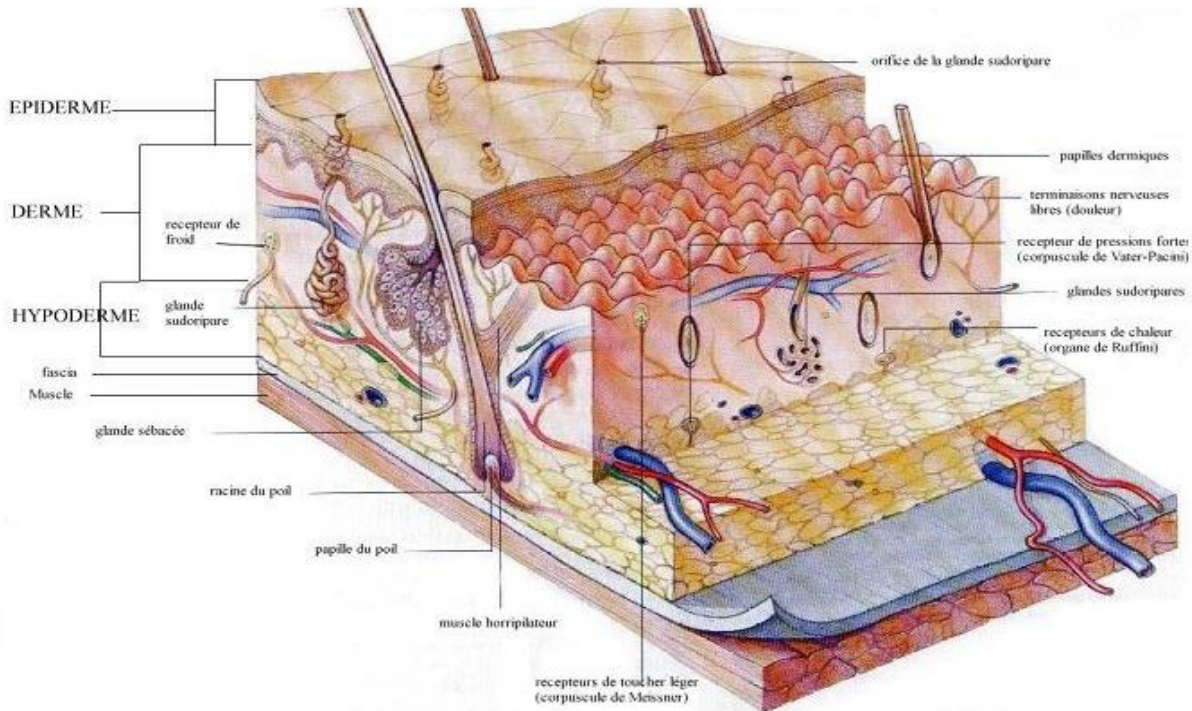
Le pronostic dépend du stade évolutif de la maladie, pour les formes localisées la survie globale est de l'ordre de 70%, et diminue avec la dissémination tumorale, devenant à 50% en cas de localisation pulmonaire seule, et encore moins s'il s'y associe une atteinte osseuse ou médullaire.

La détection de translocation dans le sarcome d'Ewing a un impact aussi bien diagnostique que pronostic et bien entendu thérapeutique. En effet, elle permet de distinguer entre les tumeurs à petites cellules rondes et dont les aspects morphologiques et immunophénotypiques sont similaires, c'est le cas du sarcome d'Ewing, du synoviosarcome peu différencié, des tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes, du rhabdomyosarcome alvéolaire, du chondrosarcome mésoenchymateux et du neuroblastome (Genevay M et al 2007). Il est ainsi recommandé de faire une analyse moléculaire devant toute suspicion de sarcome avec translocation, en l'occurrence le sarcome d'Ewing, particulièrement si la localisation de la tumeur est inhabituelle (Coindre JM 2010).

## 2. Rappel anatomique des tissus mous

### ➤ Peau

La peau est formée de 3 couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.



**Figure 2 : Schéma anatomique des couches superficielles des tissus mous.**

(Anatomie de la peau humaine)

### ➤ Tissus mous superficiels

Le fascia superficiel se situe sous la peau, il est formé de tissu conjonctif lâche et renferme de la graisse, des nerfs, des vaisseaux et des nœuds lymphatiques pouvant constituer une voie de dissémination longitudinale des tumeurs superficielles des tissus mous.

➤ **Tissus mous profonds**

○ **Membre inférieur**

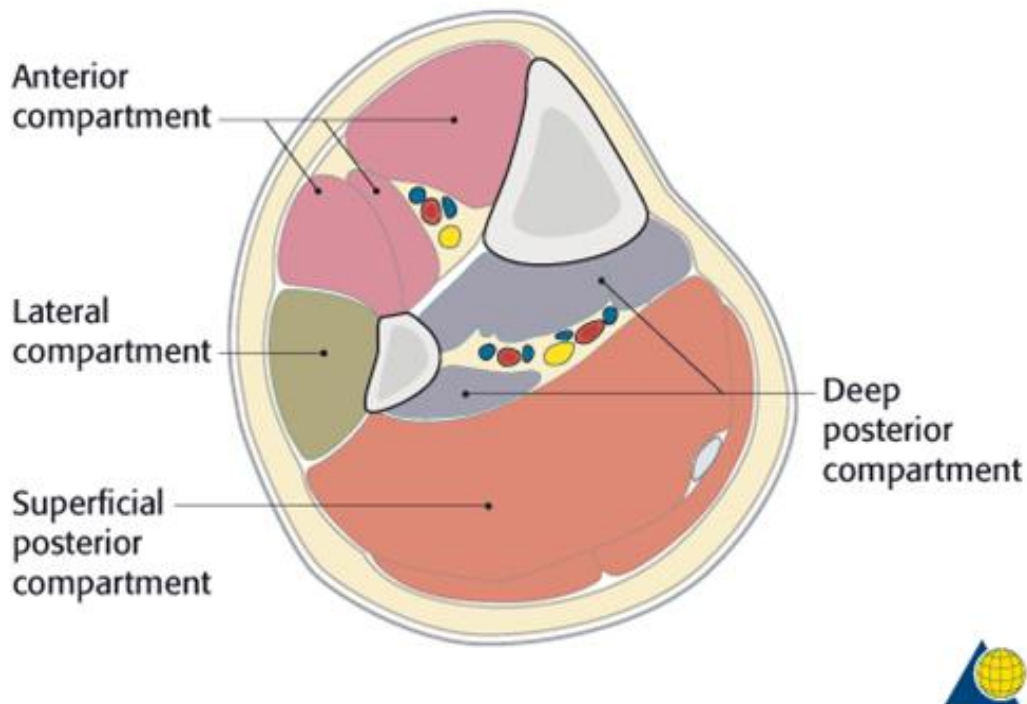
a. **Fascia profond**

Le fascia profond du membre inférieur est particulièrement épais et revêt le membre comme un bas élastique. Au niveau de la cuisse il est appelé « fascia lata », il forme les parois des 3 loges musculaires et se prolonge sous le genou pour former le fascia profond de la jambe. Ce dernier se fixe sur les bords antérieur et médial du tibia et entre en continuité avec le périoste. Les septums intermusculaires antérieur et postérieur se détachent de la face profonde du fascia profond de la jambe et se fixent sur les bords correspondants de la fibula.

Ainsi, la membrane interosseuse et les septums intermusculaires divisent la jambe en trois loges : antérieure (muscles extenseurs ou fléchisseurs dorsaux), latérale ou fibulaire (muscles fibulaires ou péroniers) et postérieure (muscles fléchisseurs plantaires qui sont eux-mêmes séparés en deux groupes par le septum intermusculaire transverse).

b. **Loges musculaires**

Les muscles de la cuisse sont divisés en deux régions : une postérieure et une antérieure qui ; elle-même ; présente deux compartiments : médial et antérieur.



**Figure 3** : Coupes axiales montrant les compartiments musculaires de la cuisse

La jambe comprend 2 régions musculaires, une région antéro-externe séparée en deux loges par l'aponévrose jambière et une région postérieure avec ses deux plans : superficiel et profond.

- **Membre supérieur**

- a. Fascia profond

Le fascia profond enveloppe le bras comme un manchon, formant alors le fascia brachial qui se continue en haut avec les fascias deltoïdien, pectoral, axillaire et infra-épineux et se prolonge en bas par le fascia anté-brachial, le fascia profond de l'avant-bras. De sa face profonde s'étendent deux cloisons formant les septums musculaires médial et latéral qui divisent le bras en deux loges musculaires : la loge antérieure (des fléchisseurs) et la loge postérieure (des extenseurs). Chacune de ces loges contient des muscles affectés aux mêmes fonctions ainsi que les nerfs et les vaisseaux qui les desservent.



Le fascia anté-brachial entoure les muscles de l'avant-bras qui sont à leur tour séparés par la membrane interosseuse formant ainsi des compartiments similaires à ceux du bras. Puis le fascia s'épaissit au niveau des extrémités distales du radius et du cubitus pour former la membrane transversale.

#### b. Loges musculaires

Les septums intermusculaires et l'humérus séparent les muscles du bras en deux loges : antérieure et postérieure. Au niveau de l'avant-bras, en plus des loges antérieures et postérieures, une troisième loge, comprise entre les précédentes est décrite. Cette dernière est située au niveau du compartiment aponévrotique de la loge antérieure, par contre ses muscles sont innervés par le radial comme ceux de la loge postérieure.

### **3. Clinique**

La douleur et/ou la tuméfaction à croissance rapide sont les deux signes cliniques les plus retrouvés dans les sarcomes d'Ewing des parties molles, bien que peu spécifiques. La douleur n'est rapportée que dans 30% des cas, elle peut être signe d'une atteinte des nerfs périphériques ou de la moelle et être accompagnés par des troubles sensitivomoteurs (Allam K, Sze G 1994).

Le plus souvent, la tumeur se présente telle une lésion à croissance rapide, mesurant au moment du diagnostic 5 à 10cm. Toutefois, des tailles tumorales plus importantes peuvent s'observer en particulier chez des sujets de sexe masculin. Ainsi, les sarcomes d'Ewing des parties molles doivent être systématiquement évoqués devant toute lésion profonde, de taille >5cm et potentiellement évolutive, justifiant donc la réalisation d'une biopsie.

Sa topographie est ubiquitaire, mais elle est plus fréquemment localisée au niveau des extrémités plutôt inférieures que supérieures, soit dans 30% des cas (Magu NK, Singh R 2000) (Radouane B, Chellaoui M et al 2002), puis au niveau de la région para vertébrale (Enzinger FM, Weiss SW 1988) (Paoletti H et al 1999), de la paroi thoracique et du rétro péritoine. Moins fréquemment retrouvée au niveau de la tête, le cou, le larynx et les fosses nasales avec un pourcentage de 3%. La lésion est excentrée par rapport à l'os, l'atteinte osseuse est le plus souvent secondaire, et se manifeste par une lyse avec ou sans réaction périostée (Rose JG, Hermann G, Mendelson DS 1983) (Kobos J, Grybowski w 1980).

**Tableau 4** : Topographie des sarcomes d'Ewing des parties molles dans la littérature (Paoletti H et al. Sarcome d'Ewing des parties molles : à propos de trois cas et revue de la littérature. J Radiol ; 80 : 477-482.)

Bibliographie	Nombre de cas	Thorax	Para vertébral	Extrémité	Tête cou	Retro-péritonéal	Abdo-pelvien
Enzinger	72	20	16	20		6	10
Allam	1		1				
Angervall	38	7	12	11		4	4
O'keeffe	22	2	3	11			6
Rose	3			2	1		
Kobos	1			1			
Bakhos	1			1			
Wigger	1				1		
Cenacchi	1						1
Gururangan	3	2					1
Christie	5	1	1	3			
Hasegawa	5	1		3			1
Raney	130	41		34	23	21	11
Chang	1					1	
Kamili	1		1				
Currarino	2		2				

La suspicion de l'existence d'un sarcome est de 86% lorsque la tumeur est profonde, évolutive ayant une taille supérieure à 5cm et parfois avec apparition de la douleur (Johnson CJ et al. 2001). Ces critères justifient d'adresser le patient dans un centre spécialisé pour une prise en charge collégiale. En effet, le patient peut bénéficier d'un diagnostic précoce et de qualité pour assurer une prise en charge thérapeutique optimale et d'un meilleur pronostic de survie (recommandations de l'ESMO en 2014). Trois grands points sont retenus et recommandés par l'ESMO :

- la nécessité d'une imagerie initiale adaptée avant tout traitement ;
- la nécessité d'une biopsie percutanée coaxiale de large calibre sous contrôle radiologique avant tout traitement ;
- la nécessité de référer tout patient présentant une masse inexplicée des tissus mous de plus de 5cm si elle est superficielle ou quelle que soit sa taille si elle est profonde à un centre capable d'assurer une approche multidisciplinaire.

Outre le diagnostic positif, l'examen clinique permet d'apprécier l'extension locorégionale de la tumeur en étudiant sa taille, sa mobilité par rapport aux deux plans, la présence d'adénopathies régionales ou de nodules satellites, et oriente ainsi l'examen paraclinique.

#### **4. Radiologie**

Le bilan d'imagerie initial est fondamental, il doit être fait avant tout prélèvement diagnostique et avant tout choix thérapeutique. Il permet de différencier entre une tumeur bénigne et une tumeur maligne, d'identifier les critères de malignité, de réaliser le bilan d'extension local et à distance, et de réaliser des prélèvements biopsiques scanno ou écho-guidés.

En imagerie standard, la tumeur est bien limitée présentant un aspect de pseudo capsule, polylobulée, parfois très volumineuse, des calcifications peuvent être retrouvées, il est également important de rechercher la présence d'une réaction

périostée ou d'un envahissement osseux. Cependant, ces signes ne sont pas spécifiques. Par ailleurs, la radiographie pulmonaire reste indispensable pour la recherche de métastases pulmonaires dans le cadre du bilan d'extension.

L'échographie associée au Doppler couleur est un examen simple, de première intention, devant toute découverte d'une masse des parties molles. C'est un examen sensible mais non spécifique, qui présente des difficultés diagnostiques notamment devant des sarcomes hétérogènes, nécrotiques ou associés à des hématomes.

L'échographie est indiquée dans les tumeurs superficielles de moins de 5cm afin d'apprécier leur caractère extra ou intra aponévrotique. Dans les cas typique, la tumeur se présente sous la forme d'une masse bien circonscrite, hypoéchogène, et bien vascularisée.

L'échographie trouve également sa place en cas de localisation secondaire hépatique bien qu'exceptionnelle.

La tomодensitométrie (TDM) est indiquée, avant tout, dans le bilan d'extension en complément à la radiographie pulmonaire, en effet 80% des SEPM s'accompagnent de métastases pulmonaires, une TDM thoracique doit alors être réalisée dès que le diagnostic histologique est confirmé.

La TDM est également utilisée du fait de sa supériorité par rapport à l'imagerie par résonance magnétique dans l'analyse des structures osseuses et cartilagineuses. Cependant, elle ne permet pas d'étudier les limites tumorales du fait des artéfacts de densité à l'interface os tissus mous.

L'angioscanner permet une bonne analyse des structures vasculaires avoisinant la tumeur.

Le sarcome d'Ewing des parties molles se présente telle une masse hypodense, se rehaussant après injection du produit de contraste du fait de son caractère hypervasculaire et contenant rarement des calcifications (O'keefe F, Loringan JG 1990) (Rose JG, Hermann G 1983).

L'IRM (imagerie par résonance magnétique) a révolutionné l'exploration des sarcomes d'Ewing des parties molles. Elle permet la réalisation d'un bilan morphologique précis, de guider la biopsie, et d'effectuer un bilan d'extension de la maladie.

L'IRM est considérée l'examen clé dans le bilan pré thérapeutique des SEPM. En effet, l'IRM a prouvé sa supériorité sur la TDM dans l'étude de la localisation de la tumeur, sa situation par rapport à l'aponévrose permettant ainsi de distinguer les tumeurs superficielles de celles profondes, et de donner les mensurations précises de la tumeur dans les trois plans de l'espace ainsi que l'extension locorégionale (structures vasculonerveuses). Elle constitue également une aide indispensable à la détermination des volumes cibles pour la radiothérapie et à la surveillance des patients au cours d'une chimiothérapie.

En IRM, le diagnostic de sarcome d'Ewing des parties molles doit être évoqué devant : Une lésion hétérogène surtout sur les séquences en pondération T1 et T2 (Allam K, Sze G. 1994), prenant le contraste et présentant des zones nécrotiques, mesurant plus de 5cm de diamètre, à localisation sous aponévrotique, de contours irréguliers ou lobulés avec des parois et septas intra tumoraux irréguliers et épais.

La tomographie par émission de positrons (TEP) n'a pas démontrée sa place dans le diagnostic des tumeurs sarcomateuses en raison de la relation non univoque de la fixation du traceur. Toutes ces techniques d'imageries sont nécessaires et utiles, mais non certaines pour le diagnostic d'une tumeur sarcomateuse. L'examen anatomopathologique basé sur l'analyse histologique reste incontournable et l'examen de certitude pour les sarcomes des tissus mous en général (Bonvalot S et al. 2004).

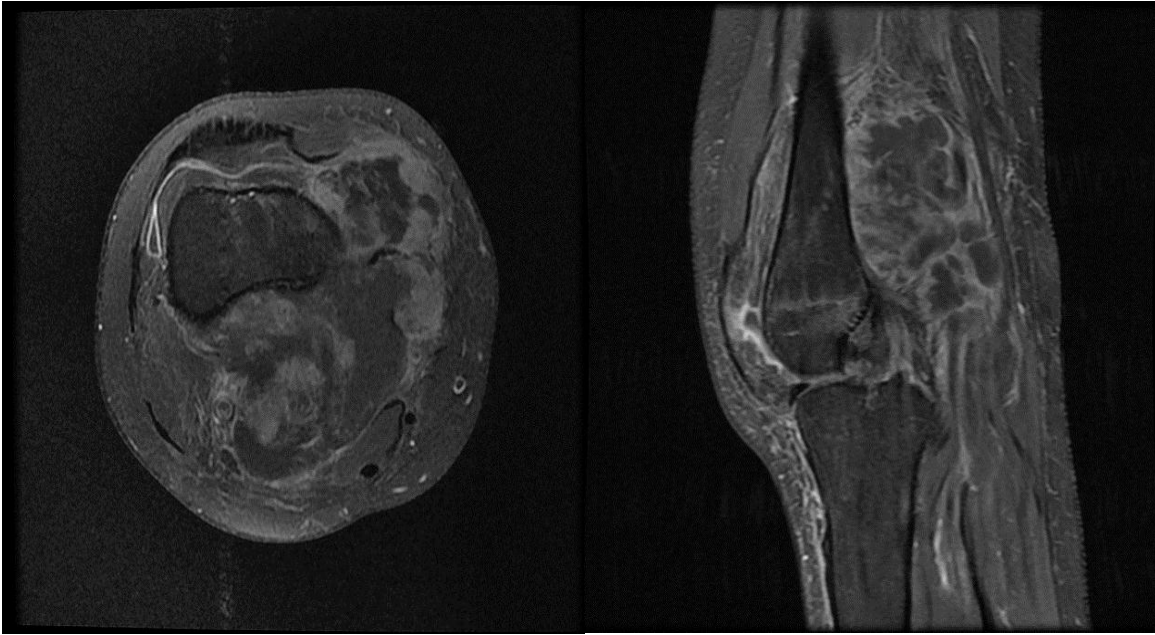


Figure 4 : Image d'une IRM d'un sarcome d'Ewing des parties membres localisé au niveau du membre inférieur, séquence T1, en coupe axiale et sagittale

## 5. Anatomopathologie

La découverte d'une tumeur des parties molles impose la réalisation d'une biopsie avant l'exérèse. L'anatomopathologie apporte le diagnostic de certitude et est alors indispensable avant d'envisager tout protocole thérapeutique.

La biopsie percutanée se développe de plus en plus, du fait de son coût moindre et de son accessibilité. Elle peut être réalisée sous contrôle échographique ou scannographique, et permet à l'aide d'un trocart, d'obtenir un fragment contenant du tissu tumoral. Cependant, le diagnostic et le grading histologique sont difficilement déterminés vu la quantité insuffisante du tissu prélevé. Pour éviter des conséquences négatives en l'occurrence une sous-estimation de la malignité et du grade tumoral, il est nécessaire dans 10 à 15% des cas de faire une biopsie chirurgicale. (Ray-Coquard I et al. 2003)

La biopsie chirurgicale, sous anesthésie générale ou locorégionale, demeure l'examen de choix du fait de sa supériorité sur la biopsie percutanée dans l'établissement du grading histologique. Elle doit être réalisée sur une portion charnue de la tumeur, en région non nécrotique, et respectée les règles suivantes :

- Aborder directement la tumeur, en évitant de disséquer les différents plans anatomiques et sans contaminer les compartiments adjacents.
- Incision longitudinale au niveau des membres, sur le trajet de la future cicatrice d'exérèse chirurgicale.
- Hémostase soigneuse pour éviter tout hématome ou toute diffusion des cellules tumorales.
- En cas de drainage, celui-ci doit se faire dans l'axe de la cicatrice et à proximité de celle-ci.

Les prélèvements biopsiques doivent être multiples, vu l'hétérogénéité de la tumeur, puis directement fixés dans le formol à 10%. Par ailleurs, un prélèvement cytologique à l'aiguille fine peut être également réalisé. Il a sa place dans le diagnostic des récurrences tumorales ou en cas d'atteinte ganglionnaire associée.

## Prise en charge anatomopathologique

La pièce opératoire orientée avec repérages doit parvenir fraîche chez l'anatomopathologiste qui doit à son tour la peser et la mesurer selon ses trois dimensions en notant le grand diamètre. Des prélèvements sont pratiqués, avant toute fixation, pour des techniques spéciales « étude cytogénétique, moléculaire et à la congélation »

### A. Examen macroscopique :

La tumeur doit être examinée en totalité pour préciser la consistance molle, friable, multilobée et la couleur blanchâtre. Il est également très important de vérifier l'aspect des contours qui peut être bien limité, pseudo-encapsulé ou infiltrant différents plans d'une région. La tranche de section est gris-jaunâtre pouvant comporter des remaniements kystiques, hémorragiques et nécrotiques qui devraient être repérés et notés (El Andaloussi Y et al. 2007).

La plupart des sarcomes d'Ewing sont des tumeurs volumineuses refoulant les organes avoisinants et montrent une agressivité qui s'explique aussi bien par le franchissement de la corticale que par l'envahissement des parties molles.

### B. Examen microscopique :

Ce sont des tumeurs à petites cellules rondes basophiles, lobulées, denses et d'aspect uniforme. Les cellules sont en effet relativement monomorphes, comportant des noyaux arrondis à ovalaires, vésiculeux à membrane nucléaire cernée, à chromatine finement granitée homogène renfermant un petit nucléole. Les cytoplasmes sont pâles, mal limités, peu abondants. Il n'y a pas de réseau réticulinique intercellulaire. La vascularisation est riche, bien que parfois masquée par la densité cellulaire. Cependant, il peut exister des remaniements hémorragiques, des aspects pseudoangiomateux.



Si le nombre de mitoses est classiquement réduit, il peut exister des formes atypiques avec un plus grand pléomorphisme et une activité mitotique augmentée. Il existe fréquemment une nécrose monocellulaire conduisant à l'individualisation d'une population paraissant différente à noyaux densifiés, rétractés, et responsable des aspects biphasiques, en damiers ou en filigrane classiquement décrits. Le glycogène est d'aspect variable, il est présent dans 70% des cas. Des pseudos corps en rosettes sont visualisés dans 50% des cas. Par contre, les structures spécifiques comme les myofibrilles ou les granules neuro-sécrétantes sont absentes (Allam K et al. 1994) (O'keefe F et al. 1990) (Enzinger FM et al. 1995).

Cet aspect rend les SEPM semblables aux PNET. Certains anatomopathologistes les considèrent comme une entité tumorale unique, pour d'autres, il s'agit d'une évolution tumorale différente d'une même cellule (Enzinger FM et al. 1995).

L'examen microscopique à fort grossissement a une importance capitale dans le diagnostic des sarcomes d'Ewing, puisqu'il précise le degré et le type de différenciation des cellules tumorales en rapport avec la taille, le contour des noyaux, l'aspect de la chromatine et la présence des nucléoles. Avec ce grossissement, l'anatomopathologiste détermine l'activité mitotique et peut également mettre en évidence les mitoses atypiques. Néanmoins, il est à préciser qu'il y'a des discordances inter-observateurs dans l'examen histologique pouvant atteindre jusqu'à 30%, d'où l'intérêt des analyses cytogénétiques et moléculaires.

80% des sarcomes d'Ewing présentent une translocation réciproque (11,22) (q24, q12) fusionnant le gène EWSR1 (Ewing's sarcoma gene) avec FLI1 et 5 à 10% de ces sarcomes montrent une translocation réciproque (21,22) (q22, q12) fusionnant le gène EWSR1 avec ERG. Cette translocation (11,22) est également retrouvée dans les tumeurs desmoplastiques et les tumeurs d'ASKIN, mais fusionnant d'autres gènes.

Par ailleurs, le sarcome d'Ewing présente un immunophénotype très sensible et peu spécifique à l'anticorps monoclonal « Anti CD99 », permettant ainsi la mise en évidence de la glycoprotéine de surface P30-32 codée par le gène MIC2, présent dans 90% des cellules d'Ewing quel que soit le grade de la tumeur (El Andaloussi Y et al. 2007) (Hasegawa et al. 1998).

## **6. Les limites de l'histologie et de l'immunohistochimie**

L'aspect morphologique pose un problème de diagnostic différentiel avec en premier lieu le sarcome d'Ewing osseux, cependant pour la localisation extra-osseuse, la lésion est excentrée et l'atteinte osseuse est plutôt secondaire (Andaloussi Y et al. 2007). Ensuite vient le neurofibrome, le neuroblastome, le rhabdomyosarcome, l'histiocytome (O'keefe F et al. 1990), l'histiofibrosarcome, liposarcome et enfin l'hémangiopéricytome, l'angiosarcome (Allam K et al. 1994) et le neurinome.

Ci-dessous un tableau résumant les différents caractères des principaux diagnostics différentiels du sarcome d'Ewing des parties molles.

**Tableau n°5 : Tableau résumant les caractères épidémiologiques et histologiques des principaux SPM**

Tumeur	Caractères épidémiologiques et histologiques
<b>Histiocytofibrome malin</b>	30% des SPM de l'adulte. Apparaît après l'âge de 45 ans. Sarcome à cellules pléomorphes
<b>Liposarcome</b>	Adulte de 25 à 55 ans. Tumeur constitué de cellules adipeuses bien différenciées
<b>Synovialosarcome</b>	Adulte jeune de 20 à 30 ans. Provient du tissu synovial. Surtout au niveau des membres inférieurs
<b>Fibrosarcome</b>	Adulte jeune de 20 à 30 ans. Plusieurs sous types : il faut différencier le fibroblastique du pléomorphe par l'uniformité du modèle de la trame osseuse de la tumeur et le nombre de figures mitotiques
<b>Rhabdomyosarcome</b>	15% des SPM 3 catégories de rhabdomyosarcome : – Pléomorphe : touche surtout l'adulte, rare, survient au niveau des muscles squelettiques Embryonnaire et alvéolaire : les plus fréquents chez l'enfant, de mauvais pronostic
<b>Leiomyosarcome</b>	Provient du muscle lisse De localisation variable, surtout viscérale au niveau des muscles lisses ou siège les vaisseaux d'où leurs agressivité

Devant la multitude des diagnostics différentiels, l'immunohistochimie et la biologie moléculaire viennent compléter l'examen histologique afin de préciser s'il s'agit bien d'un diagnostic de sarcome d'Ewing des parties molles.

La majorité des sarcomes d'Ewing sont positifs pour l'anticorps anti-CD99, dirigé contre le produit du gène MIC2, gène pseudo-autosomal situé sur les bras courts des chromosomes sexuels. Cet immunophénotype est retrouvé dans plus de 90% des cas (Renard C et al. 2014), sous forme d'un marquage diffus membranaire ; à tel point que sa négativité ou l'absence de marquage membranaire incitent à envisager en priorité un autre diagnostic. Cependant, il n'est pas du tout spécifique, puisqu'il peut être positif dans d'autres tumeurs à cellules rondes notamment les synoviosarcomes peu différenciés, les tumeurs desmoplastiques et dans certains rhabdomyosarcomes alvéolaires. Il peut également marquer certains lymphomes, leucémies lymphoblastiques, ou encore des tumeurs myéloïdes extra médullaires.

Les sarcomes d'Ewing montrent un marquage négatif à l'anticorps anti WT1 permettant ainsi leur distinction des tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes caractérisées par la positivité de cet anticorps (Hill DA et al. 2000). En revanche, l'anticorps FLI1 (dirigé contre la partie carboxy-terminale de la protéine FLI1) ne présente aucun intérêt supplémentaire, puisqu'il a une sensibilité de 70 à 80% mais pas de spécificité. Il peut présenter un marquage positif dans certains lymphomes lymphoblastiques, dans les synoviosarcomes peu différenciés à cellules rondes et dans un également dans certaines tumeurs vasculaires (Folpe AL, Hill CE, et al. 2000) .

Par ailleurs, l'immuno-marquage de la protéine ERG n'est pas du tout spécifique et n'est en aucun cas corrélé à un transcrit impliquant le gène ERG.

## **7. Biologie moléculaire : intérêt et nouveautés**

### **a. Impacts diagnostiques de la biologie moléculaire**

Certaines anomalies moléculaires se sont révélées être des marqueurs diagnostiques spécifiques, permettant leur intégration dans la définition d'une entité. En effet l'utilisation systématique de la biologie moléculaire dans des groupes spécialisés en pathologie sarcomateuse a permis de faire évoluer la classification de 2013.

Ainsi, des entités histologiques distinctes ont été regroupées, comme le sarcome d'Ewing et le neuroépithéliome, l'histiocytofibrome malin inflammatoire et le liposarcome dédifférencié (Foulkes WD, Clarke BA et al. 2014), la tumeur rhabdoïde et le carcinome à petites cellules de l'ovaire (Coindre JM, Mariani O et al. 2003). À l'inverse, des entités comportant une certaine similitude histologique ont été séparées, comme le rhabdomyosarcome embryonnaire peu différencié et le rhabdomyosarcome alvéolaire (Williamson D, Missiaglia E et al. 2010), le liposarcome bien différencié sclérosant d'aspect myxoïde et le liposarcome myxoïde, le sarcome d'Ewing et le neuroblastome olfactif.

La biologie moléculaire a permis d'identifier des formes inhabituelles de sarcomes en fonction de l'âge du patient, de la localisation tumorale ou du profil immunohistochimique, comme le sarcome d'Ewing, le synoviosarcome ou le liposarcome dédifférencié. Cette discipline émergente, avec ses techniques pointues, est devenue une partie intégrante et indispensable dans le diagnostic actuel des sarcomes permettant d'abord de différencier entre le caractère bénin/ malin des tumeurs et enfin d'assurer la bonne classification des sarcomes. En effet, son utilisation est incontournable dans le diagnostic de certains sarcomes, notamment pour l'identification d'un sarcome d'Ewing à localisation clinique inhabituelle et en absence totale de profil immunohistochimique spécifique.

### **b.Les techniques de pointe identifiant les anomalies caractéristiques des sarcomes**

La FISH est la technique de référence « Gold Standard » pour détecter certaines anomalies moléculaires, comme l'amplification des gènes MDM2-CDK4 dans les liposarcomes bien/dédifférenciés ou MYC dans les angiosarcomes en tissu irradié. D'autres anomalies sont également identifiées par FISH notamment les réarrangements chromosomiques. Ainsi, les sondes de type Break Apart sont largement utilisées dans les sarcomes d'Ewing, les synoviosarcomes, les rhabdomyosarcomes pour déterminer respectivement les gènes réarrangés EWSR1, SS18, DDIT3, FOXO1. Néanmoins, Une même sonde pourrait reconnaître le même réarrangement chromosomique dans plusieurs types de tumeurs, car elle n'est pas spécifique de la translocation, elle ne détecte qu'un des partenaires réarrangés. Par exemple, la sonde EWSR1 généralement utilisée pour confirmer le diagnostic d'un sarcome d'Ewing, reconnaîtrait avec des pourcentages plus faibles le gène réarrangé EWSR1 dans d'autres tumeurs « le sarcome à cellules claires, la tumeur desmoplastique à cellules rondes, le chondrosarcome myxoïde extra-squelettique et l'histiocytofibrome angiomatoïde » la même façon.

**Tableau 6 : Principales translocations retrouvées dans les sarcomes des tissus mous : (Yoshinao Oda et al, 2017)**

Tumors	Chromosome	Fusion gene
Synovial sarcoma	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SS18-SSX1, SSX2
Ewing sarcoma	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1
	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 chondrosarcoma.	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
	t(2;22)(q32.3;q12)	EWSR1-CREB1
Angiomatoid fibrous histiocytoma	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
	t(7;16)(q34;p11)	FUS-CREB3L2
Low grade fibromyxoid sa./ Sclerosing epithelioid fibrosarcoma.	t(11;16)(p11;q11)	FUS-CREB3L1
Hemosiderotic fibrolipomatous t.	t(1;10)(p22;q24)	MGEA5-TGFB3
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;

IMT, Inflammatory myofibroblastic tumor;

DFSP, Dermatofibrosarcoma protuberans;

GCT, Giant cell tumor

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) se base sur la détection d'un segment d'ADN situé dans les noyaux de cellules en interphase permettant alors la mise en évidence de réarrangement génique « une translocation ». La FISH a plusieurs avantages : elle peut être réalisée sur du matériel frais, des empreintes de tissu congelé ou des lames de tissu fixé et inclus en paraffine. Elle est performante sur peu de matériel, en particulier les micro-biopsies. Sa sensibilité est de 90—95 % dans des laboratoires entraînés. Cependant, une technique complémentaire à la FISH, serait nécessaire et utile dans le cas des sarcomes à translocation, pour déterminer le type des transcrits de fusion (Neuville A, et al. 2014) qui sont déterminants dans l'évaluation du pronostic du patient.

L'amplification en chaîne par polymérase après transcription inverse RT-PCR, idéalement, réalisée à partir d'ARN extrait d'un tissu congelé, mais peut également être faisable à partir d'ARN extrait de tissu fixé et inclus en paraffine si les fragments à amplifier font moins de 150 paires de bases. La technique de PCR doit être complétée par un séquençage de sanger pour déterminer les transcrits de fusion

La Q-PCR quantitative est une technique rapide, est plus adaptée au diagnostic de routine des sarcomes à translocation que la RT-PCR conventionnelle. Elle est sensible et spécifique, mais doit être pratiquée dans des laboratoires expérimentés afin de maîtriser la qualité des extractions d'ARN et le choix des amorces permettant l'amplification des fragments, et de minimiser le risque de contamination. Lorsqu'elle est utilisée dans des circonstances optimales, le taux de résultat interprétable est de 90 % (Neuville A, et al. 2014).

L'hybridation génomique comparative (CGH) peut aussi être utilisée, mais en seconde plan après la FISH.

La CGH, basée sur l'hybridation simultanée d'ADN tumoral et d'ADN normal (témoin) sur une lame incrustée des séquences d'un génome normal, détecte les gains et les pertes de gènes ou de régions chromosomiques, ainsi que les réarrangements



chromosomiques déséquilibrés. Initialement réservée au tissu congelé, elle est maintenant applicable au tissu fixé en formol et inclus en paraffine (Krijgsman O, Israeli D et al. 2012). Dans un laboratoire expérimenté, elle peut être réalisée en moins d'une semaine. De plus, il a été montré récemment que la complexité chromosomique, évaluée par la CGH, est un marqueur pronostique dans certains sarcomes comme les synoviosarcomes et (Lagarde P et al. 2013) les GIST (Lagarde P, Pérot G et al. 2012).

### **c. Indications de la biologie moléculaire**

Les pathologistes et les cliniciens ont de plus en plus recours à la biologie moléculaire comme outil diagnostique dans les sarcomes des parties molles. Malgré son coût et sa faible disponibilité, la biologie moléculaire est en passe de devenir un standard par les nombreux avantages qu'elle offre (Neuville A, et al. 2014) :

- la présence d'une anomalie moléculaire permet de poser un diagnostic définitif et reproductible, en particulier sur microbiopsie.
- Certaines anomalies génétiques constituent des critères d'inclusion pour des thérapies ciblées.
- La détection systématique d'anomalies génétiques permet de mieux classer les sarcomes et d'améliorer la sélection des patients pour un traitement donné.
- La confrontation histologie/biologie moléculaire augmente les compétences des pathologistes.

Lors de l'établissement d'un diagnostic de sarcome, le pathologiste doit se rappeler que l'histologie et la génomique sont liées, vu que la morphologie est le reflet des modifications génétiques et épigénétiques.

Bien que l'histologie soit parfois trompeuse ou non spécifique, elle permet d'orienter vers le type d'analyses moléculaires à employer, ces dernières, utilisées seules ne permettent pas de différencier entre deux tumeurs caractérisées par la

même translocation, comme le cas d'un sarcome à cellules claires et un histiocytofibrome angiomatoïde.

La confrontation clinique-histologie reste jusqu'à l'heure actuelle la base du diagnostic, avec la biologie moléculaire comme nouveau outil de confirmation ou de redressement de ce diagnostic clinique.

#### **d. La biologie moléculaire dans les sarcomes d'Ewing**

Les études moléculaires ont permis de mieux caractériser les transcrits de fusion et d'élargir considérablement le spectre moléculaire des tumeurs de la famille d'Ewing en révélant toute sa complexité. De nombreux transcrits de fusion sont ainsi décrits :

- Dans 85% des cas, il s'agit du transcrit EWSR1-FLI1. Il existe une variabilité du point de cassure au sein d'EWSR1-FLI1 générant deux types de protéines de fusion, 1 et 2. Un meilleur pronostic classiquement attribué au type 1 n'est plus retrouvé dans les séries les plus récentes (Van Doorninck JA et al. 2010) (Le Deley M-C et al. 2010).
- Dans 10-15% des cas, on retrouve le transcrit EWS-ERG.
- Des variantes plus rares (moins de 1%) impliquant toujours EZS et d'autres gènes de la famille ETS (codant pour des facteurs de transcription) que sont ETV1 (t (7 ; 22)), FEV (t (2 ; 22)), ETV4 alias E1AF (t (17 ; 22)) ;
- Plus récemment des variantes impliquant non plus EWS mais FUS, un gène appartenant néanmoins à la même famille que EWS, la famille FET codant pour les protéines nucléaires agissant à différentes étapes de l'expression génique : FUS-ERG par t (16 ; 21) (Ng TL, O'Sullivan et al. 2007).

Le gène EWSR1 est localisé sur le chromosome 22 en q12 et comporte 17 exons : il code pour une protéine de 656 acides aminés avec un domaine d'activation transcriptionnel codés par les exons 1 à 7 et un domaine de liaison à l'ARN situé à l'extrémité C-terminale codée par les exons 11 à 13 (Plougastel B et al. 1993). Cette

séquence est commune à la famille TET à laquelle appartiennent les gènes FUS et TAF15. Le gène EWSR1 est exprimé de façon ubiquitaire et code pour une protéine nucléaire dont la fonction est encore mal connue (Thompson et al. 1999).

L'étude moléculaire dans le cadre des EWING/PNET est certainement la plus compliquée des sarcomes à cellules rondes. En effet, la taille du gène EWSR1 est parmi les plus grandes, expliquant certains échecs de la PCR sur tissu en paraffine (Bridge RS, Rajaram V et al. 2006). On peut également observer des transcrits cryptiques non détectés en FISH (Newby R, Rowe D et al. 2010), d'où l'intérêt de l'association de la FISH et de la RT-PCR.

Par ailleurs, il y'a la multiplicité des transcrits à laquelle s'ajoute plusieurs points de cassure détectés sur le transcrit EWS-FLI1 (retrouvé dans 85% des cas d'EWING) qui sont répartis sur 4 introns pour EWS et 6 pour FLI1.

Il est important de garder à l'esprit qu'un réarrangement de EWS par FISH n'est pas suffisant et n'implique pas automatiquement une tumeur Ewing/PNET. Un nombre grandissant de tumeurs présentent un réarrangement de ce gène (Fisher C. 2014) « EWS » qui est essentiellement impliqué dans d'autres tumeurs des tissus mous, telles que liposarcome myxoïde (partenaire : DDIT3), tumeur desmoplastique à cellules rondes (partenaire : WT1), histiocytome fibreux angiomatoïde (partenaire : ATF1 ou CREB1) pour n'en citer que quelques-unes. Un réarrangement impliquant EWS et YY1 a aussi été récemment décrit dans certains mésothéliomes (Panagopoulos I, Thorsen J. 2013).

Une recherche des transcrits de fusion par QPCR s'impose pour confirmer la technique FISH et pour une bonne évaluation du pronostic du patient. Dans les sarcomes d'Ewing, ce pronostic s'est considérablement amélioré depuis l'évolution des protocoles de chimiothérapie qui permettent une guérison de 2/3 des cas, alors qu'il reste extrêmement péjoratif dans les sarcomes d'Ewing métastatiques (Ladenstein et al. 2010).

En effet la biologie moléculaire constitue actuellement un outil utile et inévitable dans la prise en charge des sarcomes d'Ewing, associée à l'analyse histologique, elle assure une bonne distinction des tumeurs, notamment avec les tumeurs à petites cellules rondes basophiles qui constituent les principaux diagnostics différentiels des SEPM :

- Lymphomes non hodgkinien et en particulier le lymphome lymphoblastique B qui peut se présenter sous la forme d'une tumeur des tissus mous.
- Rhabdomyosarcomes surtout de type alvéolaire car il peut exister une architecture pseudo-alvéolaire dans les PNET mais l'expression de la myogénine fait le diagnostic.
- Synoviosarcome dans sa variante indifférenciée à cellules rondes (ne pas se laisser piéger par l'immunomarquage des kératines : Ewing et synoviosarcome peuvent tous deux être positifs ou négatifs pour les pankératines. Par contre, l'expression de l'EMA est rarissime dans les Ewing, alors qu'elle est fréquemment présente dans les synoviosarcomes, plus souvent même que la pankératine).
- Un autre diagnostic différentiel est le chondrosarcome mésoenchymateux dont la composante cellulaire est CD99+ et qui peut prêter à confusion quand le contingent cartilagineux est absent. Néanmoins, cette entité est génétiquement bien distincte de la famille Ewing car elle présente une translocation HEY1-NCOA2 identifiable par technique FISH.
- La tumeur desmoplastique à cellules rondes est également aisément identifiable devant la mise en évidence du transcrit EWS-WT1. De plus, les cas typiques ont une présentation clinico-pathologique assez caractéristique (multiples nodules abdominaux chez un adolescent, constitués de petites cellules rondes sur un fond très fibreux) et un immunophénotype desmine+ /kératine.

- Le liposarcome à cellules rondes peut parfois en imposer pour une tumeur de type Ewing, surtout lorsqu'il n'y a pas de contingent de liposarcome myxoïde évident, ni de lipoblaste net. Néanmoins, les cellules ont un noyau plus vésiculeux et la vascularisation capillaire fine, caractéristique parfois masquée en histologie standard est soulignée en immunohistochimie. La présence d'un transcrite FUS-DDIT3 ou EWS-DDIT3 signe l'entité.
- Les tumeurs rhabdoïdes malignes, survenant typiquement chez le nourrisson, peuvent aussi ressembler morphologiquement à une tumeur de la famille Ewing lorsqu'elles ne présentent pas la morphologie rhabdoïde typique mais un aspect de tumeur à cellules rondes indifférenciées, ce qui n'est pas rare. Ces tumeurs sont classiquement caractérisées par une perte d'expression d'INI1 en immunohistochimie traduisant une mutation ou une délétion dans le gène SMARCB1.
- Chez l'adulte plus âgé, peuvent aussi se discuter les métastases d'un carcinome à petites cellules, ou un carcinome à cellules de Merkel qui exprimera la cytokératine20, alors que les PNET sont CK20 négatives.

Il reste néanmoins un petit pourcentage de lésions ambiguës difficiles à classer.

L'étude moléculaire est capitale pour identifier des tumeurs à génotype de PNET avec une différenciation myogénique ou mélanique (Tan SY, Burchill S et al. 2001) (Barisella M et al. 2010), ou avec une importante différenciation épithéliale (Weinreb I, Goldstein D et al. 2008) qui sont des formes frontières avec un carcinome neuroendocrine à grandes cellules (Malone VS, Dobin SM et al. 2010). Se réduisant de jour en jour, il reste le groupe des sarcomes à cellules rondes indifférenciés, inclus dans la catégorie des « sarcomes indifférenciés » de la nouvelle classification OMS 2013 des tumeurs des tissus mous (Fletcher CD, Bridge J et al. 2013).

Ces sarcomes à cellules rondes indifférenciés forment un groupe hétérogène, vivier de sarcomes à génomique simple, dont le démantèlement est en cours grâce aux nouvelles techniques d'analyses du transcriptome qui, grâce au séquençage ARN haut débit, permettront la découverte de nouveaux transcrits.

## **8. Traitement et Pronostic**

La similitude cytogénétique des SEPM aux PNET les inclut dans le même protocole thérapeutique (El Andaloussi Y, Hachimi K et al 2007). La prise en charge des SEPM doit se faire dans un centre de référence impliquant un comité multidisciplinaire qui associe les chirurgiens, les radiologues, les pathologistes, les chimiothérapeutes et les radiothérapeutes. L'objectif d'une décision collégiale du traitement est de limiter tout risque de métastase régionale ou à distance, puisque plus de la moitié des patients récidivent et développent des métastases dans les premières années et décèdent.

La chirurgie des SEPM est considérée jusqu'au jour d'aujourd'hui la base du traitement thérapeutique. Ainsi, tout acte chirurgical inadéquat est non rattrapable par la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

### **a. Chirurgie**

La qualité de la résection chirurgicale des tumeurs d'Ewing est un facteur pronostique essentiel. En effet, les patients ayant des marges positives, ont un risque de récurrence locale multiplié par 2. C'est pour cela que la chirurgie doit respecter les règles applicables aux chirurgies des sarcomes interdisant toute effraction de la tumeur et imposant une résection large, en monobloc et en emportant la première barrière anatomique jugée saine avec une marge de sécurité R (P. Marec-Bérard, F. Chotel, et al 2010). Le chirurgien doit préciser sur son compte rendu opératoire les facteurs limitant son geste (structure vasculaire, nerveuse ou autres.....etc)

R c'est la marge chirurgicale définie par l'anatomopathologiste sur l'ensemble de la périphérie de la tumeur qui témoigne de la qualité de la résection selon les critères de l'UICC, permettant ainsi de distinguer :

- R0 : marge microscopique saine définie par l'anatomopathologiste qui précise également la qualité du tissu qui la constitue.
- R1 : présence d'un résidu microscopique, la marge est tumorale sur le plan microscopique
- R2 : Existence d'un résidu macroscopique indiqué par le chirurgien dans son compte rendu

Une exérèse R1 ou R2 implique systématiquement une reprise chirurgicale conservatrice à condition que celle-ci soit réalisable.

Les progrès récents en termes de traitements conservateurs ont permis une nette amélioration du pronostic fonctionnel des patients. Si l'amputation a longtemps été une règle dans les sarcomes des membres, elle est actuellement réduite à environ 2% grâce à l'amélioration des procédés de reconstruction, en particulier chez l'enfant en croissance. Le suivi à long terme de ces traitements conservateurs amènent à relativiser ces progrès thérapeutiques, étant donné la fréquence des complications (infections, descellement, fracture) et le taux élevé de récurrence locale à 5 ans qui est de 5 à 25%. D'autres études ont également montré qu'il n'y a aucun gain dans la qualité de vie des patients qui ont bénéficié d'un traitement conservateur (Indelicato DJ, Keole SR et al 2008)

Les principes du traitement chirurgical des tumeurs reposent à l'heure actuelle essentiellement sur la classification de Enneking (Surgical Staging System : SSS) qui utilise les notions de compartiment et de capsule, elle permet de différencier les tumeurs intra-compartimentales des tumeurs extra-compartimentales, et sert de base aux principes d'exérèse (Bui BN et al 2002). Elle distingue différents types

d'exérèse en fonction de l'extension tumorale et de la marge de résection (L.Daniel Latt, Robert E et al 2010) (Y.Miki, S.Ngan 2010) (Bonvalot S, Vanel D et al 2004):

**Exérèse large** : Reste le standard chirurgical, la tumeur est emportée en bloc, et les marges chirurgicales validées par l'anatomopathologiste contiennent 1 à 2cm de tissu sain dans tous les plans et / ou une barrière anatomique (par exemple l'aponévrose).

L'exérèse large est d'autant plus simple que si la tumeur est petite et/ou intra-compartimentale. L'exérèse large permet au chirurgien de passer d'emblée à distance à des niveaux préalablement définis sur l'imagerie et d'éviter au maximum de fragmenter la tumeur.

**Exérèse marginale (ou énucléation ou biopsie exérèse)** : correspond à l'ablation de la tumeur sans tissu sain en périphérie en passant dans le plan de clivage naturel qui se situe au niveau de la pseudo-capsule, ce qui laisse en place un reliquat tumoral microscopique dans les tissus adjacents et expose alors le patient à un risque de rechute locale.

**Amputations ou désarticulations** : Il s'agit d'un type d'intervention qui ne préjuge pas de son caractère large ou non, cependant des marges saines sont plus facilement obtenues par amputation (surtout si la lésion est distale) expliquant ainsi un taux de rechute locale faible à nul allant de 0% à 20%.

**Exérèse intra capsulaire** : Aussi appelée effraction tumorale correspond à une exérèse par fragmentation de la tumeur ou à un drainage de la tumeur (sur un diagnostic pré opératoire erroné le plus souvent, par exemple hématome ou abcès). Elle expose cependant à une poursuite évolutive plus ou moins rapide en fonction du grade de la tumeur, et constitue une indication formelle à la reprise chirurgicale et à la radiothérapie.



La qualité des marges chirurgicales est donc retrouvée, dans la plupart des séries de la littérature, comme un facteur pronostic majeur du contrôle local de la tumeur (Robert C, Martin G et al 2003). Le taux de récurrence locale est significativement plus élevé en cas de résidu tumoral micro-ou macroscopique.

#### **b. Chimiothérapie**

Depuis les années 1960, les chimiothérapeutes ont commencé à traiter les tumeurs d'Ewing selon le protocole VAC (vincristine [V], actinomycine [A], cyclophosphamide [C]), qui a montré une amélioration considérable du pronostic.

Entre 1973 et 1978 un premier essai randomisé conduit par le groupe de l'institut européen des sciences de la santé IESS confirme le bénéfice de la chimiothérapie et démontre le rôle majeur de la doxorubicine (D) (la survie globale à 5ans estimée à 24% pour le protocole VAC, versus 60 % avec le protocole VACD) (Burgert Jr EO, Nesbit ME et al 1990).

Une autre étude conduite par les groupes CCG (Childhood Cancer Group) et POG (Pediatric Oncology Group), entre 1988 et 1992, montre un bénéfice en survie globale lorsqu'il y'a l'association des molécules VDCa avec ifosfamide (I) et étoposide (E) chez des patients non métastatiques (Grier HE, Krailo MD et al 2003).

Les Américains décrivent l'association IE-VDC comme traitement standard des tumeurs localisées permettant d'améliorer le pronostic des patients. En outre, l'intensification des doses d'ifosfamide (Meyer WH, Kun L et al 1992) et l'augmentation du rythme des cures des drogues (régime VDC-IE tous les 15 jours) ont montré récemment un bénéfice sur la survie globale. (Granowetter L, Womer R et al 2009).

Le protocole européen « Euro-Ewing 99 » ouvert depuis 1999 a inclus plus de 2 000 patients adultes et enfants constituant une base de données prospective unique sur cette tumeur rare. Les perspectives thérapeutiques pour les années à venir ne viendront probablement pas de la CT conventionnelle, même si on peut certainement

optimiser les doses d'alkylants et introduire de nouveaux agents (topotécan, docétaxel, témozolomide).

Le groupe français a d'ailleurs établi des recommandations thérapeutiques pour le traitement des rechutes de PNET/Ewing avec cette combinaison «témozolomide-irinotécan », en association avec une chimiothérapie haute dose chez les patients non intensifiés en première ligne, par le biais de son effet synergique, cette combinaison vise à diminuer les récurrences, et donc d'améliorer la survie globale (Wagner LM, McAllister N et al 2007).

L'association topotécan-cyclophosphamide a également montré une efficacité non négligeable dans plusieurs essais de phase II avec probablement une action synergique de ces deux substances (Saylor 3rd RL, Stewart CF et al) (Hunold A, Weddeling N et al 2006).

Enfin, une association d'autres drogues « gemcitabine-docétaxel » a aussi fait l'objet de publications montrant l'effet synergique avec des résultats encourageants sur certains sarcomes comme les PNET/Ewing. Le groupe SARC (Sarcoma Alliance for Research through Collaboration) conduit actuellement un essai de phase II (SARC 003) testant cette combinaison dans les sarcomes des tissus mous et les PNET/Ewing résistant à la chimiothérapie classique.

La molécule trabectedine (ET 743) est un nouvel agent, dont l'efficacité a été reconnue dans les sarcomes et est actuellement évaluée dans une phase II américaine incluant des tumeurs de type PNET/Ewing.

De nouvelles stratégies ont fait dernièrement l'objet de travaux précliniques et cliniques. En effet, les avancées en biologie moléculaire et la compréhension des voies de signalisation ont permis de mettre en route cinq essais de phase II pour évaluer l'efficacité des anticorps anti-IGFR (R1507 de Roche, CP-751-871 de Pfizer, IMC-A12 de ImClone, AMG479 d'Amgen et SCH-717,454 de Schering)(Cassier PA, Dufresne A et al 2008).

Ces anticorps monoclonaux inhibent le récepteur de l'IGF qui est impliqué dans la prolifération des cellules de type PNET/ Ewing (effet anti-apoptotique, mobilité des cellules tumorales et réponse à l'hypoxie). En effet, cette inhibition permet de bloquer la formation de la protéine de fusion « protéine chimère » EWS-FLI1 favorisant ainsi l'apoptose des cellules PNET/ Ewing et une synergie avec d'autres agents cytotoxiques.

D'autres molécules font l'objet de phases III (étude SUCCEED) dans les sarcomes, ce sont les inhibiteurs de mTor (rapamycine, deferolimus, protéine kinase qui a un rôle primordial dans la prolifération de certains cancers) qui agissent en inhibant l'expression de la protéine de fusion EWS/FLI1 et par conséquent ils bloquent la croissance des cellules d'Ewing en phase G1 du cycle cellulaire (Mateo-Lozano S, Tirado OM et al 2003).

Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses semblent être à l'origine des sarcomes de type PNET/ Ewing, d'où l'idée de penser à utiliser des substances thérapeutiques ciblant la différenciation. Le fenrétinide est un dérivé synthétique de la vitamine A capable de ralentir la prolifération de lignées cellulaires de sarcome d'Ewing en favorisant leur différenciation. Il fait actuellement l'objet d'une évaluation dans une étude de phase II anglaise (Myatt SS, Redfern CP et al 2005).

Enfin, des travaux précliniques sont actuellement en cours et certains résultats récemment publiés permettent de donner des perspectives thérapeutiques dans les domaines de l'immunothérapie ou de la thérapie génique. En effet, l'inhibition de l'expression d'EWS-FLI1 par ARN interférent de cellules d'Ewing pourrait aboutir à un ralentissement de la croissance cellulaire, voire à une mort cellulaire programmée. Toutefois, les techniques permettant de libérer les ARN interférents au niveau tumoral restent encore à découvrir

### **c. Radiothérapie**

Etant donné que les tumeurs d'Ewing sont radiosensibles, leur irradiation est parfaitement codifiée et si la chirurgie est considérée le traitement de choix, elle est parfois jugée trop mutilante pour être acceptable (Carrie C, Helfre S et al 1995). Dans ces situations, la radiothérapie est fortement indiquée pour assurer le contrôle local de la maladie et préserver au maximum la fonction des membres et ce d'autant plus qu'il s'agit de patients jeunes. Cependant, les effets secondaires à long terme de l'irradiation et en particulier le risque de tumeurs secondaires font que les décisions thérapeutiques doivent être collégiales, prises par une équipe multidisciplinaire en RCP.

La radiothérapie locale dans les tumeurs d'Ewing peut être exclusive (P. Marec-Bérard, F. Chotel, et al 2010) si la chirurgie n'est pas envisageable ou responsable d'une perte de fonction non acceptable. Aucune étude randomisée n'est disponible, mais certains travaux montrent que le contrôle local obtenu par irradiation exclusive est significativement inférieur à celui obtenu par chirurgie avec ou sans irradiation complémentaire (Bacci G, Ferrari S et al 2003) (Yock TI, Krailo M et al 2006).

Des études allemandes du German Cooperative Group Study CESS-81/86/92, ont montré que le taux de rechutes locales avec la radiothérapie exclusive, toutes tumeurs confondues, était de 26,3 versus 7,5 % après chirurgie  $\pm$  radiothérapie (Yock TI, Krailo M et al 2006). Ainsi, les patients traités par irradiation exclusive constituent un sous-groupe de mauvais pronostic du fait de mauvaises localisations et de leur inopérabilité.

En revanche, lorsqu'il s'agit de tumeur de sites défavorables comme le pelvis, il se pourrait qu'une irradiation exclusive apporte les mêmes chances de contrôle local qu'une chirurgie incomplète suivie d'une irradiation (Bacci G, Ferrari S et al 2003).

Radiothérapie exclusive\_: En termes de dose, en situation exclusive, il est habituellement recommandé de délivrer 45 Gy sur le volume initial tumoral, puis un boost de 10 à 15 Gy sur la tumeur post-chimiothérapie (Donaldson SS 2004). Ces doses sont, bien entendu, à adapter aux possibilités dosimétriques, et à la proximité des organes à risque.

La Radiothérapie adjuvante peut être indiquée\_en cas de résection marginale, où Le bénéfice a été montré dans des études non randomisées (Bacci G, Ferrari S et al 2003).

En cas de mauvaise réponse histologique à la chimiothérapie, facteur pronostique majeur de rechute locale et de survie, l'irradiation aurait également un impact en termes de gain en contrôle local (taux de rechute locale de 10 à 50%) et la préservation de la fonction dans 85 à 90%, sans que l'impact sur la survie ne soit démontré (Bacci G, Ferrari S et al 2003).

L'association chirurgie élargie et radiothérapie est maintenant devenue le traitement standard des SEPM des membres.

L'irradiation postopératoire est habituellement délivrée quatre à six semaines après la chirurgie, la dose variant de 44 à 54Gy sur le lit opératoire, en fonction de la qualité de la chirurgie, de la réponse histologique et des possibilités dosimétriques.

Les principales complications de la radiothérapie postopératoire sont le lymphœdème (surtout dans les sarcomes des racines de cuisse), une fibrose marquée, et plus rarement une radionécrose cutanée ou fracture osseuse, les facteurs de risque de complications sont liés à la taille de la tumeur, à sa localisation et à la présence de complications postopératoires.

L'objectif des irradiations réalisées en préopératoire est de faciliter la résection ou de permettre des reconstructions biologiques tout en évitant les risques liés aux effets secondaires de la radiothérapie (Bacci G, Ferrari S et al 2003). Toutefois, il est décrit dans certaines séries la présence importante des complications de cicatrisation,

après irradiation, compromettant parfois les résultats fonctionnels (P. Marec-Bérard, F. Chotel, et al 2010). Un autre inconvénient de l'irradiation préopératoire, c'est l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie qui est biaisée alors qu'elle est considérée comme facteur pronostique majeur, d'où la difficulté du choix des thérapeutiques adjuvantes.

Les résultats des études, sur l'irradiation bi-pulmonaire prophylactique (IPP), réalisées chez les patients porteurs de tumeurs métastatiques pulmonaires au diagnostic sont controversés. En effet, aucune étude randomisée ne montre l'amélioration de la survie de ces patients grâce à l'IPP, mais plusieurs études rétrospectives menées par de larges groupes coopératifs le suggèrent (Paulussen M, Ahrens S et al 1998).

Le bénéfice de l'IPP (18 Gy sur les deux champs pulmonaires, à adapter pour les patients jeunes) en termes de prévention des récurrences pulmonaires est en cours d'évaluation dans l'étude Euro-Ewing 99 chez les patients porteurs de métastases pulmonaires initiales. La place de l'irradiation des sites métastatiques autres que pulmonaires est également en cours de discussion. En ce qui concerne les techniques d'irradiation, l'irradiation conformationnelle est actuellement le standard. L'intérêt de la radiothérapie hyper fractionnée n'a pour l'instant pas été démontré dans cette indication. L'utilisation de la modulation d'intensité doit être évaluée, afin de réduire si possible la toxicité aux organes à risque, en restant vigilant sur le risque potentiel de majorer le taux de tumeurs secondaires.

En raison de toxicités graves recensées dans le cadre de l'étude Euro-Ewing actuellement en cours (Claude L 2007) et avant toute irradiation, il est judicieux de prendre en considération une éventuelle chimiothérapie antérieure incluant du busulfan à haute dose pour calculer avec précision les doses minimales à délivrer aux organes à risque (moelle épinière, tube digestif, etc.)

**L'association radiothérapie et chimiothérapie concomitante** : est toujours en cours d'évaluation et ne peut être considérée comme un protocole standard. Cette association a surtout été évaluée par l'équipe de l'Université de Californie(UCLA) comme traitement néoadjuvant dans les sarcomes de haut grade localement avancés et inopérables. Les Taux estimés de survie sans récurrence et survie globale à 3 ans étaient respectivement de 56,6% et 75,1% mais au prix de toxicité élevée.

**Radiothérapie après perfusion de membre isolé** : La radiothérapie sur membre isolé et perfusé avec Tumor Necrosis Factor(TNF) et melphalan s'accompagne de réponses objectives impressionnantes. La chirurgie a pu être conservatrice chez 85% des patients (référence).

Les groupes européens (Société française des sarcomes de l'enfant : SFCE, Groupe sarcome français : GSF, SIAK, European organisation for research and treatment of cancer :EORTC, et European intergroup cooperative Ewing's sarcoma study : EICESS) et plus récemment américains (Children's oncology group : COG) se sont réunis dans le cadre d'établir un protocole standard international «le protocole Euro-Ewing 99» qui repose sur l'association de 2 à 6 médicaments anticancéreux (vincristine, actinomycine D, cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicine, adriamycine, l'étoposide, le busulfan, le melphalan, et le carboplastine), la comparaison des toxicités de l'ifosfamide et du cyclophosphamide, la mise en place de la chimiothérapie haute dose avec support de CSP(cyclophosphamide) dans les tumeurs d'Ewing de haut risque et en particulier la comparaison de cette dernière à la radiothérapie bi-pulmonaire dans les formes métastatiques aux poumons.

Le groupe Euro-Ewing définit donc une prise en charge standardisée à chaque stade de la maladie pour les sarcomes d'Ewing et les PNET, excepté les PNET du système nerveux central.

## Protocoles Euro-Ewing 99

### Chimiothérapie d'induction : 6 cures de VIDE :

Vincristine-Ifosfamide-Doxorubicine-Etoposide

### Chimiothérapie à haute dose :

Busulfan-Melphalan

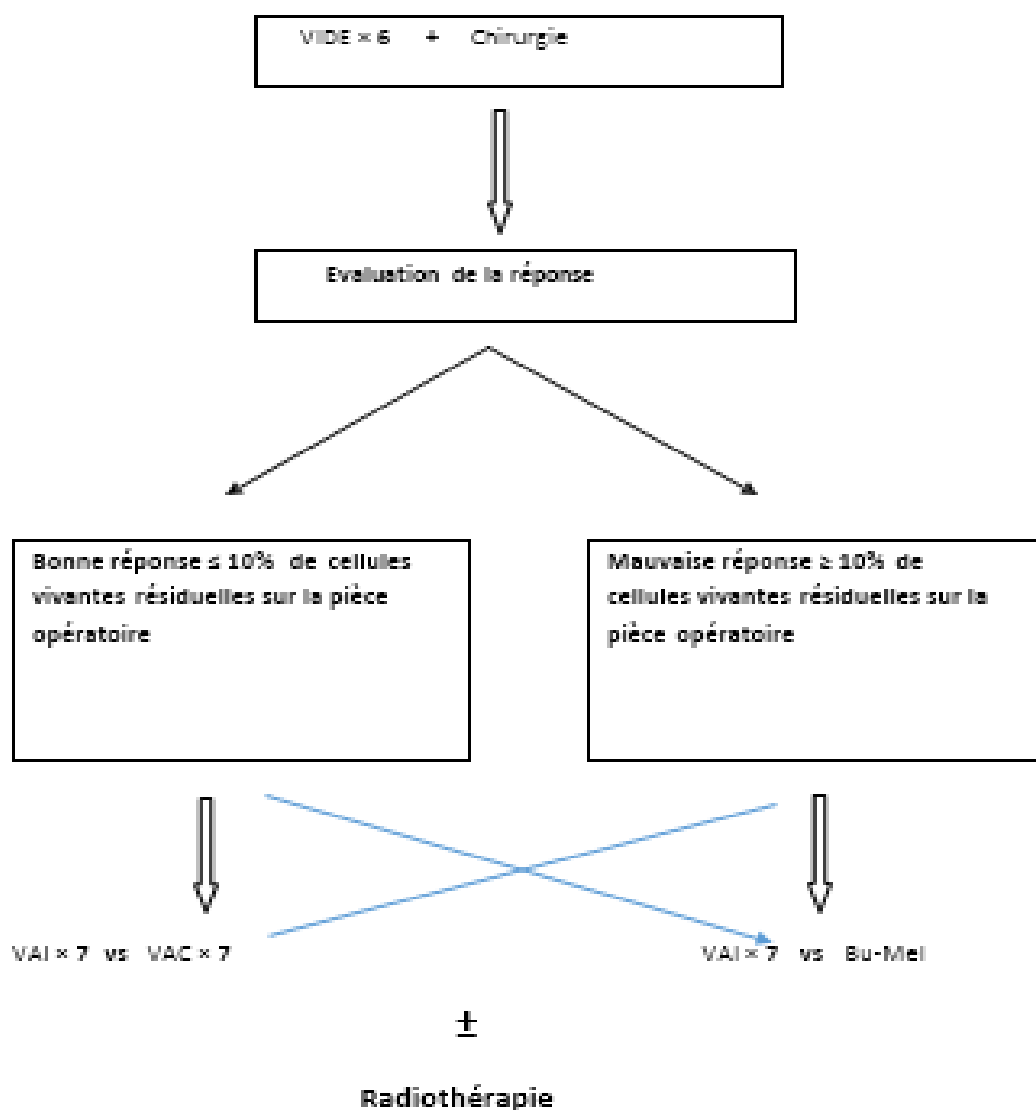
### Radiothérapie :

- Exérèse complète + bonne réponse histologique  $\implies$  pas de radiothérapie
- Exérèse complète + mauvaise réponse histologique  $\implies$  radiothérapie à la dose de 40Gy.
- Exérèse incomplète  $\implies$  radiothérapie à la dose de 44-54Gy.
- Pas de chirurgie  $\implies$  radiothérapie à la dose de 55-60GY.

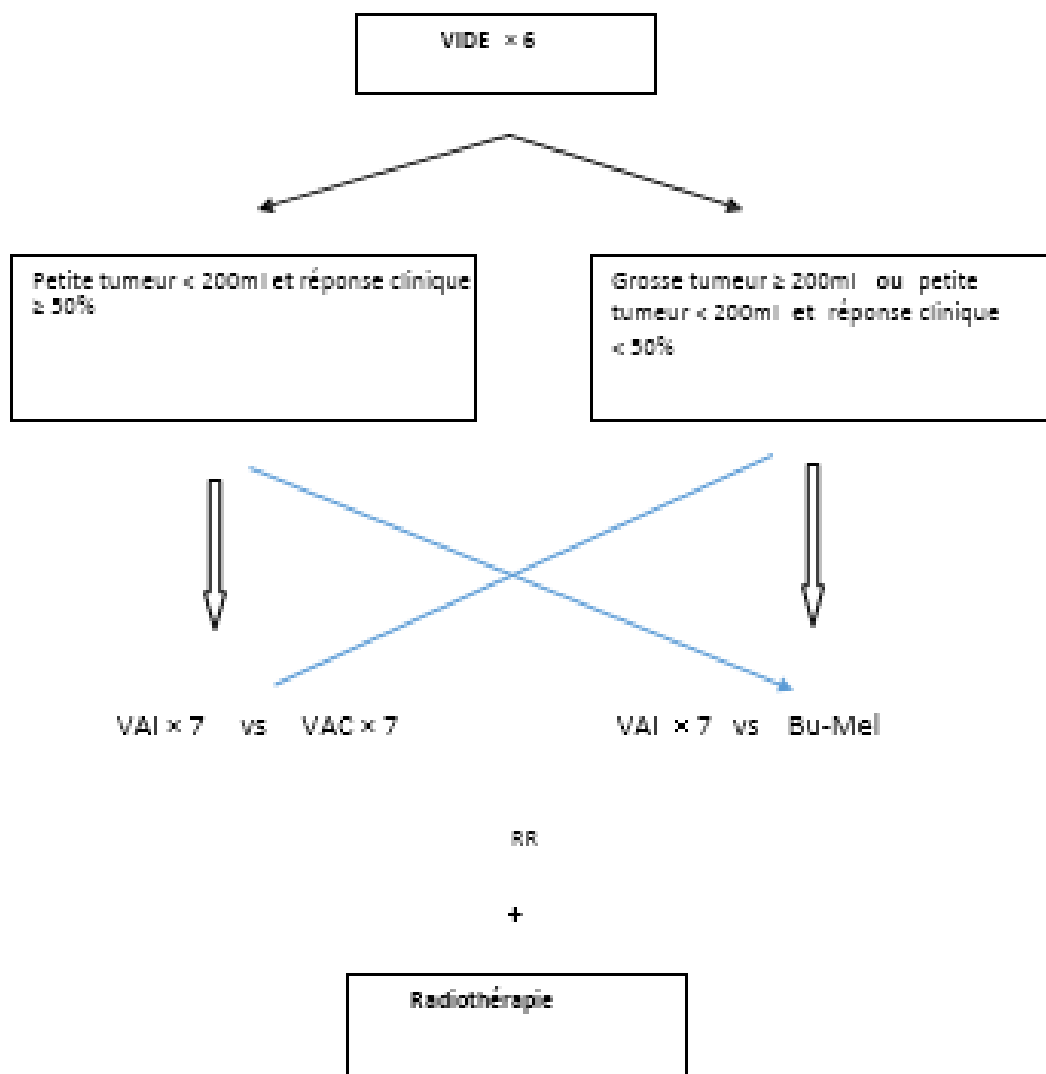


|

*Protocole Euro-Ewing 99 : Tumeurs localisées opérables*



Protocole Euro-Ewing 99 : Tumeurs localisées inopérables



**Hyperthermie associée à la radiothérapie** : semble améliorer l'oxygénation des tissus sarcomateux. Il en résulterait une réponse histologique meilleure, mais paradoxalement la survie sans récurrence est moindre chez les patients ayant une tumeur nécrotique, l'hypoxie pré thérapeutique permettant ainsi d'identifier un groupe de plus mauvais pronostic.

Néanmoins, le risque de complications postopératoire (autour de 40%) est important, et l'infrastructure nécessaire pour mettre en œuvre un tel traitement reste un facteur limitant de cette association potentiellement intéressante.

**Radiothérapie et radio-sensibilisants** : En 1996, une étude randomisée a évalué le razoxane comme agent radiosensibilisant, soit en cas de radiothérapie exclusive, ou de radiothérapie postopératoire. Aucune efficacité n'a été observée en situation post-opératoire. Un autre radiosensibilisant évalué dans les sarcomes localement avancés est l'iododéoxiridine associé à une radiothérapie hyper-fractionnée (65 à 75 Gy) en situation préopératoire. Même si les résultats en termes de contrôle local sont intéressants, le risque de rechute à distance est tel qu'il ne peut être préconisé. L'isofosfamide a également été utilisé dans des petites séries qui ont présenté des résultats encourageants (Bui BN et al 2002).

**Neutron-thérapie** : L'utilisation de neutrons a fait l'objet d'un rapport de l'agence nationale pour le développement de l'évaluation médicale (ANDEM) en 1995. L'hypoxie au sein des sarcomes est connue. Ce phénomène est le fait d'une composante nécrotique plus ou moins importante avec de nombreuses cellules hypoxiques ou anoxiques réputées plus ou moins radio résistantes. Ces caractères peuvent donc être en faveur de l'utilisation de particules lourdes telles que les neutrons. Cette technique a une place importante dans le traitement des sarcomes de bas grade ou inopérables, ou chez des patients à haut risque de rechute locale en raison de l'impossibilité de reprise après chirurgie marginale.

**Curiethérapie** : La curiethérapie devient de plus en plus utilisée dans le traitement des sarcomes d'Ewing des parties molles. Il s'agit le plus souvent d'une curiethérapie à bas débit de dose (iridium 192) (Alektiar KM, Leung D et al 2002). Pour la plupart des équipes l'implantation est effectuée en peropératoire avec des méthodes de chargement différé. Ce dernier est supérieur ou égal à 5 jours en cas de curiethérapie exclusive, mais peut être réduit à 2 ou 3 jours si la dose n'excède pas 20Gy. En bas débit de dose, la dose varie selon que la curiethérapie est exclusive (45 à 60Gy) ou associée à une radiothérapie externe (15 à 20Gy) avec un débit de dose de l'ordre de 0,5Gy/h. L'objectif de la curiethérapie est donc de délivrer une dose importante au lit tumoral (défini par le lit opératoire) tout en limitant la dose aux tissus sains périphériques grâce aux propriétés spécifiques de la curiethérapie : dose très importante au contact des lignes actives, décroissant très vite en périphérie. Le traitement doit être débuté dès les premiers jours postopératoires, ce qui est un avantage sur le plan radio-biologique.

Certaines complications ont été rapportées dans différentes séries, notamment les neuropathies (9% dans la série de Zelefsky), les nécroses (35% dans la série de l'Institut Gustave Roussy), ainsi que des fractures osseuses dans 3% des cas.

#### **d. Pronostic**

Un des problèmes majeurs posés dans la prise en charge des sarcomes d'Ewing des tissus mous reste la détermination de facteurs pronostiques clairs permettant de classer des populations à risque faible ou élevé de récurrences locales ou de développement de métastases à distance, afin de poser l'indication d'un traitement adjuvant quand cela est nécessaire.

Il n'y a pas à l'heure actuelle d'unanimité concernant les facteurs pronostiques permettant de définir avec certitude ces groupes. La plupart des études retrouvées dans la littérature concernent des séries de patients hétérogènes que ce soit en termes

de caractéristiques tumorales ou de traitements réalisés. Cependant nous avons pu regrouper les facteurs suivants (Robert C, Martin G et al 2003) :

**Le grade histologique** est retrouvé dans la majorité des études comme le facteur pronostic majeur de la survie sans métastase et de la survie globale. Une confirmation histologique de la présence d'un sarcome est nécessaire avant de réaliser un grading (Bui BN et al 2002). Plusieurs systèmes de grading existent et utilisent des paramètres histologiques différents. Les 2 systèmes les plus utilisés sont celui du National Centre Institute (NCI) et celui de la Fédération Nationale de Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC).

**La taille tumorale** : La relation entre la taille de la tumeur et la survie globale sans métastases est connue depuis longtemps et a été prouvée dans de nombreuses études. La majorité des études dans la littérature opposent les tumeurs de plus de 5cm, aux tumeurs de moins de 5cm, ou les tumeurs de plus de 200ml aux tumeurs de plus de 200 ml (Robert C, Martin G et al 2003). Une différence significative en termes de rechute locale peut être trouvée entre les tumeurs de plus de 10cm.

**L'importance de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante** constitue le facteur pronostic le plus important (Robert C, Martin G et al 2003). Une bonne réponse à la chimiothérapie première est définie par un résidu tumoral < 10 %, c'est-à-dire que l'examen anatomo-pathologique de la tumeur après chimiothérapie montre qu'il subsiste moins de 10 % de cellules cancéreuses dans la tumeur.

**Marges chirurgicales** : La qualité des marges d'exérèse est retrouvée comme un facteur pronostic majeur du contrôle local de la tumeur dans la plupart des séries de la littérature (Robert C, Martin G et al 2003). Le taux de récurrence locale est significativement plus élevé en cas de résidu tumoral micro-ou macroscopique.

**La nécrose tumorale** : La survie à 5 ans est de 80% en l'absence de nécrose tumorale et tombe à 50% quand il existe une. Elle est observée dans 50% des sarcomes (Bui BN et al 2002), cependant, il n'existe pas de consensus sur la manière de l'évaluer.

**L'invasion néoplasique des vaisseaux** intra tumoraux s'observe dans environ 25% des cas. En sa présence, la survie à 5 ans sans métastases est diminuée de moitié.

**Profondeur tumorale** : Plusieurs études ont retrouvé la profondeur tumorale comme un facteur de mauvais pronostic indépendant en termes de rechute locale, de survie sans métastases, ou de survie globale.

**Localisation anatomique** : Les sarcomes des tissus mous localisés aux membres, en particulier les membres inférieurs, ont, dans la littérature, un meilleur pronostic en termes de survie globale que les sarcomes du tronc ou rétro péritonéaux.

**La réalisation d'une radiothérapie** a été retrouvée comme facteur indépendant favorable en analyse multi variée pour des patients dont le traitement locorégionale avait comporté une chirurgie non radicale dans 96% des cas.

**Anomalies génétiques et moléculaires** : Des gains en 1q et des pertes en 18p ont été corrélés à une aggravation du risque métastatique. La cytogénétique n'est pas toutefois une méthode pronostique applicable en routine.

Dans des cadres pathologiques définis, on peut également évoquer la possibilité d'un pronostic différent selon l'état d'un marqueur moléculaire, comme la corrélation pronostique décrite entre l'état muté et amplifié de P53 dans le sarcome d'Ewing.

**Marqueurs de prolifération** : Si la ploïdie n'apparaît pas comme un facteur pronostique (Bui BN et al 2002), l'étude de la prolifération tumorale par cytométrie de flux a montré une valeur pronostique indépendante de la fraction en phase S. Dans l'étude du Groupe Sarcome Français (GSF), le pourcentage de phase S s'est avéré supérieur au grade, ressortant comme seul facteur indépendant pour la survie globale dans un sous-groupe sans métastase initiale.

Cependant, cette étude a été grevée par un taux d'échec de mise en œuvre de la méthode (39%). En effet, la mise en évidence d'antigènes spécifiques du cycle cellulaire tel que le Mib1, sur tissus fixés en paraffine, a été trouvée corrélée au pronostic général des sarcomes des tissus mous. Le niveau de coupure pour la définition des groupes a varié de 10% à 30% de cellules marquées. Ce facteur a été étudié en analyses multi variées et est apparu comme une variable pronostic indépendante. Hasegawa et al, ont par ailleurs proposé de reconsidérer le système de grading de la FNCLCC en utilisant Mib1 à la place de l'index mitotique, le grade ainsi modifié s'est avéré plus discriminant que le grade original (Hasegawa T, Yokoyama R et al 2001).

Avant l'ère de la chimiothérapie, le pronostic des patients atteints de tumeurs d'Ewing était effroyable avec, dans plus de 90 % des cas, des décès liés à une évolution métastatique (Patricio MB, Vilhena M et al 1991). Les poly-chimiothérapies introduites dans les années 1960 ont permis d'améliorer ce pronostic avec des chiffres de guérison à cinq ans actuellement estimés à 65-70 % dans les formes localisées (Burgert Jr EO, Nesbit ME et al 1990) (Craft A 2002) et 25-30 % dans les formes métastatiques. Ces chiffres chutent à moins de 10 % quand les métastases sont osseuses ou ostéo-médullaires (Pinkerton CR, Bataillard A et al 2001) (Oberlin O, Rey A et al 2006).

L'individualisation des facteurs pronostiques, comme la présence de métastase, la qualité de l'exérèse chirurgicale, la réponse histologique à la chimiothérapie, le volume tumoral, le site tumoral initial, a permis une optimisation de la prise en charge.

La détection de micro-métastases circulantes par RT-PCR a aussi été récemment décrite comme un facteur pronostique à prendre en compte (Schleiermacher G, Peter M et al 2003) (Vermeulen J, Ballet S et al 2006). Le type de transcrit de fusion a été rapporté comme ayant une valeur pronostique par certains

auteurs (Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B et al 1996) (de Alava E, Kawai A et al 1998), mais les résultats des analyses récemment réalisées dans le cadre de l'essai Euro-Ewing 99 contredisent ces données.

Les tumeurs d'Ewing localisées rechutent dans 30 à 40 % des cas, principalement sous forme métastatique ou combinée. Les chances de guérison sont alors limitées avec des chiffres de survie à cinq ans qui peuvent aller jusqu'à 30 % pour les rechutes locales ou strictement pulmonaires, mais qui sont beaucoup plus péjoratifs dans les rechutes osseuses ou multiples.



# MATERIEL

# ET METHODES

## **I. Matériel :**

Nous avons mené une étude rétrospective dans le service de génétique/oncogénétique de l'hôpital universitaire Hassan II de Fès. Pour cela, nous avons exploité les cas des sarcomes d'Ewing diagnostiqués de janvier 2014 jusqu'à fin janvier 2017, soit un total de 47 patients.

## **II. Méthodes :**

### **1. Fiche d'exploitation :**

Notre fiche d'exploitation contenait les renseignements suivants :

- L'identité du malade
- L'âge et le sexe
- La localisation de la tumeur.
- L'exploitation radiologique s'il y'en a
- Les résultats anatomopathologiques.
- Les résultats de la biologie moléculaire

### **2. Etude macroscopique :**

L'examen macroscopique constitue une étape primordiale de l'étude anatomopathologique, permettant d'élaborer une description détaillée de la pièce d'exérèse. Cette dernière, une fois arrivée au service d'anatomopathologie, doit être examinée, mesurée, pesée puis disséquer. Ensuite, les lésions repérées sont transcrites sur un schéma, et éventuellement photographiées. Le marquage des berges de la pièce de résection est essentiel, il permet d'apprécier exactement la distance entre la tumeur et la limite chirurgicale de la pièce, cependant, il est utile d'utiliser une encre indélébile pour ne pas nuire à l'étude histologique.

Au terme de l'examen macroscopique, il est possible de sélectionner les territoires à prélever pour étude microscopique ainsi que de choisir les prélèvements destinés à cette étude. Par ailleurs, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines pour d'éventuels prélèvements complémentaires.

Ces constatations sont confrontées aux documents cliniques et/ou radiologiques, ce qui souligne l'importance des renseignements écrits fournis par le médecin clinicien.

### **3. Histologie**

Différentes étapes successives permettent l'obtention des coupes nécessaires à l'étude histologique ; qui sont : la fixation, l'inclusion en paraffine, la confection de coupes et leur coloration.

Avant la fixation, il est possible d'effectuer sur le tissu frais des appositions sur lames pour une étude cytopathologique, et des prélèvements pour des techniques particulières :

- la congélation ;
- la fixation adaptée à la microscopie électronique ;
- la mise en culture pour étude cytogénétique.

#### ✓ Fixation

La fixation est une étape indispensable pour l'étude histologique des prélèvements humains, elle permet la préparation des tissus en s'opposant à l'autolyse tissulaire, afin de conserver la morphologie cellulaire et garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. En effet, une fixation mal réalisée rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible. Elle doit être débutée immédiatement après l'obtention du prélèvement ou très rapidement après.

Le choix du fixateur dépend de la nature du tissu à couper, néanmoins le fixateur le plus couramment utilisé reste le formol à 10% tamponné. D'autres fixateurs notamment à base d'alcool peuvent être utilisés, en particulier pour les biopsies de petites tailles, ils permettent d'obtenir une fixation rapide, mais ont un effet délétère sur certains antigènes parfois nécessaires pour des études immunohistochimiques.

La taille du prélèvement détermine le volume du fixateur nécessaire qui doit représenter 10 fois le volume de la pièce ainsi que la durée de fixation qui varie de 2h s'il s'agit d'une biopsie jusqu'à 48 heures pour une pièce opératoire.

✓ Imprégnation et inclusion :

Le but de cette étape est de remplacer l'eau contenu dans les tissus par de la paraffine afin de les rendre chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants et facile à couper. La « paraffine », au sens histologique du terme, est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelquefois de cires.

Les prélèvements ayant achevé leur fixation sont déposés dans des cassettes en plastique, directement s'il s'agit de biopsies ou après l'étape d'examen macroscopique au cours de laquelle sont prélevés des fragments de petite taille en moyenne 2 x 0,3 cm s'il s'agit de pièces opératoires. Puis les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage dans 5 bains d'alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu. Cette étape permet de débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient l'alcool d'abord qui sera éliminé par le toluène, puis la paraffine liquide à 56 °C qui imprènera les tissus et qui sera par la suite refroidie. Ces étapes sont automatisées dans des appareils à inclusion. L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine .

✓ Coupes et colorations :

Des coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome puis immergées dans de l'alcool pour être par la suite étalées sur des lames en verres.

Après dissolution de la paraffine et réhydratation, une coloration histologique est réalisée permettant d'accentuer les contrastes pour mieux différencier les éléments du tissu. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hémateïne, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythroline, ou phloxine).

Le déparaffinage repose sur plusieurs étapes :

- Dans un premier temps, les lames contenant les coupes tissulaires sont passées à l'étuve à 58–60 C pendant toute une nuit, puis elles sont traitées par deux bains successifs de toluène pour une durée de 5min chacun, ce qui permet d'enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants puissent pénétrer le tissu et le colorer.
- Ensuite le tissu est mis dans des bains d'éthanol à concentration croissante durant 5min pour chaque bain.
- Puis, un lavage pendant 1 min à l'eau courante est réalisé.

Après le déparaffinage vient l'étape d'application des colorants, elle se déroule comme suit :

- Les lames sont d'abord immergées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 min.
- Puis elles sont lavées à l'eau courante pendant 1 min, avant un passage dans des bains d'alcool chlorhydrique et d'alcool ammoniacal.
- Après un rinçage à l'eau courante, elles sont mises dans un bain d'éosine à 2% pendant 5 min.

- Ensuite un passage rapide dans une succession de bains d'alcool à concentrations croissantes est réalisé. Les lames passent alors dans un bain de safran pendant 10 min avant de passer dans un bain d'éthanol-méthanol pendant 1 min puis dans un bain de toluène.

Une fois la coloration terminée, à l'aide d'un milieu de montage, une lamelle de verre est fixée sur la coupe tissulaire. Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

Les lames colorées sont ensuite transmises au médecin anatomopathologiste pour identifier les zones contenant des cellules tumorales.



**Figure 5 : Image d'un microtome pour réalisation des coupes.**

#### **4. Immunohistochimie :**

L'immunohistochimie consiste à mettre en évidence des antigènes cellulaires grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre eux. Les antigènes recherchés peuvent être des antigènes membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires.

L'étude immunohistochimique passe tout d'abord par le déparaffinage des coupes tissulaires. Cette étape consiste en un passage à l'étuve à 60°C pendant une nuit, puis s'ensuivent 2 bains de toluène à 10 min chacun, 3 bains d'alcool absolu à 5 min chacun et enfin un rinçage à l'eau courante pendant 10 min.

Plusieurs étapes suivent le déparaffinage et se succèdent comme suit :

Un passage des lames égouttées dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% pendant 10 min est nécessaire pour bloquer les peroxydases endogènes qui sont à l'origine des réactions aspécifiques. Puis on réalise un rinçage à l'eau courante durant 10 min, suivi d'un démasquage antigénique après passage dans du tampon citrate (pH=6 et chauffé à 96°C pendant 25 min) et un rinçage rapide d'abord à l'eau courante puis avec du PBS (tampon Phosphate Buffered Saline) pendant 5 min. Les lames sont ensuite égouttées et les fragments sont entourés par le PAP-PEN pour un marquage de la zone tumorale. Il faut ensuite mettre le bloquant sur le fragment à raison de 1 à 2 gouttes par fragment et disposer les lames dans une chambre humide. 15 min plus tard, on enlève le surplus du bloquant en secouant, puis on applique de l'anticorps primaire à raison d'1 à 2 gouttes par fragment, ensuite les lames sont disposées encore une fois dans une chambre humide durant 1 heure. A la fin, on égoutte les lames et on les rince dans du PBS (2 bains à raison de 5 min/bain). Dans un deuxième temps, on applique l'anticorps secondaire (1 à 2 gouttes par fragment) et on remet les lames dans la chambre humide. Une heure plus tard, on rince à nouveau et à deux reprises dans du PBS (5 min par bain). Il s'ensuit une application de la peroxydase pendant 15 minutes et deux rinçages de 5 minutes toujours dans du PBS. Après séchage des lames, on

applique sur chacune d'entre elles une solution de révélation fraîchement préparée (5ml d'Amino-Ethyl-Carbazole (AEC) et 2 gouttes dechromogène) pendant 30 min. Et on termine le protocole par un rinçage de 10 min à l'eau courante, suivi de l'application de 2 min de l'hématoxyline, rinçage pendant 10 minute à l'eau courante et enfin un montage lames-lamelles à l'eau.

Pour le diagnostic des sarcomes d'Ewing, le marquage immunohistochimique repose sur l'anticorps anti-CD99 ; la CD99 est une glycoprotéine transmembranaire codée par le gène MIC2. L'expression de la protéine CD99 est détectée dans une large variété de tumeurs dont le sarcome d'Ewing. Le marquage est considéré positif lorsque les cellules tumorales présentent un marquage membranaire.



**Figure 6 : Image d'une station d'IHC avec les différents bains de coloration**



## 5. Cytogénétique moléculaire : hybridation in situ fluorescente (FISH)

### ✓ Principe général et caractérisation des sondes

L'hybridation in situ fluorescente ou « Fluorescent in situ hybridation : FISH » est une technique de cytogénétique moléculaire qui repose sur la propriété d'hybridation complémentaire et spécifique des acides nucléiques en utilisant une molécule d'ADN marquée par un ou plusieurs fluorochromes, appelée sonde. Grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques et selon les conditions précises de température, de salinité et de Ph, ces sondes s'hybrident spécifiquement avec leurs séquences cibles au niveau de la préparation chromosomique dénaturée.

Le signal est ensuite observé à l'aide d'un microscope à épi fluorescence muni de filtres spécifiques capables de sélectionner, à partir de la lumière blanche émise par la source lumineuse du microscope, un faisceau d'une longueur spécifique excitatrice du fluorochrome intégré dans la sonde. Chaque fluorochrome est caractérisé par une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ) et une longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ). Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- Le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) ( $\lambda_{exc}$  310nm–  $\lambda_{em}$  372nm) est une contre-coloration nucléaire utilisée fréquemment dans les techniques fluorescentes multicolores. Il colore de façon spécifique le noyau pour laisser distinguer les autres sondes fluorescentes.
- Le FTIC (Fluorescein isothiocyanate) fluoresce dans le vert.
- La Cyanine 3 (Cy3) fluoresce dans l'orange.
- Le Texas red fluoresce dans le rouge.
- La Cyanine G fluoresce dans le rouge.
- La Cyanine 5.5 fluoresce dans le rouge.

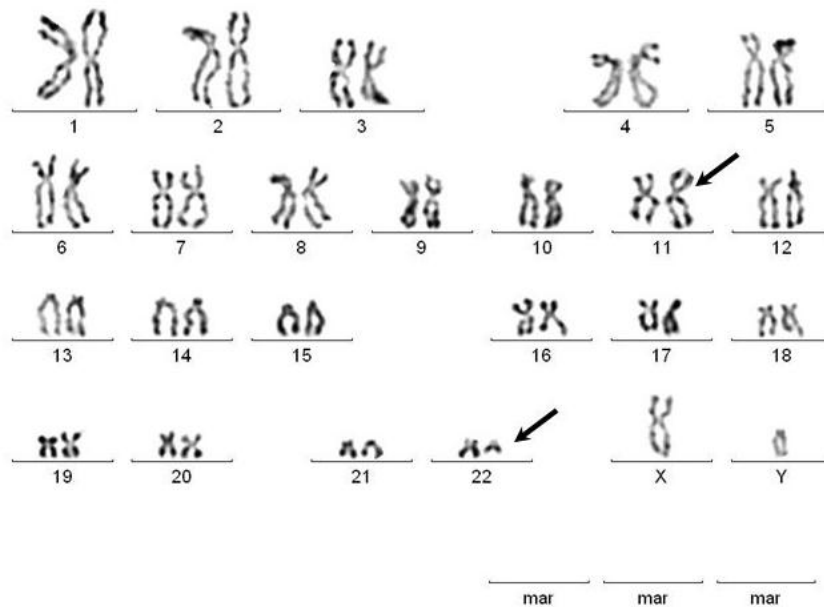
Les sondes type « break apart » sont utilisées pour la mise en évidence de la translocation du gène EWRS1, observée dans les sarcomes d'Ewing. Ce sont des

sondes encadrantes d'un point de cassure et donc permettent la détection du réarrangement du gène EWSR1 dans le sarcome d'Ewing/PNET sur un locus d'intérêt. Le point de cassure est encadré par deux sondes marquées chacune par un fluorochrome différent « Red ou Rouge et FITC ou V ».

Les sondes break apart génèrent deux signaux rouge et vert pour un noyau diploïde, alors que la cassure de l'ADN au locus d'intérêt engendre une séparation du signal en deux signaux distincts R et V. Le profil d'hybridation apparaît | R | V | marquant la cassure. Ce type de sondes appelées split ou break apart permet la détection d'une translocation au locus étudié indépendamment de son partenaire.



Figure 7 : Image d'un appareil d'hybridation in situ par fluorescence.



**Figure 8 : Caryotype d'un sarcome d'Ewing montrant des anomalies chromosomiques des chromosomes 11 et 22**

✓ Protocole standard de la technique FISH

La mise au point de cette technique sur tissu a été réalisée par les doctorants scientifiques sous la supervision du Pr BENNIS au sein du laboratoire de Génétique médicale du CHU Hassan II de Fès.

Des coupes du tissu tumoral fixé et inclus en paraffine sont réalisées pour chaque patient et étalées sur des lames Superfrost. Les lames sont ensuite incubées à 58 degré pendant toute la nuit.

La suite de la technique se déroule selon les étapes suivantes :

- Déparaffinage

Les lames sont immergées dans deux bains de toluène pendant 10min chacun, et ensuite dans deux bains d'éthanol absolu pendant 5min chacun. Les lames sont ensuite séchées sur le THERMOBRITE pendant 3 à 5 min ou à température ambiante.

- Prétraitement et traitement à la pepsine

Les lames sont placées pendant 35min dans une solution de prétraitement 1xSSC préalablement chauffée à 80 degré au bain-marie. La température et la durée du prétraitement ont été mises au point. Ensuite, les lames sont immergées dans de l'eau distillée pendant 3 min et à température ambiante. Une digestion enzymatique est alors réalisée à l'aide de la pepsine sous une température à 37 degré. Après un lavage à l'eau distillée pendant 3min à température ambiante, les préparations sont déshydratées par passage dans un gradient d'éthanol puis séchées.

- Hybridation par les sondes :

Une fois que les lames sont séchées, on dépose 10µl de sonde sur la lame, puis on couvre toute la section tissulaire par la lamelle et on scelle à l'aide de Rubber-cement. Placer la lame dans le Thermobrite et laisser incuber à 37°C pendant environ 5 min avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation.

- Lavages post-hybridation

A partir de cette étape, veiller à travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes. A la fin de l'hybridation, sortir les lames du Thermobrite, retirer le Rubbercement sans retirer la lamelle et placer la lame dans la solution de lavage 2X SSC/NP40 laissée à température ambiante pendant 30 s à 1 min, ensuite retirer délicatement les lamelles et transférer les lames dans la solution 2X SSC/0,3NP40 à 73°C pendant 3 min. Retirer les lames de la solution à 73°C et effectuer rapidement un rinçage dans la solution à température ambiante. Mettre les lames à sécher à l'obscurité.

- Contre coloration des noyaux au DAPI

Déposer 10 à 20 µl de DAPI sur la section tissulaire, puis couvrir avec une lamelle et placer les lames dans des boîtes opaques à 4°C pendant au moins 5 min avant de procéder à la lecture sous microscope.

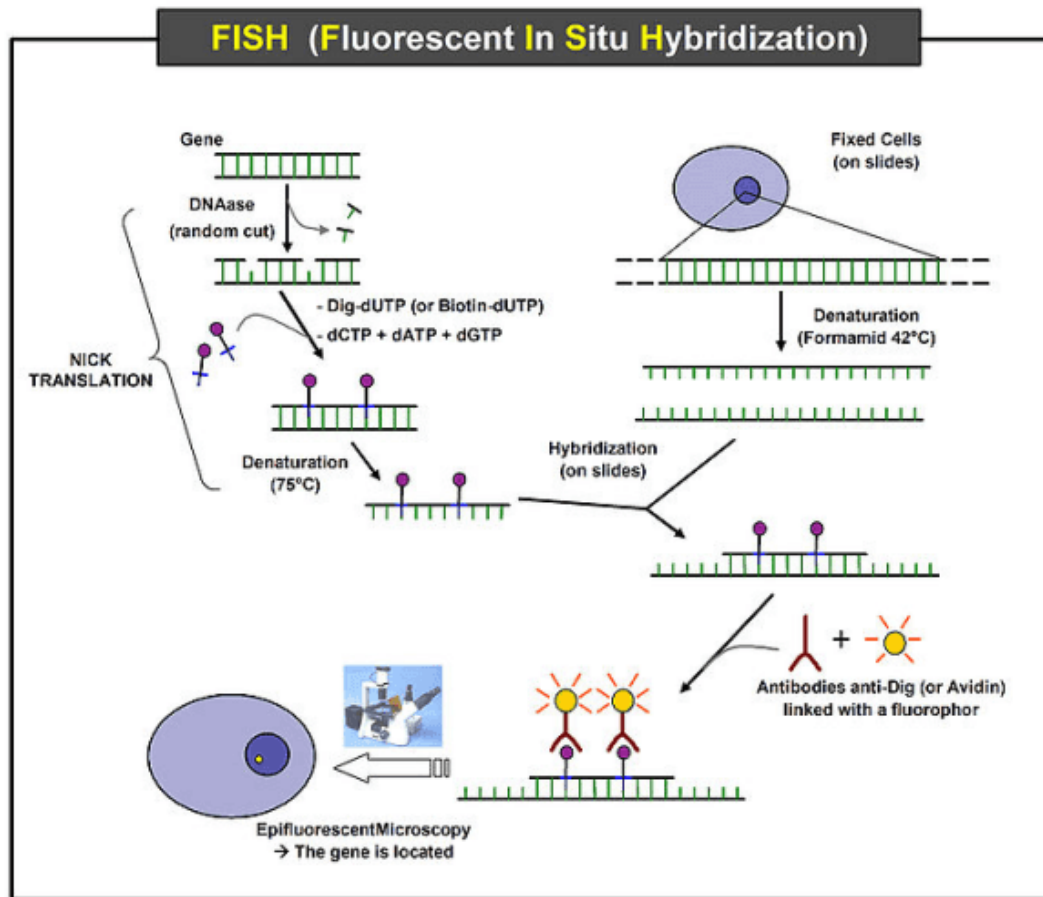


Figure 9 : Principe de l'hybridation in situ par fluorescence (FISH)

## 6- Biologie moléculaire

L'étude des transcrits de fusion à partir des blocs tumoraux émane d'une collaboration entre le laboratoire de pathologie et biologie moléculaire de la faculté de médecine de Genève (Suisse) et le laboratoire de biologie moléculaire de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès (Maroc).

- **RT-PCR**

L'analyse consiste à une extraction d'ARN à partir de tissu fixé et inclus en paraffine, ce qui nécessite d'abord un déparaffinage, suivi d'une lyse tissulaire. Après isolement et extraction d'ARN, on procède à la conversion de l'ARN et sa synthèse en ADN complémentaire (ADNc) par reverse transcriptase PCR (RT-PCR) tout en utilisant l'enzyme transcriptase inverse.

L'ADNc ainsi obtenu est amplifié par la technique PCR pour l'identification des transcrits de fusion EWSR1-FLI1 et EWSR1-ERG dans le sarcome d'Ewing/PNET.



**Figure 10** : Image de l'appareillage nécessaire pour extraction d'ADN et d'ARN.

- **Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

La technique de PCR consiste à obtenir in vitro un grand nombre de copies d'une séquence d'ADN, en passant par une succession de cycles. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes clés qui sont :

- La dénaturation de l'ADN par application d'une haute température (95°C)
- L'hybridation des amorces avec la séquence d'ADN se fait à une température entre 50 et 60°C.
- L'élongation se fait à une température de 72°C par l'intermédiaire de l'ADN polymérase

Les amorces utilisées sont issues des gènes FLI1 et ERG et sont soumises au programme de PCR suivant :

**Tableau 7 : Programme de la PCR des transcrits de fusion EWSR1-FLI1 et EWSR1-  
ERG.**

Nombre de cycles	Température	Temps
1	95°C	7 min
	94°C	30 sec
40	65°C	30 sec
	72°C	30 sec
1	72°C	10 min
1	4°C	∞

Après la réaction de PCR, une purification du produit de PCR a été réalisée à partir du gel d'agarose, suivie d'un séquençage qui a pour but de séparer les différents fragments d'ADN amplifié selon leur taille par électrophorèse capillaire.

### III. Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel EPI INFO 3.4, en collaboration avec le service d'épidémiologie de la FMPF.

# RESULTATS

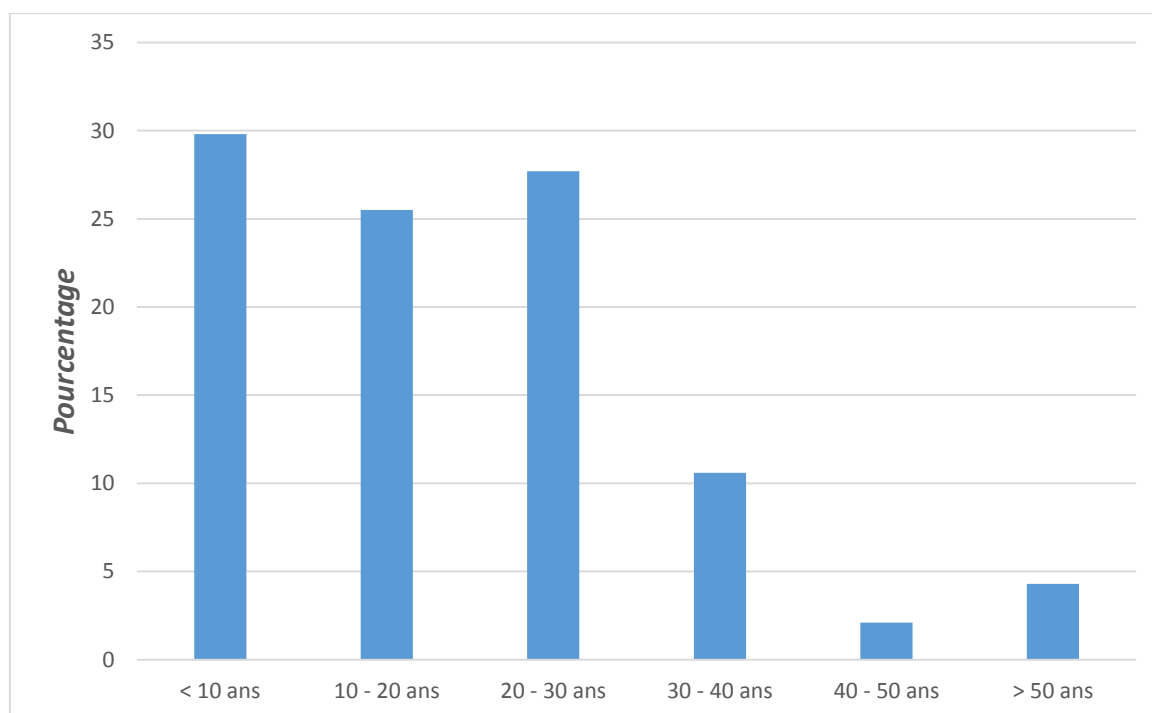


## 1 – Répartition selon l'âge :

Sur les 47 cas étudiés, l'âge des patients au moment du diagnostic variait entre 3 et 62 ans avec une médiane de 19 ans et un écart type de 14,16. On note un pic d'incidence pour la tranche d'âge inférieure à 20 ans.

**Tableau 8** : Répartition selon trois tranches d'âge.

Tranche d'âge	Nombre de cas
Moins de 20 ans	26
Entre 20 et 40 ans	18
Plus de 40 ans	3



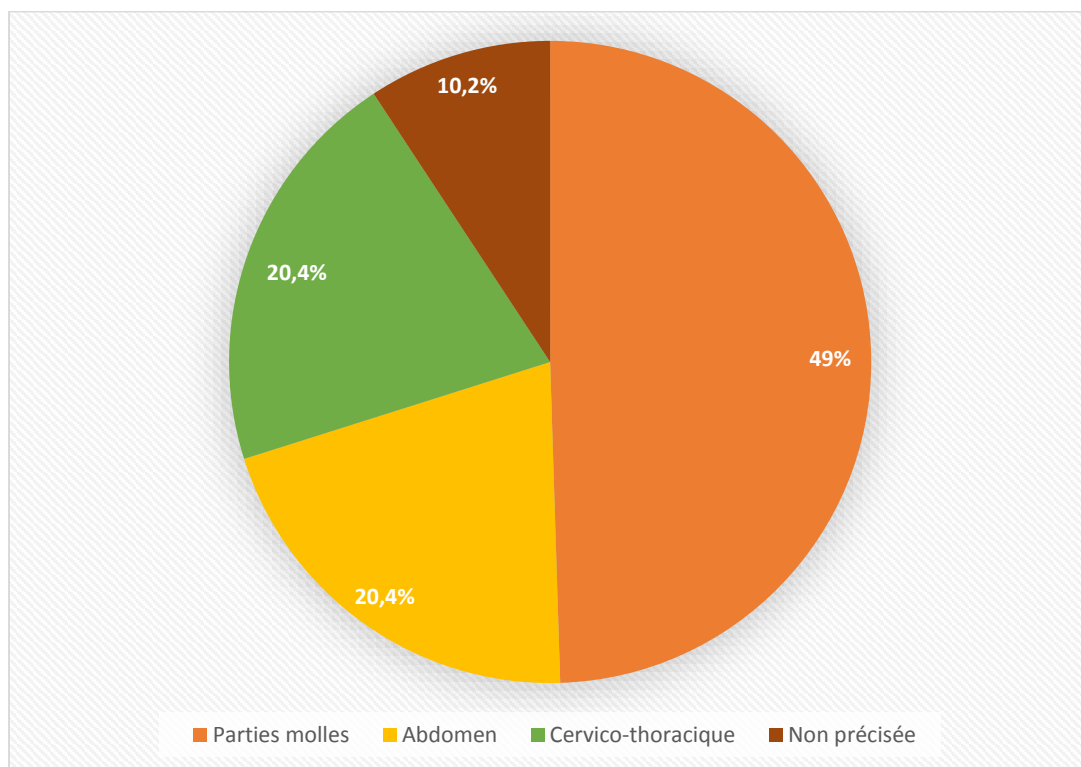
**Figure 1** : Pourcentage des sarcomes selon l'âge

## **2- Répartition selon le sexe :**

L'étude de la répartition selon le sexe montre une prédominance masculine avec 31 hommes, (soit 66 %) et 16 femmes, (soit 34 %) ; avec un sex-ratio M/F de 1.94.

## **3- Répartition selon la localisation :**

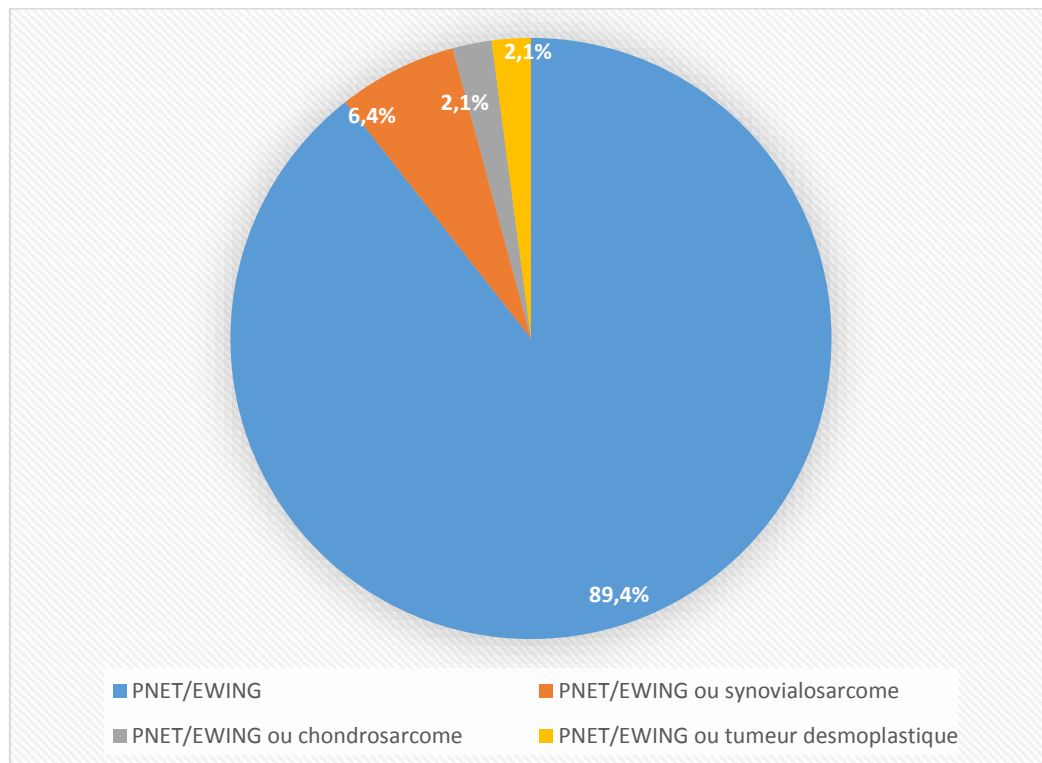
Dans notre étude, la localisation la plus fréquente des sarcomes d'Ewing extra-osseux est au niveau des parties molles avec 24 patients (soit 49%), suivie par l'abdomen et le siège cervico-thoracique avec un pourcentage similaire de 20,4 %. Toutefois, la localisation n'as pas été précisée chez 4 patients soit 10,2 % des cas.



**Figure 12 : SEPM selon la localisation anatomique**

#### 4- Répartition selon le résultat anatomopathologique

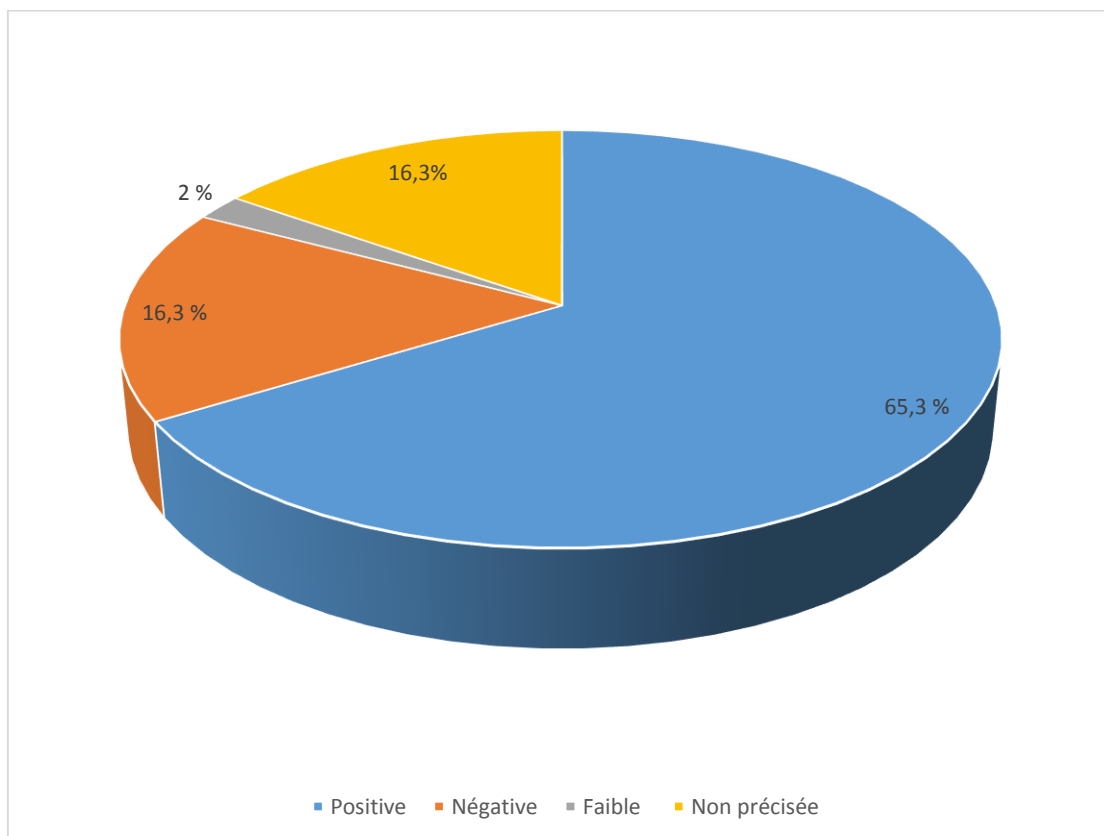
Sur la population étudiée, l'examen anatomopathologique a confirmé chez 42 patients (soit 89,4 %), l'existence d'une tumeur type PNET/EWING, cependant l'histologie n'a pas été concluante pour 5 patients, chez qui le diagnostic différentiel se posait avec un synovialosarcome chez 3 patients, un chondrosarcome chez un patient et une tumeur desmoplastique chez un autre.



**Figure 13 : SEPM selon le diagnostic anatomopathologique**

## 5- Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine CD-99

L'étude de la détection de la protéine CD-99 en immunohistochimie montre une immunoréactivité positive avec l'anticorps anti CD-99 chez 32 patients soit 65,3 % des cas et négative chez 8 patients soit 16,3 % des cas. Chez un seul patient la détection de la protéine CD-99 était faible et non précisée chez 6 patients.



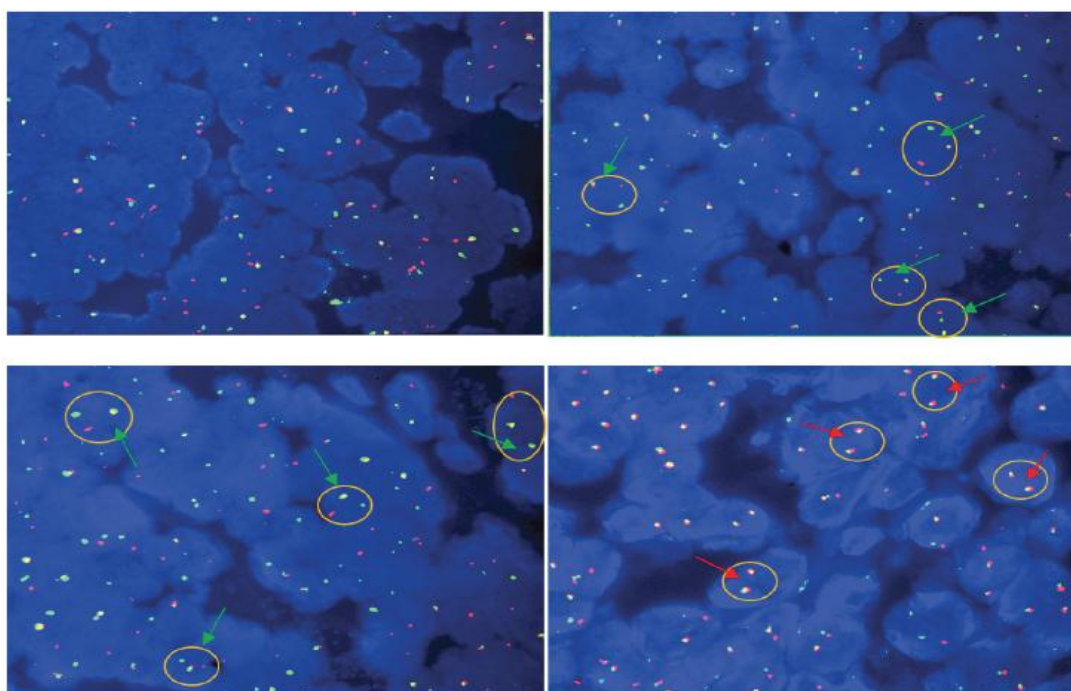
**Figure 14 : Répartition selon la positivité de la protéine CD-99**

## 6 -Répartition du diagnostic PNET/EWING selon la technique

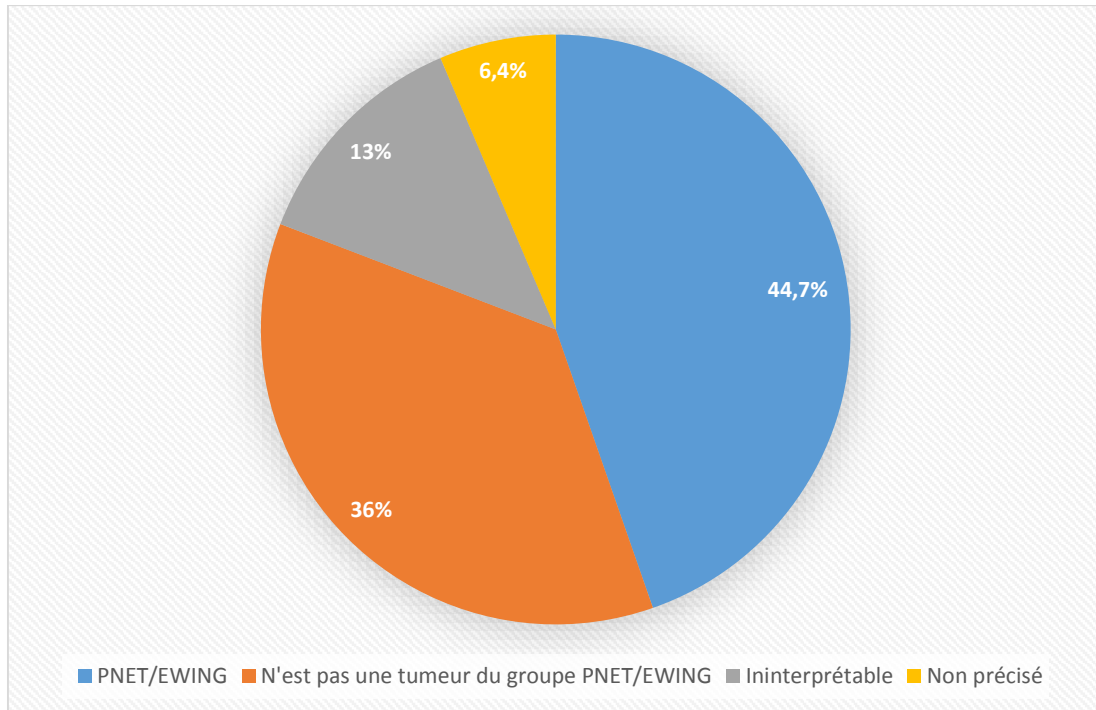
### FISH :

La technique FISH réalisée dans le laboratoire de génétique/oncogénétique CHU Hassan II de Fès a permis de révéler la présence des cassures chromosomique du chromosome 22 pour tous les cas des SEPM (Figure).

Dans notre série, 21 patients (soit 44,7%) présentent une cassure du chromosome 22 au niveau du gène EWSR1, chez 17 patients (36%), il ne s'agissait pas d'une tumeur du groupe PNET/EWING et chez 06 (13%) patients la FISH était ininterprétable pour un problème de fixation. Toutefois, les résultats de la FISH n'étaient pas précisés pour 03 patients (soit 6,4 %).



**Figure 15** : La technique FISH réalisée avec la sonde Vysis EWSR1 Break Apart révèle des noyaux dans lesquels une paire de signaux séparés (flèches vertes) en raison d'un réarrangement dans le gène EWSR1 (x 1000). Les flèches rouges montrent la fusion des deux signaux dans des cellules normales. (Louati S, thèse PHD N 451/2018)



**Figure 16 : Répartition du diagnostic PNET/EWING selon la technique FISH**

## **7 – Sensibilité et spécificité de la FISH par rapport au diagnostic**

### **histologique :**

La sensibilité est la probabilité qu'un test soit positif si la maladie est présente, elle se mesure chez les malades seulement. Une mesure de la sensibilité s'accompagne toujours d'une mesure de la spécificité.

La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades. Cette dernière se mesure chez les non-malades seulement.

La sensibilité a été calculée, à l'aide du logiciel Epi Info 3.4, en considérant comme gold standard les résultats histologiques. La sensibilité et la spécificité de la FISH par rapport au diagnostic histologique étaient respectivement 51,4% et 75%.

Dans notre étude, la valeur prédictive négative (VPN) de la technique FISH traduit la probabilité d'avoir une histologie négative sachant que le résultat de la technique FISH est négatif. Elle est de 14,3 %.

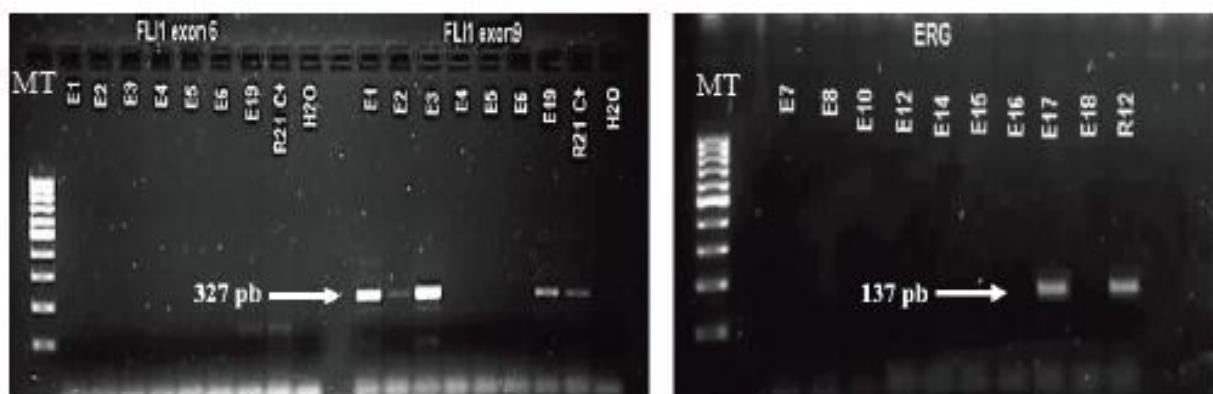
La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité d'avoir un résultat histologique positif, sachant que le résultat de la technique FISH est positif. Dans notre étude la VPP est de 95%.

## 8 – Sensibilité et spécificité de la FISH par rapport à l'immunoréactivité de la CD99 :

En ce qui concerne la sensibilité et spécificité de la FISH par rapport à l'immunoréactivité de la CD 99, notre étude a montré que sa sensibilité est de 48,3%, une spécificité de 55,6%, avec une VPN de 25% et une VPP de 77,8%.

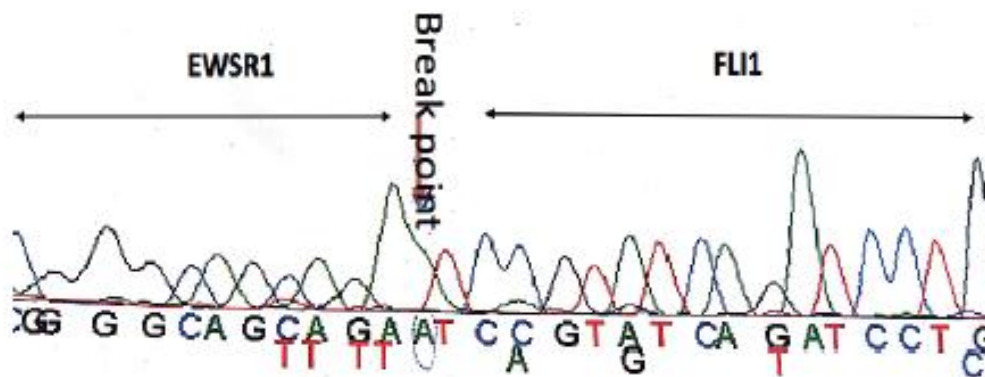
## 9 – Répartition selon le transcrite de fusion par biologie moléculaire (RT-PCR)

La recherche de transcrite de fusion par biologie moléculaire (Figure N) a été réalisée chez les patients qui ont présenté une cassure du chromosome 22 sur la FISH, soit un total de 24 patients. Chez 22 patients, le transcrite de fusion retrouvé était le EWSR1–FLI1 (soit 92 %), chez un patient il s'agissait du transcrite EWSR1–ERG, et chez un autre le résultat était négatif.

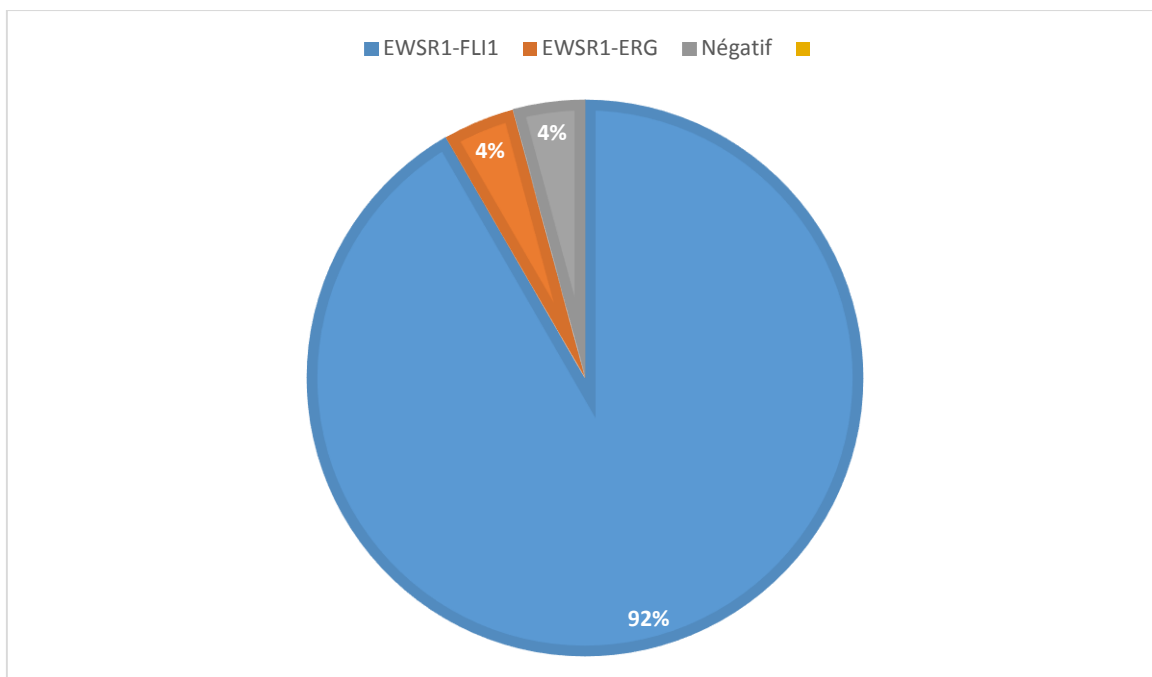


**Figure 17 : Détection des transcrits de fusion EWSR1–FLI1 (exon9) et EWSR1–ERG dans les cas de tumeurs du groupe PNET/Ewing sur gel d'Agarose à 2%. (E1–E19) patients, R12 et R21 contrôles positifs pour EWSR1–ERG et EWSR1–FLI1 respectivement. (Louati S, thèse PHD N 451/2018)**

Un séquençage des bandes correspondants aux deux types de transcrits (EWSR1-FLI1 et EWSR1-ERG) à partir du gel a été réalisé afin de confirmer la nature des transcrits de fusion. Après utilisation des outils bioinformatiques, et en utilisant la base de données BLAST, les séquences sont alignées avec Homo sapiens Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor (FLI1)



**Figure 18** : Exemple d'électrophorégramme du gène EWSR1-FLI1 amplifié. La séquence est alignée avec Homo sapiens Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor (FLI1). (Louati S, thèse PHD N 451/2018)

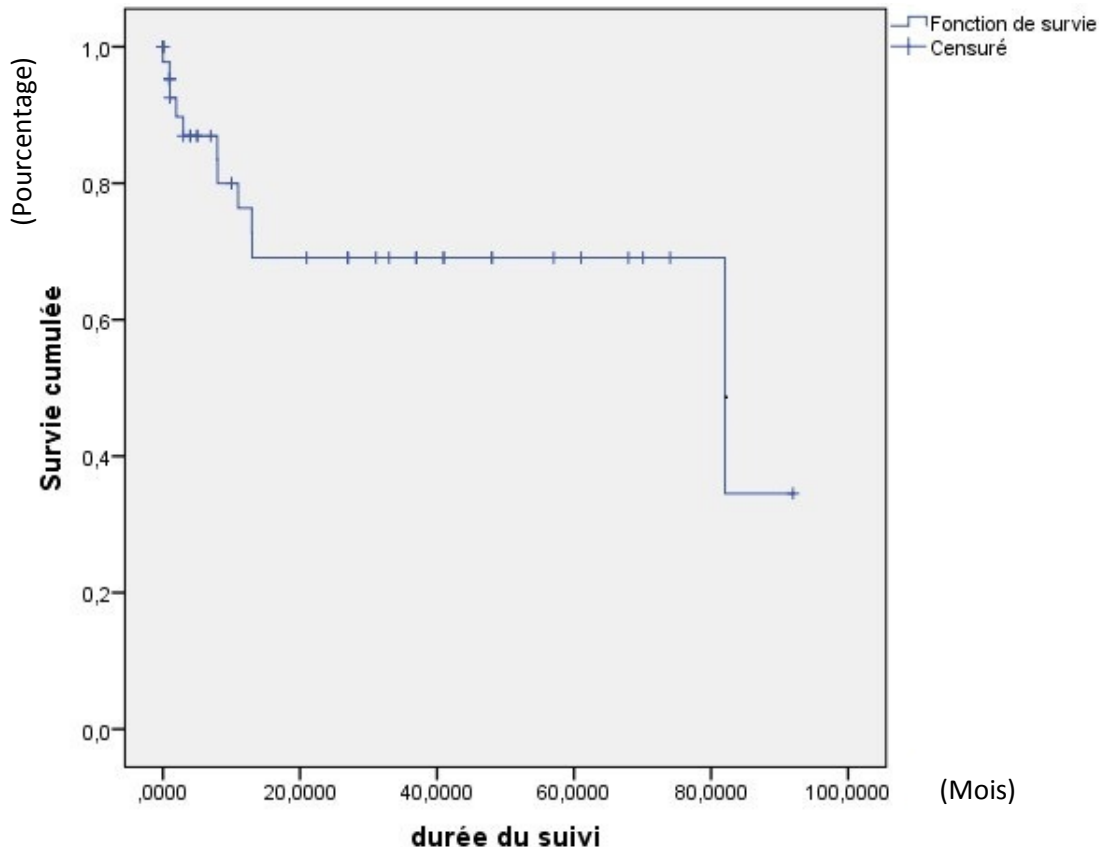


**Figure 19** : Répartition selon le transcrit de fusion détecté en biologie moléculaire



## 10- Répartition selon la durée du suivi :

Dans notre étude, la durée du suivi de tous les patients diagnostiqués SEPM, variait de 0 à 92 mois, avec une durée moyenne estimée à 22 mois.



**Figure 20 : Courbe Kaplan-Meier de la survie des patients ayant un SEPM.**

Si on reporte les résultats retrouvés en fonction des transcrits de fusion (EWSR1-FLI1 ou EWSR1-ERG), la durée moyenne de survie estimée est de 65 mois, alors que cette durée de survie est de 59 mois pour les patients qui présentent un test de FISH positif avec un transcrit de fusion négatif.

Le gain global de survie n'est pas significatif, P est de 0,325.

**Tableau 9 : Durée moyenne de survie en fonction de la présence des transcrits de fusion**

**Moyennes et médianes du délai de survie**

Vg	Moyenne <sup>a</sup>				Médiane			
	Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %		Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %	
			Limite inférieure	Limite supérieure			Limite inférieure	Limite supérieure
0	59,339	12,163	35,500	83,178	.	.	.	.
1	64,558	8,493	47,912	81,204	82,037	,000	.	.
Global	63,102	7,234	48,924	77,279	82,037	49,541	,000	179,138

a. L'estimation est limitée au délai de survie le plus long en cas de censure.

**Comparaisons globales**

	Khi-deux	ddl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,967	1	,325

Test d'égalité des distributions de survie pour les différents niveaux de Vg.

# DISCUSSION

Les sarcomes d'Ewing des parties molles (SEPM) ou sarcomes d'Ewing extra squelettique(EES) sont des tumeurs mésenchymateuses apparentées aux tumeurs neuro-ectodermiques primitives, mais présentant une anomalie génétique caractéristique « la translocation t (11,22)». Les sarcomes des tissus mous constituent un groupe très hétérogène avec plus de 100 types et sous-types histologiques différents qui ont été décrits (Fayette J, J-Y.blay 2005) selon la nouvelle classification de l'OMS (2013). La variabilité des types et sous types histologiques explique les problèmes quotidiens de diagnostic et les discordances inter observateurs. Cette large gamme diagnostique est dominée par les liposarcomes suivis des sarcomes pléomorphes (M.Bui, Nguyen Binh et al 2006) (F.Collin, M.Gelly-Marty et al 2006), qui sont les types histologiques les plus retrouvés. Les sarcomes d'Ewing des parties molles sont des tumeurs rares qui constituent moins de 1% des tumeurs sarcomateuses.

L'étude menée sur 47 patients diagnostiqués au service de génétique/oncogénétique du CHU Hassan II de Fès a montré que la moyenne d'âge de nos patients est de 20 ans, avec une médiane de 19 ans, des extrêmes allant de 3 à 62 ans et un pic d'incidence pour les patients de moins de 20 ans. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux de la littérature. En effet, une étude menée par Castex et al. (2007) sur 63 patients, dont les âges variaient entre 4 mois et 25 ans, a objectivé une médiane de 11 ans. Une autre étude menée en Chine par Xie et Liu (2010) sur 18 patients de 08 mois à 60 ans, a également montré une médiane de 17 ans.

Concernant la répartition selon le sexe, différentes études sont marquées par une légère prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,5, cela a été confirmé par les travaux d'une part de Castex et al (2007) qui ont mis en évidence un sex-ratio de 1,25 et un sex-ratio de 2,6 chez Xie et al (2010) d'autre part. Nos résultats confirment

bien les études antérieures, ainsi, sur nos 47 patients diagnostiqués 31 étaient des hommes (soit 66 %) et 16 des femmes, (soit 34 %) ; avec un sex-ratio qui est de 1.94.

Par ailleurs, la topographie des sarcomes d'Ewing extra-squelettiques est ubiquitaire, mais elle est beaucoup plus localisée au niveau des extrémités plutôt inférieures que supérieures, avec une fréquence de 30% des cas (Magu NK, Singh R 2000) (Radouane B, Chellaoui M et al 2002), suivi de la région para vertébrale (Enzinger FM, Weiss SW 1988) (Paoletti H et al 1999), puis de la paroi thoracique et du rétro péritoine. Il est, en outre, à souligner que les sarcomes sont moins fréquents au niveau de la tête, du cou, du larynx et des fosses nasales où le nombre de cas dans ces régions ne dépasse pas les 3%. Le même constat a été obtenu dans l'étude menée par l'équipe chinoise (Xie et AL 2010), dont la prédominance topographique était au niveau des parties molles avec un pourcentage de 44,4%, le siège para vertébral pour 27,8% des cas et cervico-thoracique pour 11,1% des cas.

Dans notre étude, la localisation la plus fréquente des sarcomes d'Ewing extra-osseux était au niveau des parties molles chez 24 patients (soit 49%), suivie par l'abdomen et le siège cervico-thoracique avec un pourcentage identique dans les deux localisations qui est de 20,4 %. Toutefois, la localisation n'as pas été précisée chez 4 patients soit 10,2 % des cas. Les résultats obtenus concordent avec ceux rapportés dans la littérature.

Bien que certains signes cliniques, la douleur et/ou la tuméfaction à croissance rapide, soient peu spécifiques, ils sont retrouvés fréquemment dans les SEPM. Ainsi, la douleur n'est rapportée que dans 30% des cas, elle peut être signe d'une atteinte des nerfs périphériques ou de la moelle et être accompagnée par des troubles sensitivomoteurs (Allam K, Sze G 1994).

En raison de la non spécificité des manifestations cliniques et radiologiques, la réalisation d'une biopsie s'impose afin de poser un diagnostic de certitude, basé sur l'analyse histologique, qui est le référentiel en protocole thérapeutique.

Les sarcomes d'Ewing, en anatomopathologie, sont gradés selon les critères établis par la FNCLCC en prenant en considération trois paramètres : la différenciation tumorale, l'index mitotique et la nécrose tumorale. Les différents paramètres de la FNCLCC renseignent sur l'activité et l'évolution de la tumeur, sur sa propagation proliférative et sur l'apparition ou non de métastases et tout cela en vue de la mise en place d'un traitement adéquat et d'une bonne prise en charge du patient.

En microscope optique, les sarcomes d'Ewing se caractérisent par la présence de petites cellules rondes basophiles, lobulées, denses et d'aspect uniforme. Les cellules sont en effet relativement monomorphes, comportant des noyaux arrondis à ovalaires, vésiculeux à membrane nucléaire cernée, à chromatine finement granitée homogène renfermant un petit nucléole. Les cytoplasmes sont pâles, mal limités, peu abondants. Il n'y a pas de réseau réticulinique intercellulaire. La vascularisation est riche, bien que parfois masquée par la densité cellulaire. Cependant, Il peut exister des remaniements hémorragiques, des aspects pseudoangiomateux.

Sur la population étudiée, l'examen anatomopathologique a confirmé dans 89,4 % des cas le diagnostic d'une tumeur groupe PNET/EWING grade III selon la FNCLCC. Cependant, le résultat n'a pas été concluant chez 5 patients. Un diagnostic différentiel se posait avec un synoviosarcome chez 3 patients, un chondrosarcome chez un patient et une tumeur desmoplastique chez un autre, il est donc nécessaire d'affiner le diagnostic avec d'autres examens complémentaires.

L'immunohistochimie et la biologie moléculaire sont des techniques complémentaires, mais également nécessaires pour compléter l'examen histologique et pour préciser s'il s'agit bien d'un diagnostic de sarcome d'Ewing des parties molles

ou autres. La majorité des sarcomes d'Ewing montrent une immunoréactivité avec l'anticorps anti-CD99, dirigé contre le produit du gène MIC2, gène pseudo-autosomal situé sur les bras courts des chromosomes sexuels. Ce marquage est particulièrement diffus et membranaire dans plus de 90% des cas (Renard C et al. 2014). L'absence du marquage avec l'anticorps anti CD99 incitent à envisager en priorité un autre diagnostic. Par ailleurs, les sarcomes d'Ewing montrent un marquage négatif à l'anticorps anti WT1 permettant ainsi leur distinction des tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes caractérisées par la positivité de cet anticorps (Hill DA et al. 2000). En revanche, l'anticorps FLI1 (dirigé contre la partie carboxy-terminale de la protéine FLI1) ne présente aucun intérêt supplémentaire, puisqu'il a une sensibilité de 70 à 80% mais pas de spécificité. Il peut présenter un marquage positif dans certains lymphomes lymphoblastiques, dans les synoviosarcomes peu différenciés à cellules rondes et dans un également dans certaines tumeurs vasculaires (Folpe AL, Hill CE, et al. 2000)

Notre étude a porté uniquement sur la détection de la protéine CD-99 en immunohistochimie. L'immunoréactivité positive avec l'anticorps anti CD-99 a été retrouvée chez 32 patients soit 65,3 % des cas, ce résultat est relativement bas par rapport à la littérature et pourrait s'expliquer par le faible échantillonnage (47 patients). Toutefois, le CD99 est non spécifique car retrouvé également dans les lymphomes lymphoblastiques, tumeurs de Meckel, carcinomes à petites cellules, rhabdomyosarcomes, ostéosarcome à petites cellules, tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes et chondrosarcomes mésoenchymateux.

La recherche d'anomalie moléculaire s'est révélée d'un grand apport diagnostique. En effet, la biologie moléculaire vient compléter l'étude anatomopathologique et immunohistochimique en identifiant les formes inhabituelles de sarcomes en fonction de l'âge du patient, de la localisation tumorale ou du profil immunohistochimique.

La FISH est la technique de référence « Gold Standard » pour détecter ces anomalies, elle se base sur la mise en évidence d'un segment d'ADN situé dans les noyaux de cellules en interphase permettant alors la détection de la cassure chromosomique sur le bras court du chromosome 22, et d'évoquer alors une tumeur du groupe PNET/EWING. (Neuville A, et al. 2014)

La mise en évidence de cette cassure chromosomique peut être nécessaire pour le diagnostic positif ainsi que le diagnostic différentiel de ce type de tumeur, notamment avec les synoviosarcomes. La ressemblance histologique de ces derniers avec les sarcomes d'Ewing posent souvent un souci de prise en charge qui est complètement différente pour chacun de ces types de sarcomes. D'un autre côté, cette technique de biologie moléculaire joue également un rôle dans la détermination du pronostic en particulier la réponse à la chimiothérapie, qui se révèle plus satisfaisante lorsque la FISH est positive.

Dans notre série, la technique FISH réalisée dans le laboratoire de génétique/oncogénétique CHU Hassan II de Fès a permis de révéler la présence d'une cassure du chromosome 22 au niveau du gène EWSR1 chez 21 patients, (soit 44,7%), et qui est en faveur d'une tumeur du groupe PNET/EWING. Chez 17 patients (36%), il ne s'agissait pas d'une tumeur du groupe PNET/EWING. Toutefois, le diagnostic moléculaire n'a pas été réalisé dans à peu près 20% des cas suite à un problème de surfixation du tissu tumoral. Les résultats de la FISH dans la littérature montrent une positivité dans 90 % cas. Ainsi, l'étude américaine menait sur 67 cas a révélé la présence de la cassure chromosomique chez 91 % de leurs patients (Robert S Bridge en 2006). La discordance des résultats de l'étude avec ceux de la littérature pourrait s'expliquer par les étapes pré-analytiques, particulièrement la fixation, qui ne sont pas encore bien maîtrisées par nos équipes.



La sensibilité et la spécificité de la technique FISH ont été évaluées dans le diagnostic des tumeurs du groupe PNET/Ewing, en utilisant l'analyse histologique et l'immunoréactivité de l'anticorps anti CD-99 comme gold standard. La sensibilité est la probabilité qu'un test soit positif si la maladie est présente, elle se mesure chez les malades seulement.

Une mesure de la sensibilité s'accompagne toujours d'une mesure de la spécificité. La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif chez les non-malades. Cette dernière se mesure chez les non-malades seulement. Ainsi, les valeurs rapportées par cette étude étaient respectivement de 75% -55,6% par rapport à l'histologie et de 51,4% - 48,3% par rapport à l'immunohistochimie (CD99). A noter également que la probabilité d'avoir le diagnostic histologique en faveur des tumeurs PNET est de 95% si le résultat de la FISH est positif, autrement dit la valeur prédictive positive (VPP) est estimée à 95%. Pa rapport à l'immunohistochimie avec l'anticorps anti CD99, la probabilité d'avoir une immunoréactivité positive et en faveur du diagnostic d'une tumeur Ewing est de 77,8% (VPP), si la technique FISH est positive. Ces résultats montrent que la technique FISH prédit mieux la maladie et viennent en effet réconforter les données de la littérature, qui ont confirmé dans différentes études la supériorité de la FISH. Actuellement considérée comme technique de pointe pour une détection plus précise des sarcomes d'Ewing avec une grande sensibilité et spécificité vis-à-vis des autres techniques de diagnostic. En effet, l'étude américaine réalisée sur une de 67 patients a obtenu des résultats de FISH très encourageants avec une sensibilité de 91 %, spécificité de 100% et une VPP de 100% (Robert S Bridge (2006). Néanmoins, la combinaison de la FISH avec l'immunohistochimie ne peut qu'augmenter la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de ces tumeurs rares.

Bien que la sensibilité et la spécificité de la FISH soient élevées, cette technique ne peut mettre en évidence que la cassure du chromosome 22 correspondant au gène

EWSR1 qui peut également être présent dans d'autres tumeurs à cellules rondes notamment les tumeurs desmoplastiques. C'est pour cela qu'il est serait nécessaire et utile de compléter par une RT-PCR afin de préciser le type des transcrits de fusion qui sont déterminants dans l'évaluation du pronostic du patient (Neuville A, et al. 2014).

Les études moléculaires ont permis de mieux caractériser les transcrits de fusion et d'élargir considérablement le spectre moléculaire des tumeurs de la famille d'Ewing en révélant toute sa complexité. De nombreux transcrits de fusion sont ainsi décrits :

- Dans 85% des cas, il s'agit du transcrit EWSR1-FLI1. (Van Doorninck JA et al. 2010) (Le Deley M-C et al. 2010).
- Dans 10-15% des cas, on retrouve le transcrit EWS-ERG.
- Des variantes plus rares (moins de 1%) impliquant toujours EZS et d'autres gènes de la famille ETS (codant pour des facteurs de transcription) que sont ETV1 (t (7 ; 22)), FEV (t (2 ; 22)), ETV4 alias E1AF (t (17 ; 22)) ;
- Plus récemment des variantes impliquant non plus EWS mais FUS, un gène appartenant néanmoins à la même famille que EWS, la famille FET codant pour les protéines nucléaires agissant à différentes étapes de l'expression génique : FUS-ERG par t (16 ; 21) (Ng TL, O'Sullivan et al. 2007).

Les résultats de notre étude étaient similaires à ceux retrouvés dans les études citées ci-dessus. La recherche de transcrits de fusion par biologie moléculaire a été réalisée chez les patients, dont la technique FISH a révélé une cassure du chromosome 22, soit un total de 24 patients. Les transcrits de fusion EWSR1-FLI1 et EWSR1-ERG étaient retrouvés chez 22 patients avec respectivement un pourcentage de 92 % et 4%. Un seul cas où aucun transcrit n'a été décelé, cet échec peut probablement s'expliquer par la possibilité de cassure du gène EWSR1 lors de l'étape de fixation des

tumeurs d'où la recommandation de recherche des transcrits à partir des tumeurs congelées. Par ailleurs, la survie moyenne chez les patients ayant un transcrit de fusion positif était de 65 mois, le gain obtenu était de 06 mois par rapport aux patients présentant un transcrit de fusion négatif avec une FISH positive.

La recherche des gènes de fusion dans ce genre de pathologies semble être intéressante, puisqu'il a été montré en 2004 que le gène de fusion EWSR1-FLI1 présent dans les sarcomes d'Ewing diminue l'expression d'un régulateur des signaux de survie et de prolifération cellulaire médié par IGF-1. L'inhibition de ce dernier par des anticorps anti IGF-1R (figitumumab, ganitumab) a été évalué dans des essais cliniques de phase I et II et a abouti à des résultats prometteurs. En effet, RG1 507 a été administré à 115 patients âgés de plus de 2 ans et atteints de sarcome d'Ewing, à localisation osseuse dans 57% des cas et extra-squelettiques dans 43% des cas. Le taux de réponse complète ou partiel obtenu était de 10% et parmi les 11 patients répondeurs, 10 avaient une tumeur à localisation osseuse. Bien que l'étude ne soit pas globalement très satisfaisante, certains patients ont présenté une durée de survie assez longue qui semble intéressante à explorer de plus près (Pappo AS et al. 2011). D'autres molécules font l'objet cette fois ci de phases III (étude SUCCEED) dans les sarcomes, ce sont les inhibiteurs de mTor (rapamycine, deferolimus, protéine kinase qui a un rôle primordial dans la prolifération de certains cancers) qui agissent en inhibant l'expression de la protéine de fusion EWS/FLI1 Enfin, des travaux précliniques sont actuellement en cours et certains résultats récemment publiés permettent de donner des perspectives thérapeutiques dans les domaines de l'immunothérapie ou de la thérapie génique. En effet, l'inhibition de l'expression d'EWSFLI1 par ARN interférent de cellules d'Ewing pourrait aboutir à un ralentissement de la croissance cellulaire, voire à une mort cellulaire programmée. Toutefois, les techniques

permettant de libérer les ARN interférents au niveau tumoral restent encore à découvrir.

Les pathologistes et les cliniciens ont de plus en plus recours à la biologie moléculaire comme outil diagnostique dans les sarcomes des parties molles. Malgré son coût et sa faible disponibilité, la biologie moléculaire est en passe de devenir un standard par les nombreux avantages qu'elle offre (Neuville A, et al. 2014) :

- la présence d'une anomalie moléculaire permet de poser un diagnostic définitif et reproductible, en particulier sur microbiopsie.
- Certaines anomalies génétiques constituent des critères d'inclusion pour des thérapies ciblées.
- La détection systématique d'anomalies génétiques permet de mieux classer les sarcomes et d'améliorer la sélection des patients pour un traitement donné.
- La confrontation histologie/biologie moléculaire augmente les compétences des pathologistes.

Lors de l'établissement d'un diagnostic de sarcome, le pathologiste doit se rappeler que l'histologie et la génomique sont liées, vu que la morphologie est le reflet des modifications génétiques et épigénétiques. Bien que l'histologie soit parfois trompeuse ou non spécifique, elle est indispensable dans l'indication du type d'analyses moléculaires à rechercher, ces dernières, utilisées seules ne permettent pas de différencier entre deux tumeurs caractérisées par la même translocation, comme le cas d'un sarcome à cellules claires et un histiocytofibrome angiomatoïde. La confrontation clinique-histologie reste jusqu'à l'heure actuelle la base du diagnostic, avec la biologie moléculaire comme nouveau outil de confirmation ou de redressement de ce diagnostic clinique.

# CONCLUSION

Les sarcomes d'Ewing sont des tumeurs rares de l'adulte jeune. Ce sont des tumeurs mésoenchymateuses apparentées aux PNET avec la particularité de la présence d'une translocation chromosomique caractéristique de ces sarcomes.

La multitude de leurs diagnostics différentiels rend souvent leur diagnostic histologique et immunohistochimique assez complexe avec la présence de multiples discordances inter observateurs, nécessitant pour la plupart des cas une confrontation aux données de la biologie moléculaire. Il est à noter que ces tests moléculaires doivent se faire dans des laboratoires rodés, qui font passer un nombre minimal d'examens par année, sans oublier qu'un contrôle de qualité des prestations et qu'une qualification du personnel sont hautement recommandés.

En effet, la connaissance des anomalies moléculaires des sarcomes d'Ewing a réellement révolutionné l'approche de ces tumeurs que ce soit sur le plan du diagnostic, pronostic ou de la prise en charge thérapeutique. Elle permet actuellement en complément de l'imagerie médicale et l'immunohistochimie une meilleure définition des sarcomes d'EWING avec une classification plus reproductible. Les nouveaux traitements, notamment les thérapeutiques ciblées anticorps anti-IGFR1, présentent des résultats prometteurs permettant de bloquer la protéine chimère EWS-FLI1.

Seule une équipe pluridisciplinaire entraînée parvient à concerter l'expertise requise en biologie moléculaire, anatomopathologie, traumatologie, oncologie, afin d'offrir au patient les meilleures chances de diagnostic et de prise en charge. Toute la chaîne diagnostic-traitement se conçoit dans le dialogue et dans l'échange afin de proposer une solution appropriée à chaque cas.

# RESUME

## **RESUME :**

**Titre :** Biologie moléculaire : Nouvel outil diagnostique dans les sarcomes d'Ewing extra-osseux.

**Objectif :** Le but de ce travail est de montrer l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des sarcomes d'EWING des parties molles par évaluation statistique de la sensibilité et de la spécificité du test « FISH ».

**Matériel et Méthodes :** C'est une étude rétrospective menée dans le service de génétique/oncogénétique du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès. Pour réaliser ce travail, nous avons exploité les cas des sarcomes d'EWING extra-osseux diagnostiqués au service d'anatomopathologie entre janvier 2014 et janvier 2017 pour un total de 47 patients

**Mots clés :** Sarcomes d'Ewing, CD99, biologie moléculaire, FISH, EWS-FLI1, RT-PCR.

**Introduction :** Les sarcomes d'Ewing extra-osseux sont des tumeurs rares qui se développent à partir du tissu mésenchymateux. Ils représentent moins de 1 % de l'ensemble des tumeurs sarcomateuses. C'est un cancer qui touche généralement l'adulte jeune avec un pic de fréquence entre 10 et 30 ans, et une légère prédominance masculine. Le diagnostic de ces sarcomes peut être évoqué en IRM, mais seule l'anatomopathologie associée à la biologie moléculaire peuvent le confirmer. Le traitement sarcomes d'Ewing est basé sur la chirurgie et le pronostic dépend du grade histologique et des transcrits de fusion.

**Résultats :** L'âge des patients varient entre 3 et 62 ans avec une médiane de 19 ans, 66 % étaient des hommes et 34 % des femmes. La localisation la plus fréquente des sarcomes d'Ewing extra-osseux était au niveau des parties molles avec 24 patients (soit 49%), suivie par l'abdomen et le siège cervico-thoracique avec un pourcentage similaire de 20,4 %. Toutefois, la localisation n'as pas été précisée chez 4 patients soit 10,2 % des cas.



L'examen anatomopathologique a confirmé chez 89,4% des patients, l'existence d'une tumeur type PNET/EWING, toutes gradées III selon le système de grading de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC). Cependant l'histologie n'a pas été concluante pour 5 patients, chez qui le diagnostic différentiel se posait avec un synoviosarcome chez 3 patients, un chondrosarcome chez un patient et une tumeur desmoplastique chez un autre.

L'étude de la détection de la protéine CD-99 en immunohistochimie montre une immunoréactivité positive avec l'anticorps anti CD-99 chez 32 patients soit 65,3 % des cas et négative chez 8 patients soit 16,3 % des cas. Chez un seul patient la détection de la protéine CD-99 était faible et non précisée chez 6 patients.

La répartition selon la technique FISH montre la présence chez 44,7% des patients, d'une cassure du chromosome 22 au niveau du gène EWSR1, dans 36 % cas il ne s'agissait pas d'une tumeur du groupe PNET/EWING et chez 13 % des patients la FISH était ininterprétable pour un problème de fixation. Toutefois, les résultats de la FISH n'étaient pas précisés pour 03 patients (soit 6,4 %).

En ce qui concerne la sensibilité et spécificité de la FISH par rapport à l'immunoréactivité de la CD 99, notre étude a montré que sa sensibilité est de 48,3%, une spécificité de 55,6%, avec une VPN de 25% et une VPP de 77,8%.

La recherche de transcrite de fusion par biologie moléculaire a été réalisée chez les patients qui ont présenté une cassure du chromosome 22 sur la FISH, soit un total de 24 patients. Chez 22 patients, le transcrite de fusion retrouvé était le EWSR1-FLI1 (soit 92 %), chez un patient il s'agissait du transcrite EWSR1-ERG, et chez un autre le résultat était négatif.

**Conclusion :** Les sarcomes d'EWING extra-osseux sont des tumeurs rares des tissus mous dont le diagnostic histologique et immunohistochimique est complexe nécessitant souvent la complémentarité de la biologie moléculaire et une confrontation aux données cliniques.

## **Abstract**

**Title:** Molecular biology: New tool in the diagnosis of extraskeletal Ewing sarcoma

**Objectif :** The aim of this work is to show the interest of molecular biology in the diagnosis of extraskeletal Ewing sarcomas by a comparison of the molecular techniques with histology and immunohistochemistry which are considered as basic techniques for the diagnosis of these tumors.

**Material and methods :** This is a retrospective study conducted in the genetics / oncogenetics department of Hassan II University Hospital in Fez. To carry out this work, we exploited the cases of extraskeletal Ewing sarcomas at the pathology department between January 2014 and January 2017 for a total of 47 patients.

**Key words:** Ewing sarcoma, immunohistochemistry, CD99, molecular biology, FISH, EWSR1.

**Introduction :** Extraskeletal Ewing's sarcomas are rare tumors that develop from mesenchymal tissue. They represent less than 1% of all sarcomatous tumors. It is a cancer which generally affects young adults with a peak in frequency between 10 and 30 years, and a slight male predominance. The diagnosis of these sarcomas can be made by MRI, but only the pathology associated with molecular biology can confirm it. Their treatment is based on surgery and the prognosis depends on the histological grade.

**Results :** The age of the patients varied between 3 and 62 years with a median age of 19 years, 66 % were men and 34 % females. The most frequent localisation of extraskeletal Ewing's sarcomas was in soft tissues with a percentage of 49 %, then were the abdomen and the thorax with the same percentage of 20,4 %. However, the localisation was not specified for 4 patients.

The pathological examination confirmed in 89.4% of patients the existence of a PNET / EWING type tumor, all graded III according to the grading system of the National Federation of Cancer Centers (FNCLCC). However, the histology was not conclusive for 5 patients, in whom the differential diagnosis arose with synovialosarcoma in 3 patients, chondrosarcoma in one patient and desmoplastic tumor in another.

The study of the detection of the CD-99 protein by immunohistochemistry shows positive immunoreactivity with the anti CD-99 antibody in 65.3% of the cases, and negative in 8 patients, or 16.3% of cases. In a single patient the detection of the CD-99 protein was weak and unspecified in 6 patients.

The breakdown according to the FISH technique shows the presence in 44.7% of patients of a break in chromosome 22 at the level of the EWSR1 gene, in 36% of cases it was not a tumor of the PNET / EWING group and in 13% of patients the FISH was uninterpretable for a fixation problem. However, the results of the FISH were not specified for 03 patients (or 6.4%).

Regarding the sensitivity and specificity of FISH compared to the immunoreactivity of CD 99, our study showed that its sensitivity is 48.3%, with a specificity of 55.6%.

The search for fusion transcripts by molecular biology was performed in patients who had a break in chromosome 22 on FISH, for a total of 24 patients. In 22 patients, the fusion transcript found was EWSR1-FLI1 (92%), in one patient it was the EWSR1-ERG transcript, and in another the result was negative.

**Conclusion:** Extraosseous EWING's sarcomas are rare soft tissue tumors whose histological and immunohistochemical diagnosis is complex, often requiring comparison with molecular biology data.

## خلاصة:

**العنوان:** البيولوجيا الجزيئية: أداة تشخيصية جديدة في ساركوما Ewing غير العظمية.

**الهدف:** الهدف من هذا العمل هو إظهار اهتمام البيولوجيا الجزيئية بتشخيص أورام EWING للأنسجة الرخوة من خلال مقارنة بين التقنيتين الجزيئيتين QPCR و FISH فيما يتعلق بالنسجة والكيمياء المناعية التي تعتبر التقنيات الأساسية لتشخيص هذه الأورام. **المواد والأساليب:** هذه دراسة بأثر رجعي أجريت في قسم الوراثة / علم الأورام في مستشفى الحسن الثاني الجامعي في فاس. لتنفيذ هذا العمل استغلنا حالات ساركوما EWING التي تم تشخيصها في قسم علم الأمراض بين يناير 2014 ويناير 2017 لما مجموعه 47 مريضاً.

**الكلمات المفتاحية:** ساركوما Ewing، الكيمياء النسيجية المناعية، CD99، البيولوجيا الجزيئية، FISH، EWSR1.

**مقدمة:** الأورام اللحمية غير العظمية Ewing هي أورام نادرة تتطور من نسيج اللحمية المتوسطة. تمثل أقل من 1% من جميع الأورام الساركومية. إنه سرطان يصيب عمومًا الشباب ويبلغ معدل حدوثه ذروته بين 10 و30 عامًا، وغلبة طفيفة بين الرجال. يمكن اقتراح تشخيص هذه الأورام اللحمية عن طريق التصوير بالرنين المغناطيسي، ولكن فقط علم الأمراض المرتبط بالبيولوجيا الجزيئية يمكن أن يؤكد ذلك. يعتمد علاج ساركوما إوينغ على الجراحة ويعتمد التشخيص على الدرجة النسيجية

**النتائج:** تراوحت أعمار المرضى بين 3 و62 سنة بمتوسط 19 سنة 66% رجال و34% إناث. كان المكان الأكثر شيوعًا لساركوما في الأنسجة الرخوة بنسبة 49%، ثم البطن والصدر بنفس النسبة البالغة 20.4%. لم يتم تحديد الموقع لأربعة مرضى.

أكد الفحص المرضي في 89.4% من المرضى وجود ورم من نوع PNET / EWING ، وجميعهم من الدرجة الثالثة وفقًا لنظام الدرجات للاتحاد الوطني لمراكز السرطان (FNCLCC). لم يكن علم الأنسجة نهائيًا بالنسبة لخمسة مرضى ، حيث نشأ التشخيص التفريقي مع الساركوما الزليلية في 3 مرضى ، والساركوما الغضروفية في مريض واحد والورم الصليبي في آخر.

أظهرت دراسة الكشف عن بروتين CD-99 عن طريق الكيمياء الهيستولوجية المناعية فعالية مناعية إيجابية مع الجسم المضاد المضاد CD-99 في 65.3% من الحالات ، وسلبية في 8 مرضى أي 16.3% من الحالات. كان اكتشاف بروتين CD-99 في مريض واحد ضعيفًا وغير محدد في 6 مرضى.

يظهر الانهيار وفقًا لتقنية FISH وجود 44.7% من المرضى لكسر في الكروموسوم 22 على مستوى جين EWSR1 ، وفي 36% من الحالات لم يكن ورمًا من مجموعة PNET / EWING وفي 13% من المرضى المرضي كان FISH غير قابل للتفسير لمشكلة التثبيت. ومع ذلك ، لم يتم تحديد نتائج FISH لـ 03 مرضى (أو 6.4%).

فيما يتعلق بحساسية وخصوصية FISH مقارنة بالنشاط المناعي لـ CD 99 ، أظهرت دراستنا أن حساسيته تبلغ 48.3% ، مع خصوصية 55.6%.

تم إجراء البحث عن نصوص الاندماج بواسطة البيولوجيا الجزيئية في المرضى الذين تعرضوا لكسر في الكروموسوم 22 على FISH ، لما مجموعه 24 مريضاً. في 22 مريضاً ، كانت نسخة الاندماج التي تم العثور عليها هي EWSR1-FLI1 (92 %) ، وفي مريض واحد كانت نسخة EWSR1-ERG ، وفي آخر كانت النتيجة سلبية.

**الخلاصة:** الأورام اللحمية غير العظمية EWING هي أورام نادرة في الأنسجة الرخوة والتي يكون التشخيص النسيجي والكيميائي المناعي معقداً ، وغالباً ما تتطلب المقارنة مع بيانات البيولوجيا الجزيئية.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Professeur Mustapha Mahfoud. Cancer de l'os: tumeurs malignes des membres, 02 novembre 2009.
2. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn CW, Mertens F, World Health Organization. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press; 2013.
3. Fayette J, J-Y. Blay. Les STM: PEC multidisciplinaire et nouveaux concepts. Revue médicale suisse 2005, vol 1, p1979-1984.
4. Babin SR, Simon P, Bergerat JP. Tumeurs des tissus mous des membres. EMC appareil locomoteur, 1999, Elsevier, Paris.
5. Suit and al. Clinical and histopathology parameter and response to treatment Sarcoma of soft tissue. Cancer
6. M.Bui, Nguyen Binh, F.Collin, J.M.Coindre. Sarcomes des tissus mous : données moléculaires actuelles. Cancer/Radiothérapie (2006):15-25
7. F.Collin, M.Gelly-Marty, M.Bui Nguyen Binh, J.M.Coindre. Sarcomes des tissus mous:données anatomopathologique actuelles. Cancer/Radiothérapie 10 (2006): 7-14
8. Bonvalot S, Vanel D, Terrier D, Le Pechoux C et Lecesne. Principe de traitement des sarcomes des tissus mous de l'adulte EMC (Elsevier,Paris), appareil locomoteur, (2004) :44-099
9. S.Heymann, G.M.Jung, P.Simon, J.P.Bergerat, A.Di Marco. Résultats à long terme d'une série de 89 patients suivis pour un sarcome des tissus mous traités par chirurgie conservatrice et 3 modalités d'irradiation post-opératoire. Cancer/Radiothérapie 11 (2007) 443-451
10. Jong Hoon Park, Chang HO Kang, Chul Hwan Kim, In Jung Chae. Highly malignant soft tissue sarcoma of the extremity with delayed diagnosis. World journal of surgical oncology (2010) 8:84

11. Van der Woude HJ, Vanderschueren G. Ultrasound in musculoskeletal tumors with emphasis on its role in tumor following-up. *Radiol Clin North Am* 1999; 37:753–66.
12. Eleuqc, Penel N, Grosjean J, Fournier C, Vilain M. Pronostic des sarcomes des tissus mous en territoires irradiés. *La revue de Medecine interne* (2004) 25 :866–871
13. E.Stoekle, J.M.Coindre, L.Thomas, M.Bui, G.Kantor, M.Kind. Chirurgie des sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc *Springer/Oncologie* (2007) 9 :107–113
14. Pinson S, Wolkeristeinp. La neurofibromatose 1(NF 1) ou maladie de Van Recklinghausen *La revue de Medecine interne* (2005) 26 :196–215
15. Burningham Z, Mia H, Spector L, Schiffner JD. The epidemiology of sarcoma *Clinical sarcoma research* (2012) 2:14
16. M.Bui, Nguyen Binh, F.Collin, J.M.Coindre. Sarcomes des tissus mous : données moléculaires actuelles. *Cancer/Radiothérapie* (2006):15–25
17. Robert J Canter, Shannon Beal, Steve Martinez, Richard J Bold, Anthony S Robbins : Interaction of histologic subtype and histologic grade in predicting survival for soft tissue sarcomas *The American college for surgeons* (2010) 1072–7515
18. F.Lintz, A.Moreau, E.Cassagneau, O.Maillard, D.Waast, F.Gouin. Sarcomes des tissus mous: étude des marges de résection *Study of de margins after resection of soft tissue sarcomas. Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique* (2009) 107–113
19. Russell W.O., Cohen J., Enzinger F., and al. A clinical and pathological staging system for soft tissue sarcomas *Cancer* 1977 ; 40 : 1562–1570
20. Myhre-Jensen O., Kaae S., Madsen E.H., Sneppen O. Histopathological grading in soft-tissue tumours. Relation to survival in 261 surgically treated patients *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 1983; 91: 145–150



21. Costa J., Wesley R.A., Glatstein E., Rosenberg S.A. The grading of soft tissue sarcomas. Results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases *Cancer* 1984 ; 53 : 530–541
22. van Unnik J.A., Coindre J.M., Contesso C., and al. Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group *Eur J Cancer* 1993 ; 29 : 2089–2093
23. Trojani M., Contesso G., Coindre J.M., and al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system *Int J Cancer* 1984 ; 33 : 37–42
24. La situation du cancer en France en 2010 collection rapports et synthèses : (2010). 193–195 [Ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt,].
25. Agnès Neuville<sup>a,b</sup>, Jean-Michel Coindre<sup>a,b</sup>, Frédéric Chibona . Molecular biology for sarcoma: Useful or necessary 2014
26. Tefft M, Wawter GF, Mitus A. Paravertebral "round cell" tumors in children. *Radiology* 1969; 92: 1501–9.
27. Enzinger FM, Weiss SW. Extraskeletal Ewing's sarcoma of soft tissue tumors, 2<sup>ème</sup> édition, 1988; 951–8.
28. Angervall I, Enzinger FM. Extra skeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer* 1975;36:240–51.
29. Allam K, Sze G. MR primary extraosseous Ewing sarcoma. *AJNR* 1994;15:305–7.
30. Thebert A, Francis R, Bowerman A. Retroperitoneal extraosseous Ewing's sarcoma with renal involvement: US and MRI findings. *Clin Imag* 1993;17:149–52.
31. Pritchard DJ, Dahlin DC, Dauphine RT. Ewing's sarcoma. *J Bone Joint Surg* 1974;57:10.
32. O'keefe F, Loringan JG, Wallace S. Radiological features of extraskeletal Ewing sarcoma. *Br J Radiol* 1990;63:456–60.

33. Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1983;309:496–497.
34. Turc-Carel C, Philip I, Berger M-P, Philip T, Lenoir GM. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1983; 309:497–498.
35. Becroft DMO, Pearson A, Shaw RL, Jonathan ZwiI. Chromosomal translocations in extrasqueletal Ewing's tumor. *Lancet* 1984;2:400.
36. Rud NP, Reihman HM, Pritchard DJ, Frassica FJ, Smithon WA. Extraosseous Ewing's sarcoma. A study of 42 cases. *Cancer* 1989;64:1548–53.
37. Bowden L, Booher RJ. The principles and techniques of resection of soft parts for sarcoma. *Surgery* 1958;44(6):963–77.
38. Enneking WF, Spanier SS, Malawer MM. The effect of the anatomic setting on the results of surgical procedures for soft parts sarcoma of the thigh. *Cancer* 1981;47(5):1005–22.
39. Rydholm A, Gustafson P, Rooser B, Willen H, Akerman M, Herrlin K, et al. Limbsparing surgery without radiotherapy based on anatomic location of soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1991;9(10):1757–65.
40. Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin* 2004;54(2):94–109.
41. Paoletti H et al. Sarcome d'Ewing des parties molles: à propos de 3 cas et revue de la littérature. *J Radiol* 1999;80:477–482.
42. Magu NK, Singh R. Digital soft tissue Ewing's sarcoma of foot : a case report. *Journal of the Indian Medical Association* 2000;98(4):185–6.
43. Radouane B, Chellaoui M, Chat L et al. Sarcome d'Ewing extra osseux. *Arch Pediatr* 2002;9(6):649–50.
44. Rose JG, Hermann G, Mendelson DS. Extrasqueletal Ewing sarcoma with computed tomography correlation. *Skeletal Radiol* 1983;9:234–7.
45. Kobos J, Grybowski W. Extrasqueletal Ewing's sarcoma. *Acta chir Acad Sci Hung* 1980; 21:301–7.

46. El Andaloussi Y, Hachimi K, Fnini S, Largab A. Sarcome d'Ewing des parties molles. A propos de trois cas et revue de la littérature. *Oncologie* 2007;9:310–312.
47. Enzinger FM, Weiss SW. Primitive neuroectodermal tumors and related lesions. *Soft tissue tumors*, 3ème édition 1995;929–63.
48. Dei Tos AP, Dal Cin P. The role of cytogenetics in the classification of soft tissue tumors. *Virchows Arch* 1997;431:83–94.
49. Hasegawa SL, Davison JM, Rutten A, Fletcher CDM. Primary cutaneous Ewing's sarcoma : immunophenotypic and molecular cytogenetic evaluation of five cases. *AM J Surg Pathol* 1998;22:310–8.
50. Renard C, Ranchère–Vince D. Tumeurs de la famille Ewing/PNET : vers un nouveau paradigme ? *Annales de pathologie* (2014),
51. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99–positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1657—62.
52. Neuville A, et al. Biologie moléculaire en pathologie des tissus mous : utile ou nécessaire ? *Annales de pathologie* (2014)
53. Krijgsman O, Israeli D, Haan JC, van Essen HF, Smeets SJ, Eijk PP, et al. CGH arrays compared for DNA isolated from formalin–fixed, paraffin–embedded material. *Cancer* 2012;51:344—52.
54. Lagarde P, Przybyl J, Brulard C, Pérot G, Pierron G, Delattre O, et al. Chromosome instability accounts for reverse metastatic outcomes of pediatric and adult synovial sarcomas. *J Clin Oncol* 2013;31:608—15.
55. Lagarde P, Pérot G, Kauffmann A, Brulard C, Dapremont V, Hostein I, et al. Mitotic checkpoints and chromosome instability are strong predictors of clinical outcome in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18:826—38.

56. 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. *J Pathol* 2014;233:209–14.
57. Coindre JM, Mariani O, Chibon F, Mairal A, de Saint Aubain Somerhausen N, Favre-Guillevin E, et al. Most malignant fibrous histiocytomas developed in the retroperitoneum are differentiated liposarcomas: a review of 25 cases initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol* 2003;6:256–62.
58. 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.
59. Zhang H, Erickson-Johnson M, Wang X, Bahrami A, Medeiros F, Lonzo ML, et al. Molecular testing for lipomatous tumors: critical analysis and test recommendations based on the analysis of 405 extremity-based tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1304–11.
60. 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.
61. Van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, et al. Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010;28:1989–94.
62. Le Deley M-C, Delattre O, Schaefer K-L, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PCW, et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28:1982–8.

63. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, Hayes M, Clarkson PW, Wins-tanley M, et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16)producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagn*2007;9:459—63.
64. Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Mod Pathol*2006;19:1—8.
65. Newby R, Rowe D, Paterson L, Farquharson MA, MacDuff E, Coupe A, et al. Cryptic EWSR1-FLI1 fusions in Ewing sarcoma: potential pitfalls in the diagnostic use of fluorescence in situ hybridization probes. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;200:60—4.
66. Fisher C. The diversity of soft tissue tumours with EWSR1 gene rearrangements: a review. *Histopathology* 2014;64:134—50.
67. Panagopoulos I, Thorsen J, Gorunova L, Micci F, Haugom L, Davidson B, et al. RNA sequencing identifies fusion of the EWSR1 and YY1 genes in mesothelioma with t(14;22)(q32;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52:733—40.
68. Tan SY, Burchill S, Brownhill SC, Gerrard MP, Watmore A, Wagner BE, et al. Small round cell tumor with biphenotypic differentiation and variant of t(21;22)(q22;q12). *Pediatr Dev Pathol*2001;4:391—6
69. Barisella M, Collini P, Orsenigo M, Aiello A, Paties CT, Dileo P, et al. Unusual myogenic and melanocytic differentiation of soft tissue pPNETs: an immunohistochemical and molecular study of 3 cases. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1002—6.
70. Weinreb I, Goldstein D, Perez-Ordóñez B. Primary extraskeletal Ewing family tumor with complex epithelial differentiation: a unique case arising in the lateral neck presenting with Horner syndrome. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1742—8.

71. Malone VS, Dobin SM, Jones KA, Donner LR. CD99-positive largecell neuroendocrine carcinoma with rearranged EWSR1 gene in an infant: a case of prognostically favorable tumor. *VirchowsArch* 2010;457:389—95.
72. Fletcher CD, Bridge J, Hogendoorn PC, et al. WHO classification of tumours of soft tissue and bone, 4th ed. Lyon: IARC Press;2013.
73. Bui BN et al. Recommandations pour la pratique clinique : Standards, Options, Recommandations 2002 pour la prise en charge des patients adultes atteints de sarcome des tissus mous.
74. Robert C, Martin G, Murray F, Brennan MD. Adult soft tissue Ewing sarcoma or primitive neuroectodermal tumors : Predictors of survival. *Arch Surg* 2003; 138:281-285.
75. Hasegawa T, Yokoyama R, Matsuno Y, Shimoda T, Hirohashi S. Prognostic significance of histologic grade and nuclear expression of beta-catenin in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 2001; 32(3):257–63.
76. Alektiar KM, Leung D, Zelefsky MJ, Healey JH, Brennan MF. Adjuvant brachytherapy for primary high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol* 2002;9(1):48–56.
77. Alektiar KM, Leung D, Zelefsky MJ, Healey JH, Brennan MF. Adjuvant brachytherapy for primary high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol* 2002;9(1):48–56.
78. Delannes M, Thomas L. Place et techniques de la curiethérapie dans le traitement des sarcomes des tissus mous. *Cancer/ Radiothérapie* 2006;10:63–67.
79. Patricio MB, Vilhena M, Neves M, Raposo S, Catita J, De Sousa V, et al. Ewing's sarcoma in children: twenty-five years of experience at the Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (IPOFG). *J Surg Oncol* 1991; 47 : 37–40.

80. Burgert Jr EO, Nesbit ME, Garnsey LA, Gehan EA, Herrmann J, Vietti TJ, et al. Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: a long-term follow-up of the First Intergroup study. *J Clin Oncol* 1990 ; 8 : 1664-74.
81. Craft A. "Ewing's sarcoma". In : Pinkerton R, Philip T, Fervers B (eds). Evidence-based Paediatric Oncology. BMJ books, 2002.
82. Pinkerton CR, Bataillard A, Guillo S, Oberlin O, Fervers B, Philip T, et al. Treatment strategies for metastatic Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001 ; 37 : 1338-44.
83. Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, Philip T, Plantaz D, Schmitt C, et al. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Société française des cancers de l'enfant. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 3997-4002.
84. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, Philip T, Rubie H, Mechinaud F, et al. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumour cells in localized Ewing tumour. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 85-91.
85. Vermeulen J, Ballet S, Oberlin O, Peter M, Pierron G, Longavenne E, et al. Incidence and prognostic value of tumour cells detected by RT-PCR in peripheral blood stem cell collections from patients with Ewing tumour. *Br J Cancer* 2006; 95 :1326-33 [Epub 2006].
86. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer-Menz I, et al. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumour patients? *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 1245-51.
87. de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, et al. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998 ;

88. P. Marec-Bérard, F. Chotel, L. Claude PNET/Ewing tumours: current treatments and future perspectives. Bull Cancer vol. 97 · N° 6 · juin 2010
89. Indelicato DJ, Keole SR, Shahlaee AH, Shi W, Morris CG, Gibbs Jr CP, et al. Long-term clinical and functional outcomes after treatment for localized Ewing's tumour of the lower extremity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008 ; 70 : 501–9.
89. L.Daniel Latt, Robert E, Turcotte, Marc H, Cynthia Wong Soft-tissue sarcoma of the foot Association medicale canadienne (2010)
90. Y.Miki, S.Ngan, J.C.M.Clark, T.Akiyama, P.F.M.Choong The significance of size change of soft tissue sarcoma during preoperative radiotherapy The journal of cancer surgery (2010) 678–683
91. Bonvalot S, Vanel D, Terrier D, Le Pechoux C et Lecesne Principe de traitement des sarcomes des tissus mous de l'adulte EMC (Elsevier Paris), appareil locomoteur, (2004) :44–099
92. Carrie C, Helfre S, Bouffet E, Brunat-Mentigny M. Radiotherapy and Ewing tumour in children. Bull Cancer 1995 ; 82 : 527–30.
93. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Versari M, Forni C, Donati D, et al. Local and systemic control in Ewing's sarcoma of the femur treated with chemotherapy, and locally by radiotherapy and/or surgery. J Bone Joint Surg Br 2003 ; 85 : 107–14.
94. Yock TI, Krailo M, Fryer CJ, Donaldson SS, Miser JS, Chen Z, et al. Local control in pelvic Ewing sarcoma: analysis from INT-0091 — a report from the Children's Oncology Group. J Clin Oncol 2006 ; 24 : 4947.
95. Donaldson SS. Ewing sarcoma: radiation dose and target volume. Pediatr Blood Cancer 2004; 42: 471–6.
96. Claude L. Pediatric Radiation Oncology Society Congress, Barcelona, 27–29 June 2007.



97. Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, DockhornDworniczak B, Dunst J, et al. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumour: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 1998; 9: 275–81.
98. Burgert Jr EO, Nesbit ME, Garnsey LA, Gehan EA, Herrmann J, Vietti TJ, et al. Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: a long-term follow-up of the First Intergroup study. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1664–74.
99. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumour of bone. *N Engl J Med* 2003; 348: 694–701.
100. Meyer WH, Kun L, Marina N, Roberson P, Parham D, Rao B, et al. Ifosfamide plus etoposide in newly diagnosed Ewing's sarcoma of bone. *J Clin Oncol* 1992 ; 10 : 1737–42.
101. Granowetter L, Womer R, Devidas M, Krailo M, Wang C, Bernstein M, et al. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2536–41.
102. Cornbleet MA, Corringham RE, Prentice HG, Boesen EM, McElwain TJ. Treatment of Ewing's sarcoma with high-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation. *Cancer Treat Rep* 1981 ; 65 : 241–4.
103. Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, Philip T, Plantaz D, Schmitt C, et al. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Société française des cancers de l'enfant. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 3997–4002.

104. Burdach S, van Kaick B, Laws HJ, Ahrens S, Haase R, Körholz D, et al. Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumours. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Düsseldorf University Medical Center, Germany and St-Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol* 2000 ; 11 : 1451-62.
105. Saylor 3rd RL, Stewart CF, Zamboni WC, Wall DA, Bell B, Stine KC, et al. Phase I study of topotecan in combination with cyclophosphamide in pediatric patients with malignant solid tumours: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 945-52.
106. Hunold A, Weddeling N, Paulussen M, Ranft A, Liebscher C, Jürgens H. Topotecan and cyclophosphamide in patients with refractory or relapsed Ewing tumours. *Pediatr Blood Cancer* 2006 ; 47 : 795-800.
107. Wagner LM, McAllister N, Goldsby RE, Rausen AR, McNallKnapp RY, McCarville MB, et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 132.
108. Cassier PA, Dufresne A, El Sayadi H, Pissaloux D, Alberti L, Decouvelaere AV, et al. Targeted therapy of sarcomas. *Bull Cancer* 2008; 95: 963-74.
109. Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene* 2003; 22: 9282-7.
110. Myatt SS, Redfern CP, Burchill SA. P38MAPK-Dependent sensitivity of Ewing's sarcoma family of tumours to fenretinide-induced cell death. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3136-48.

111. Castex MP, Rubie H, Stevens MC, et al. Extrasosseous localized ewing tumors: improved outcome with anthracyclines--the French society of pediatric oncology and international society of pediatric oncology [J]. J Clin Oncol. 2007, 25(10):1176-1182.
112. Chun-Fang Xie<sup>1,2</sup>, Meng-Zhong Liu<sup>1,2</sup>, Mian Xi<sup>1,2</sup> Extraskeletal Ewing's sarcoma: a report of 18 cases and literature review. Chinese Journal of cancer 2010
113. Robert S Bridge, Veena Rajaram, Louis P Dehner, John D Pfeifer and Arie Perry. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/ primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. Modern Pathology (2006) 19, 1-8
114. Pappo AS, Patel SR, Crowley J, Reinke DK, Kuenkele KP, Chawla SP, et al. R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors : results of a phase II sarcoma alliance for research through collaboration study. J Clin Oncol. 2011 ; 29 :4541-7.
115. Yoshinao Oda,<sup>1</sup> Hidetaka Yamamoto,<sup>1</sup> Kenichi Kohashi,<sup>1</sup> Yuichi Yamada,<sup>1</sup> Kunio Iura,<sup>1,2</sup> Takeaki Ishii,<sup>1,2</sup> Akira Maekawa<sup>1,2</sup> and Hirofumi Bekki<sup>1,2</sup>. Soft tissue sarcomas: From a morphological to a molecular biological approach Pathology International 2017



Royaume du Maroc المملكة المغربية

كلية الطب والصيدلة  
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

أطروحة رقم 21/030

سنة 2021

البيولوجيا الجزيئية: أداة تشخيصية جديدة في ساركوما  
يولينغ غير العظمية  
(بصدد 47 حالة)  
الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2021/01/13

من طرف

السيدة غيثة سقاط

المزداة في 1995/03/07 بفاس

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية

ساركوما يولينغ - البيولوجيا الجزيئية - FISH - EWS-FLI1 - RT-PCR

اللجنة

الرئيس	..... السيدة أريفي سامية
	أستاذة مبرزة في بيولوجيا الخلية
المشرفة	..... السيدة سناء بنيس
	أستاذة في بيولوجيا الخلية
الأعضاء	..... السيدة سميرة الفقير
	أستاذة في علم الأوبئة السريري
	..... السيدة ليلى بوكوش
	أستاذة مبرزة في علم الوراثة