



ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ  
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Royaume du Maroc المملكة المغربية

كلية الطب والصيدلة  
ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ ⵜⴰⵎⴰⵎⴻⵔⴰⵏ  
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2019

Thèse N° 144/19

**APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE  
DANS LE DIAGNOSTIC DES LIPOSARCOMES  
BIEN DIFFERENCIES ET DEDIFFERENCIES  
(à propos de 47 cas)**

THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 11/07/2019

PAR

Mme. BENMAACHOU HAJAR

Née le 13 septembre 1994 à Sidi Kacem

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

liposarcome – Immunohistochimie – FISH – MDM2 – CDK4

JURY

M. MARZOUKI ZEROUALI AMINE.....	PRESIDENT
Professeur agrégé de Traumatologie-orthopédie	
M. BENNIS SANAE.....	RAPPORTEUR
Professeur Habilité de Biologie cellulaire	
M. EL FAKIR SAMIRA.....	JUGE
Professeur d'Epidémiologie clinique	
M. SEKAL MOHAMMED.....	MEMBRE ASSOCIE
Professeur associé d'Histologie-Embryologie-Cyto-Génétique	

## Abréviations :

20X SSC	: Sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH 5.3
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN complémentaire
AEC	: Amino-Ethyl-Carbazole
ARN	: acide ribonucléique
CDK4	: Cyclin-dependent kinase-4
DAPI	: 4',6'-diamidino-phenylindole
DTNP	: 2,2'-Dithiobis (5-nitropyridine)
FISH	: fluorescence in situ hybridization
FNCLCC	: La Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer
H2O2	: peroxyde d'hydrogène
HCL	: chlorure d'hydrogène
HFM	: histiocytome fibreux malin
HMGGA2	: High Mobility Group AT-Hook 2
Ink4a	: Inhibitors of CDK4
IRM	: imagerie par résonance magnétique
LPS	: liposarcome
MDM2	: murine double minute 2
NAOH	: hydroxyde de sodium
OMS	: Organisation mondiale de santé
P53	: tumor protein 53
PBS	: tampon Phosphate Buffered Saline
PCR	: réaction en chaîne par polymérase
Q-PCR	: PCR quantitative ou PCR en temps réel
R0	: résection macroscopiquement et microscopiquement complète
RCP	: réunion de concertation pluridisciplinaire
RT-PCR	: reverse transcription PCR
STM	: Sarcomes des tissus mous
Taq polymérase	: ADN polymérase thermostable
TDM	: tomodynamométrie
TNM	: Tumeur , ganglions lymphatiques , métastases
VPN	: valeur prédictive négative
VPP	: valeur prédictive positive

# PLAN

<b>Introduction générale</b> .....	<b>6</b>
<b>Etude bibliographique</b> .....	<b>8</b>
I–Sarcomes .....	8
II–Liposarcomes .....	13
1–Histoire des liposarcomes .....	14
2–Présentation clinique .....	14
3–Imagerie des liposarcomes .....	17
4–Biopsie des liposarcomes .....	19
5–Examen anatomopathologique .....	22
6–Immunohistochimie.....	27
7 Biologie moléculaire .....	28
7.1–FISH .....	29
7.2–PCR .....	30
7.3–Les applications actuelles .....	33
7.4–MDM2 .....	38
7.5–Couple p53/MDM2.....	39
7.6 –Intérêt de la mise en évidence de l’amplification du MDM2 .....	40
8–Traitement des liposarcomes.....	41
8.1–Liposarcomes non métastatiques .....	42
8.2–Liposarcomes métastatiques .....	43
8.3–Radiothérapie.....	45
8.4–Chimiothérapie.....	46
8.5–Thérapies ciblées .....	48
9–Surveillance .....	48
10–Pronostic.....	49

11-Evolution .....	52
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>53</b>
I-Matériel d'étude .....	54
II-Méthodes d'étude.....	54
1-Fiche d'exploitation.....	54
2-Etude macroscopique .....	54
3-Histologie.....	55
4-immunohistochimie.....	61
5-Biologie moléculaire .....	62
5.1 -Extraction de l'ADN .....	62
5.2-La technique d'hybridation in situ fluorescente FISH.....	64
5.3-Amplification du gène MDM2 par FISH.....	68
5.4-PCR en temps réel .....	69
<b>Résultats .....</b>	<b>74</b>
1-Répartition selon l'âge.....	75
2-répartition selon le sexe .....	76
3-Répartition selon la localisation .....	77
4-Répartition selon le grade FNCLCC .....	79
5-Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine CDK4 .....	80
6-Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine MDM2 .....	81
7-Répartition de la détection du gène MDM2 selon la technique	
FISH .....	83
8-Répartition de la détection du gène MDM2 selon la PCR en temps	
réel .....	85
9-Sensibilité et spécificité de la technique FISH par rapport à	
l'immunohistochimie .....	86

10-Sensibilité et spécificité de la PCR en temps réel par rapport à l'immunohistochimie.....	88
<b>Discussion</b> .....	<b>90</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>99</b>
<b>Résumés</b> .....	<b>101</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>108</b>

# INTRODUCTION

## GENERALE

Les liposarcomes sont des tumeurs malignes des tissus mous d'origine mésenchymateuse. Ils représentent moins de 1% de tous les cancers de l'adulte. Ces tumeurs sont caractérisées par la présence de cellules adipeuses malignes à différents stades de différenciation.

L'âge moyen de survenue des liposarcomes est de 50ans, avec une légère prédominance masculine. Leur localisation est ubiquitaire ; ils se localisent par ordre décroissant au niveau des membres inférieurs, du retro péritoine, de la ceinture scapulaire et pelvienne. Il existe cependant des localisations rares qui sont le cordon spermatique, le péricarde et le périnée.

Le diagnostic de ces tumeurs peut être posé par imagerie médicale, mais il est actuellement admis que le diagnostic de certitude repose plutôt sur les données anatomopathologiques et essentiellement moléculaires avec le pronostic qui dépend du grade histologique et du taux de récurrence. Le traitement de base des liposarcomes est la chirurgie, en post opératoire, la radiothérapie permet de réduire le taux de récurrence locale alors que la chimiothérapie est d'utilité limitée.

Le but de notre étude est de montrer l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés. Dans cette étude réalisée sur 47 cas de liposarcomes reçus et diagnostiqués au centre hospitalier Hassan II, nous avons procédé à une comparaison des deux techniques moléculaires FISH et QPCR par rapport à l'histologie et l'immunohistochimie qui sont considérées comme techniques de base pour le diagnostic de ces tumeurs.

La nécessité de la biologie moléculaire est devenue indiscutable pour la détection de l'anomalie génétique qui est déterminante dans la précision du diagnostic et de classification des sarcomes. Cela a pour conséquence une diminution du risque de mutilation et de récurrence d'une part et une assurance d'approche thérapeutique ciblée et efficace d'autre part.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

## I-Les sarcomes

Les sarcomes sont un groupe de nombreuses tumeurs malignes rares qui se développent à partir du tissu conjonctif. Ces tumeurs sarcomateuses prennent naissance essentiellement à partir du tissu adipeux, muscles, vaisseaux, viscères ou bien du tissu osseux ou cartilagineux, elles se localisent dans divers endroits du corps (Honoré C 2015) et, selon la nouvelle classification de l'OMS 2013 on arrive à distinguer plus de 80 types et sous types moléculaires.

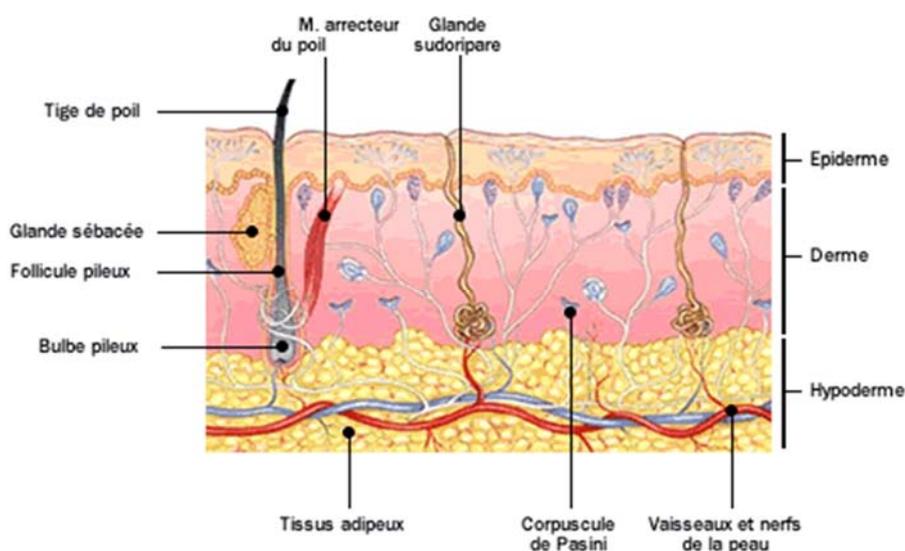


Figure 1 : les différentes composantes du tissu conjonctif

L'incidence de ces sarcomes est variable d'un pays à un autre. En effet, les estimations de 2016 suggèrent 12310 nouveaux cas avec 5330 décès aux USA. En France, l'incidence en 2013 est plutôt estimée à 50 cas pour un million d'habitants toutefois, le nombre de nouveaux cas attendus après cette date est estimé à 6 cas pour 100 000 habitants, soit 4000 nouveaux cas par an. Une étude de population en 2013 a montré 1500 nouveaux cas en Angleterre et 1255 au Canada avec 765 décès. (Société canadienne du cancer 2016)

Au Maroc, les données que nous avons sont uniquement celles indiquées sur le registre des cancers de la région du grand Casablanca 2005–2007, les STM ne représentent que 1,4% de tous les cancers (Bneider 2012). Une étude réalisée dans le CHU Hassan II de Fès a révélé une estimation de 2,15% de l'ensemble des cancers diagnostiqués entre 2008 et 2014 (Chbani 2013)

Les STM sont des tumeurs rares ne dépassant pas les 1% des tumeurs malignes de l'adulte et en même temps ils ne représentent qu'une minorité des tumeurs des tissus mous 1/200 (Société canadienne du cancer 2019). Le diagnostic des sarcomes est très difficile à cause de la rareté de ces tumeurs, de leur diversité morphologique, de leur localisation parfois inhabituelle (J.M.Coindre , L.Zelek 2006), et aussi par la pratique d'aujourd'hui qui va de plus en plus vers les microbiopsies. Ainsi, il est difficile pour un pathologiste d'acquérir suffisamment d'expériences pour poser un diagnostic précis (Coindre 1996, Guillou 1996–1998). Le risque ultime d'un mauvais diagnostic entraîne la réalisation de gestes inadaptés, qui peuvent compromettre un traitement conservateur ultérieur, rendant ainsi la prise en charge des sarcomes complexe avec un pronostic très réservé.

La dernière classification de l'OMS 2013 « histo génétique » basée sur la composition, la différenciation cellulaire et sur les anomalies moléculaires de la tumeur. L'objectif de cette classification est d'une part d'évaluer le pronostic et de définir le risque des métastases locales ou régionales et à distance, et d'autre part d'adapter au mieux la décision thérapeutique (société canadienne 2016, Collin 2006, coindre 2006).

Le mécanisme de la genèse des sarcomes reste inconnu vu leur rareté qui rend difficile la détermination des facteurs oncogènes (F.Collin2006). Cependant, la découverte d'anomalies génétiques récurrentes a conduit à la nouvelle classification 2013 qui prend en considération les données génétiques et moléculaires. L'arrivée

des marqueurs moléculaires spécifiques a permis d'affiner le diagnostic et de mieux évaluer le pronostic

Le diagnostic des sarcomes nécessitent donc la mise en évidence d'anomalies génétiques spécifiques plus que n'importe quelle autre pathologie. La compréhension du mécanisme moléculaire sous-jacent aidera non seulement à établir un diagnostic précis, mais également à choisir le traitement approprié. Des études récentes ont identifié des aberrations génétiques distinctes qui non seulement facilitent le diagnostic de certains sous-types de sarcomes, mais représentent également des cibles exploitables, car elles sont considérées comme essentielles à la pathogenèse de la maladie. Les gènes *CDK4* et *MDM2* sont surexprimées dans des liposarcomes différenciés et dédifférenciés et offrent des opportunités alléchantes poursuivies au cours des essais cliniques (M.A Dickson 2013). La confrontation radiologique, clinique, histologique avec l'analyse moléculaire aboutit à une meilleure prise en charge du patient avec une bonne stratégie thérapeutique.

Le traitement chirurgical reste la base du traitement curatif des sarcomes des tissus mous (société canadienne 2019, J.Fayette 2006). Le but du traitement est d'obtenir une exérèse complète de la tumeur, tout en conservant le plus possible la fonction du membre atteint (Bonvalot S 2004). La connaissance du mode d'extension locale de ces tumeurs est indispensable pour comprendre les principes qui régissent l'exérèse chirurgicale (société canadienne du cancer 2019, Bonvalot S 2004). La place de la radiothérapie et de la chimiothérapie n'est pas encore codifiée et n'améliore en aucun cas la survie globale (J.Fayette 2006). Les sarcomes ont un pronostic sombre, leur prise en charge ne peut se concevoir en dehors d'une concertation pluridisciplinaire constituée de : radiologues, chirurgiens, radiothérapeutes, anatomopathologistes, oncologues médicaux et psychologues.

### Classification des sarcomes selon L'OMS 2013 :

## **Les sarcomes des tissus mous :**

Les sarcomes des tissus mous et des viscères sont les plus fréquents des sarcomes

- Tissu graisseux : liposarcomes
- Tissu fibreux (tendons et ligaments): fibrosarcomes
- Muscles du squelette : rhabdomyosarcomes
- Muscles lisses : léiomyosarcomes
- Vaisseaux sanguins : angiosarcomes
- Derme : dermatofibrosarcome
- Nerfs : tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques
- Parois du système digestif : tumeurs stromales gastro intestinales

## **Les sarcomes des os et du cartilage**

- Ostéosarcomes, qui se développent dans la plupart des cas sur les os des membres, en particulier le fémur (près de la hanche ou du genou) et le bassin.
- Sarcomes d'Ewing, qui se localisent sur tous les gros os, mais surtout les os du bassin et les os des jambes.
- Chondrosarcomes sont des tumeurs qui se développent à partir du tissu cartilagineux

**Tissus mous du corps**

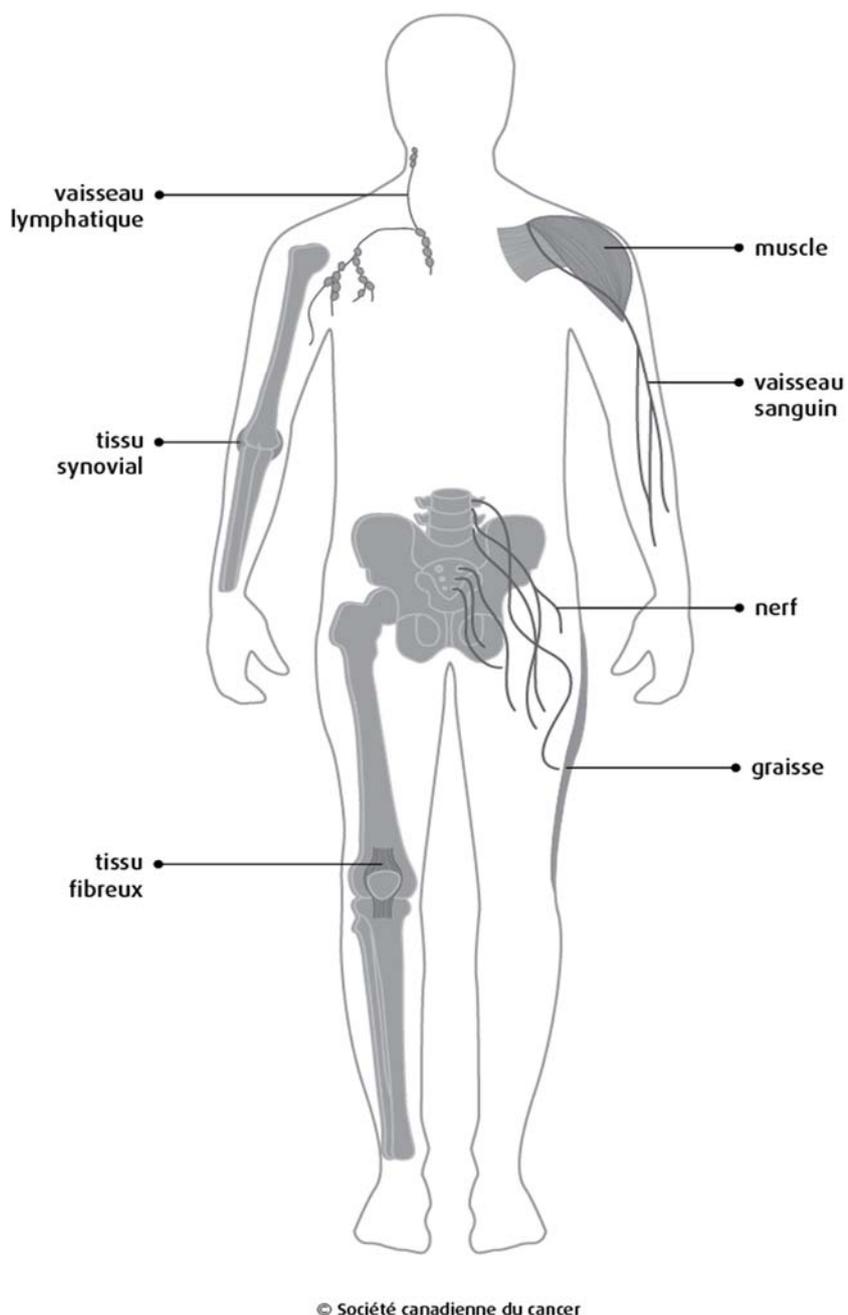


Figure 2 : les tissus mous du corps humain

**II-Les Liposarcomes**

Les liposarcomes sont des tumeurs rares des tissus mous qui se développent à partir du tissu adipeux. Ils représentent 1% de tous les cancers, 20% de tous sarcomes confondus et 15–25% des sarcomes des tissus mous (Arkun 1997). Ce sont des cancers qui touchent généralement les adultes, dont l'incidence atteint un pic entre 40 et 60 ans avec une légère prédominance masculine. Les liposarcomes de l'enfant ont plutôt tendance à apparaître pendant l'adolescence. (Arkun 1997) Cette pathologie couvre une grande variété de tumeurs et de lésions malignes qui sont agressives et à fort taux de rechute et/ou de métastases. Aucun type de liposarcome n'est lié un continuum de lipomes ou favorisé par la lipomatose, il s'agit bel et bien de deux pathologies distinctes (Coffin 1997). Cependant, il est recommandé de faire un suivi régulier et rigoureux pour tout lipome et une analyse moléculaire associée à l'histologie pour tout lipome dont la taille clinique est supérieure ou égale à 5 (Matsumoto 1999, Rydholm 1983)

Histologiquement, le liposarcome est divisé en 4 groupes : le liposarcome bien différencié, le liposarcome dédifférencié, le liposarcome myxoïde et le liposarcome pléomorphe (OMS 2013).

Le traitement des liposarcomes est basé sur la chirurgie pour les tumeurs résécables. Il existe peu d'options thérapeutiques disponibles pour le liposarcome métastatique. La sensibilité de la chimiothérapie varie considérablement entre les sous-types avec des taux de réponse plus élevés dans le liposarcome myxoïde par

rapport au liposarcome bien/ non différencié (48% versus 11%) . Le liposarcome myxoïde est également très radiosensible. Compte tenu du petit sous-groupe chimio-sensible, il existe un besoin de nouvelles thérapies moléculaires. (Mark.A Dickson 2013)

## **1-Histoire des liposarcomes :**

Les liposarcomes ont été décrits pour la première fois par Rudolf Virchow, médecin pathologiste allemand, en 1857, chez un patient ayant un liposarcome de la cuisse (Virchow R1857). En 1944, Arthur Purdy un chirurgien et anatomo-pathologiste américain connu pour avoir développé l'anatomopathologie des tumeurs des tissus mous, décrivait la façon étrange et fantastique du développement des cellules tumorales des tissus adipeux, leur taille impressionnante et leurs nombreuses particularités, cela fait d'elles des tumeurs de grand intérêt (Arthur P 1944). La localisation des liposarcomes est le plus souvent retrouvée au niveau de la cuisse (50%), l'abdomen, le thorax, le retro péritoine et le médiastin (45%), la tête et le cou (5%). Cependant, il existe d'autres emplacements inhabituels à titre d'exemple le cordon spermatique, la cavité péritonéale, les aisselles, la vulve et même les seins (société canadienne du cancer 2019).

## **2-Présentation clinique :**

Le liposarcome se présente généralement comme une masse enchâssée dans la peau. Avant que cette masse ne prenne de l'ampleur, elle est indolore et insidieuse. Toutefois, l'évolution et le développement de la masse tumorale peut gêner et /ou bloquer le mouvement si la tumeur comprime un nerf, un vaisseau ou un organe. (Brennan MF 2002).

Les liposarcomes à localisation péritonéale ont tendance à être découverts beaucoup plus tard, puisque le rétro péritoine peut s'adapter à un changement de volume plus important qu'une cuisse ne peut l'être. Ainsi, la masse tumorale est douloureuse et peut causer une obstruction urinaire ou des problèmes intestinaux en poussant sur ces organes et en les comprimant. Tandis que, les liposarcomes localisés du côté du thorax entraînent généralement une toux et des difficultés respiratoires (Brennan MF 2002).

La plupart des patients atteints de liposarcome consultent leur médecin en se plaignant d'une grosseur et non pas d'une douleur, parce que la tumeur est indolore sauf dans le cas d'une survenue d'un traumatisme. A la palpation, ces tumeurs prennent un aspect mou et charnu ou ferme au toucher. Les facteurs qui ont tendance à suggérer une malignité sont les masses profondes de plus de 5 cm, fermes et accrochées aux structures sous-jacentes. Il est donc d'une importance cruciale de distinguer très tôt entre lipomes bénins et liposarcomes (Brennan MF 2002). Ainsi, un examen physique poussé est nécessaire pour l'évaluation de toute masse, quelle que soit sa taille. Une attention particulière doit être également portée à la poitrine, l'abdomen, le pelvis et à l'emplacement d'origine de la tumeur.

La profondeur de la tumeur, l'augmentation de sa taille (au-delà de 5cm) et l'apparition d'une douleur sont les caractéristiques de malignité dans 86% des cas (Johnson CJ 2001). Ces critères sont prédictifs et font généralement suspecter un sarcome, il est donc recommandé d'adresser le patient à un centre spécialisé capable d'assurer une approche multidisciplinaire (ESMO 2014). L'intérêt de ces centres référentiels est d'éviter tout retard diagnostic ou un diagnostic différentiel (Johnson GD 2008) et de bénéficier d'un diagnostic collégial de qualité afin d'assurer une prise en charge thérapeutique adéquate. Il est clair maintenant que le pronostic et la survie des patients se basent essentiellement sur un diagnostic précoce et sur une prise en charge adaptée et optimale (Casali PG 2009), d'où les recommandations de l'ESMO qui se résument dans les points suivants :

- La nécessité d'une imagerie adaptée avant tout traitement
- La nécessité d'une biopsie percutanée, sous contrôle radiologique, avant tout traitement
- La nécessité de référer tout patient sarcomateux à un centre spécialisé

**Tableau1 : Principaux éléments sémiologiques différentiels lipomes / liposarcomes**

	<b>Lipome superficiel</b>	<b>Lipome intramusculaire</b>	<b>Liposarcome</b>
<b>Age</b>	adulte	Adulte	adulte
<b>Topographie</b>	Graisse sous-cutanée  Dos, épaule, cou, abdomen  Bras, cuisses	Muscle  Cuisses, épaules, bras	Muscles / Fascias  cuisse, rétropéritoine
<b>Taille</b>	< 5 cm (80%)	< 10 cm (95 %)	souvent > 5cm exceptionnellement < 5cm
<b>Contours</b>	Nets le plus souvent	Infiltrants ou nets	Nets le plus souvent
<b>Forme</b>	Unilobulaire	Unilobulaire (> 85%)	Plurilobulaire (> 90 %)
<b>Cloisons épaisses</b>	Absentes	Fibres musculaires	Présentes



Figure 3 : liposarcome de la cuisse

### 3-Imagerie des Liposarcomes :

Les modalités d'exploration des liposarcomes sont :

- Echographie : souvent réalisée en première intention, elle permet d'avoir une idée sur la taille, l'écho structure (liquidienne ou tissulaire) et la vascularisation à l'écho doppler.
- La radiographie standard : c'est un examen qui consiste à rechercher des calcifications, d'érosions corticales ou une réaction périostée.
- Scanner tomodensitométrie « TDM » : c'est un examen qui consiste à rechercher des plages graisseuses, préciser les limites de la tumeur, son extension et sa vascularisation. Il peut également montrer des calcifications ou une atteinte osseuse par contiguïté.
- Imagerie par résonance magnétique « IRM » : elle est considérée comme examen clé dans le diagnostic des sarcomes :

Elle permet de mesurer la tumeur dans les 3 plans de l'espace (critères OMS) plus grand diamètre dans le plan axial et plus grand diamètre perpendiculaire, d'avoir une idée sur sa topographie et sa profondeur, ainsi que ses rapports anatomiques : situation de la tumeur par rapport aux vaisseaux, nerfs, muscles, tendons, os et articulations. Elle peut aussi détecter la présence de nécrose, de tissu graisseux, myxoïde, d'hémorragie, d'hyper-vascularisation, d'une réaction inflammatoire de voisinage et de métastases comme elle peut faire le suivi évolutif post thérapeutique.

Les liposarcomes ont tendance à apparaître bien circonscrits et lobulés sur l'IRM. La prise de contraste dépend du niveau de différenciation. Peu de prise de contraste correspond à des liposarcomes bien différenciés alors qu'une prise de contraste plus importante révélera des sous-types plus agressifs tels les liposarcomes à cellules rondes, pléomorphes et dédifférenciés. Les liposarcomes myxoïdes, un sous-type intermédiaire, montrent une hétérogénéité dans la prise de contraste. Les autres aspects caractéristiques des liposarcomes sont d'épaisses cloisons fibreuses, une forme nodulaire et une prise de contraste sur les séquences où le tissu adipeux est supprimé. Des foyers d'hémorragie et de nécrose peuvent également être identifiés.

Les examens d'imagerie décrits plus haut sont une étape importante de l'identification du grade. De plus, comme les poumons sont le site le plus couramment atteint par les métastases, une radio et un scanner des poumons sont usuellement accomplis. Pour les liposarcomes, un scanner de l'abdomen est également recommandé étant donné l'envahissement relativement courant du péritoine et des viscères.

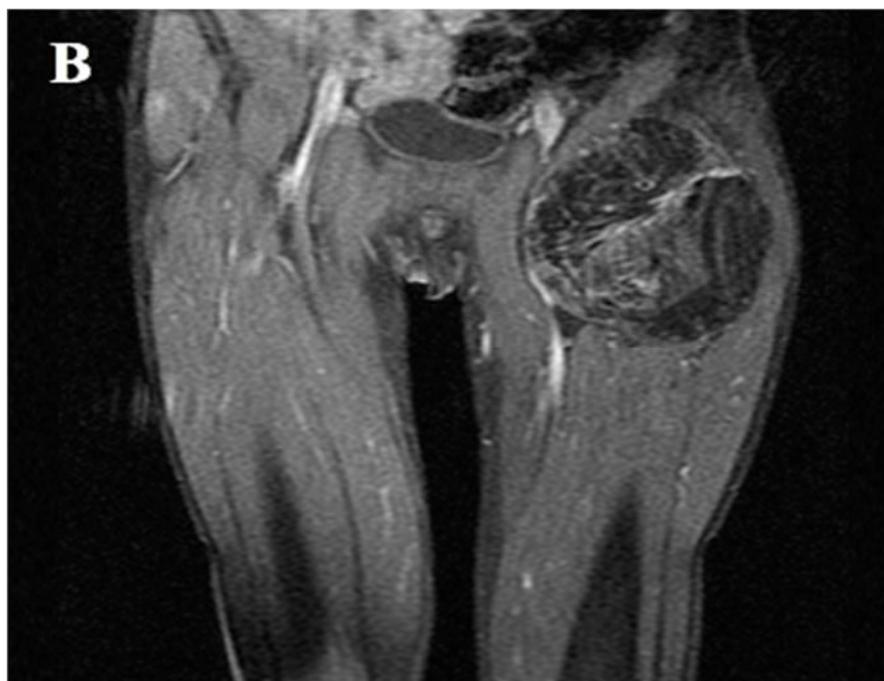


Figure 4 : IRM d'un liposarcome de la cuisse d'une séquence coronale d'un liposarcome dédifférencié avec injection de gadolinium. (thèse nationale Numéro 155/2018)

#### **4-Biopsie des Liposarcomes :**

Lorsqu'un sarcome est cliniquement suspecté, la réalisation d'une biopsie est obligatoire pour identifier le type de sarcome et déterminer son grade histologique. L'étude histologique permet non seulement de déterminer la nature de la lésion, mais également l'étendue de la propagation. Elle peut être réalisée soit par voie percutanée (ponction) sous échographie ou scanner ou de manière chirurgicale (incisionnelle ou exérèse).

Les indications et les modalités de la technique de biopsie doivent être impérativement discutées au préalable dans le cadre d'une réunion multidisciplinaire regroupant l'ensemble des praticiens impliqués dans la prise en charge de la maladie , dans tous les cas ,quelle que soit la technique indiquée, la biopsie d'une tumeur suspectée d'être un liposarcome doit obéir sans condition à une série de règles strictes visant à éviter tout geste potentiellement délétère (infection,

dissémination de la tumeur) tant pour le traitement que pour le devenir du patient.(J.FAYETTE 2005)

#### **4.1 –LA BIOPSIE PAR VOIE PERCUTANEE :**

La biopsie percutanée sous scanner ou sous échographie (lorsque la lésion est profonde) doit être préconisée en première intention. Cette biopsie échoguidée ou scannoguidée doit être réalisée sous anesthésie locale, en collaboration avec un radiologue et un anatomopathologiste, cette technique permet de prélever le matériel tumoral à l'aide d'un trocart, évitant ainsi les complications locorégionales rencontrées dans le cadre d'une biopsie chirurgicale.

Ce type de biopsie ne permet cependant pas toujours de recueillir une quantité suffisante de tissus tumoraux, ni d'évaluer le degré d'agressivité de la tumeur. C'est pour cela qu'une seconde biopsie percutanée ou un recours à la biopsie chirurgicale peuvent parfois s'avérer nécessaires, au cours de la biopsie, l'orifice de ponction doit être situé au niveau de la future cicatrice d'exérèse de façon à pouvoir être repris ultérieurement par le chirurgien lors du geste curatif et elle doit être réalisée avec des aiguilles coaxiales de 14 ou 16 gauges . Le point d'entrée intra tumorale doit être unique et tatoué , plusieurs carottes doivent être prélevées(minimum 3) afin de s'assurer d'une quantité suffisante de matériel tumoral permettant le diagnostic et la congélation .Il ne faut jamais ponctionner dans une zone nécrotique.

#### **4.2 –LA BIOPSIE CHIRURGICALE :**

Longtemps considérée comme un standard dans la démarche diagnostique des sarcomes, la biopsie chirurgicale ne trouve désormais plus son indication que lorsque la biopsie percutanée se solde par un échec et ne permet pas de prélever suffisamment de matériel tumoral. Elle doit être réalisée sous anesthésie générale et permet le prélèvement d'une quantité suffisante de tissu tumoral pour l'étude histologique et moléculaire. Cependant, le geste chirurgical présente un risque d'hématome, de surinfection et de dissémination tumorale au niveau de la cicatrice cutanée qui justifie à lui seul le recours à la biopsie percutanée en première intention.

Il existe 2 types de biopsie chirurgicale, incisionnelle qui est la technique la plus courante, l'intervention consiste en une petite incision permettant de prélever un petit fragment de la lésion suspecte et résectionnelle qui est uniquement réservée aux tumeurs mesurant moins de 3 cm, l'intervention consiste en une incision permettant le prélèvement intégral de la lésion suspecte. Dans ce type de biopsie l'accès doit être le plus direct possible, à l'aplomb de la tumeur, dans l'axe du membre afin de permettre l'exérèse de l'ensemble du trajet cutané lors du geste chirurgical curatif. La cicatrice d'incision doit être la plus petite possible (1 à 2 cm maximum), il ne doit pas avoir de décollement du plan anatomique et le drainage doit être évité pour limiter les risques de dissémination tumorale, s'il ne peut être évité, il faut faire sortir le drain par la cicatrice ou à proximité vers le bas afin que son trajet puisse être retiré ultérieurement par le chirurgien.

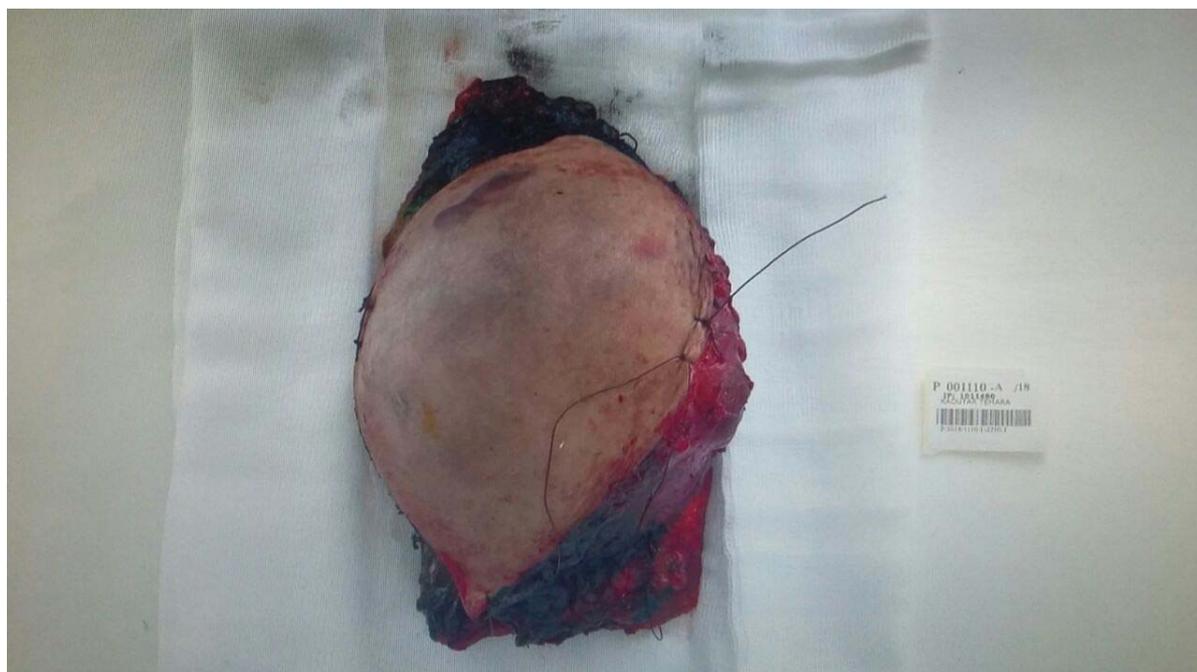


Figure 5 : une exérèse d'un liposarcome réalisé dans le service de traumatologie du CHU Hassan II de Fès (B4) sous la supervision du Pr El Mrini A.

### 5-Examen anatomopathologique :

Avant toute biopsie de la tumeur il est obligatoire de prévenir l'anatomopathologiste et lui mettre en disposition les renseignements cliniques qui sont indispensables pour l'interprétation des lames (bien renseigner le bordereau d'envoi au laboratoire) : âge, sexe, antécédents du patient, siège et profondeur de la lésion, symptômes et évolutivité, traitement préalable et aspects radiologiques. Les prélèvements biopsiques doivent être acheminés à l'état frais, au laboratoire, dans les 30 minutes suivant le prélèvement, ils seront placés immédiatement dans un récipient contenant une quantité suffisante de formol à 4%, ensuite ils seront fixés pendant au moins 6H (idéal 24H) puis scindés par le pathologiste dans au moins deux blocs de paraffine . Un prélèvement biopsique supplémentaire, stérile, en tube sec, est recommandé, Il sera congelé dans les plus brefs délais au laboratoire d'anatomopathologie et réservé pour la biologie moléculaire.

Le diagnostic histologique est posé selon la classification OMS 2013 d'où l'intérêt de l'immunohistochimie.

L'étude anatomopathologique permet de préciser le grade histo-pronostique du liposarcome selon La Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer FNCLCC, évaluer la qualité des berges de l'exérèse, rechercher la présence d'éventuelles embolies néoplasiques, d'atteinte des troncs nerveux, des axes vasculaires et des structures osseuses pour faire la classification TNM 2010. En cas de traitement néo adjuvant l'étude anatomopathologique évaluera la réponse au traitement (importance de la nécrose et pourcentage de cellules tumorales viables)

❖ **Classification des liposarcomes selon l'OMS« 2013 »****Tableau 2: Sous-types de liposarcomes**

<b>Bien différenciés</b>	<p>-Inclut les lipomes atypiques            -Sous-type le plus courant :50% des liposarcomes.            -Bas grade, ne métastase pas mais peut récidiver            -Risque de dédifférenciation            -Evolution lente</p> <p>Il est subdivisé en :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• «liposarcome <i>lipomalike</i> », le plus fréquent, mimant le lipome à la fois macroscopiquement et microscopiquement</li> <li>• «liposarcome <i>inflammatoire</i> » (follicules lymphoïdes),</li> <li>• « liposarcome <i>sclérosant</i> » (septa fibreux ou fibro-myxoïdes avec cellules atypiques).</li> </ul> <p>Le type inflammatoire et le type sclérosant sont moins fréquents et s'observent surtout dans le rétropéritoine.</p>
<b>Myxoïdes</b>	<p>- Le plus fréquent des liposarcomes peu différenciés et constitue la forme la plus fréquente aux extrémités.            -Inclut la variété à cellules rondes comme son homologue de haut grade. Catégorie la plus fréquente chez les enfants.</p> <p>- Grade intermédiaire.</p> <p>- Le pronostic est en fonction de l'étendue de la nécrose et de la présence de cellules rondes (métastases hématogènes : 20 à 30% si myxoïde pur, &gt;50% si à cellules rondes).</p> <p>- Risque de métastases en particulier pour la variété à cellules rondes aux séreuses (plèvre, péritoine, péricarde...), à la graisse sous-cutanée et à l'os, particulièrement au rachis.</p>
<b>Pléomorphes</b>	<p>- Catégorie la plus rare (5 à 10% des liposarcomes)            Grade élevé            Ressemble au HFM ou carcinome ou mélanome            Risque élevé de récurrence locale et métastases</p>
<b>Dédifférenciés</b>	<p>- Sarcome de haut grade            La plus commune des lésions rétro péritonéales</p> <p>- Des plages très différenciées côtoient des zones dédifférenciées. Son pronostic est moins défavorable que celui du liposarcome pléomorphe.            -Risque de métastases</p>

**❖ Classification TNM « 2010 » :**

**T X** Tumeur primitive non évaluable

**T0** Tumeur primitive non retrouvée

**T 1** 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 à distance

**Identification du grade des liposarcomes :**

Stade IA	T1a	N0	M0	G1 ,GX
	T1b	N0	M0	G1, GX
Stade IB	T2a	N0	M0	G1, GX
	T2b	N0	M0	G1, GX
Stade IIA	T1a	N0	M0	G2 , G3
	T1b	N0	M0	G2 ,G3
Stade IIB	T2a	N0	M0	G2
	T2b	N0	M0	G2
Stade III	T2a	N0	M0	G3
	T2b	N0	M0	G3
	Tout T	N1	M0	Tout G
Stade IV	Tout T	Tout N	M1	Tout G

❖ **Grading-histopronostic des STM selon la FNCLCC :**

La Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC) propose trois grades subjectifs, classés en fonction du nombre ou la somme des scores. La différenciation tumorale, l'index mitotique et la nécrose tumorale sont les facteurs déterminants de ces scores.

### 1) Différenciation tumorale :

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

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

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

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

Score 1 : 0 à 9 mitoses pour 10 pour 10 champs

Score 2 : 10 à 19 mitoses pour 10 champs

Score 3 : Plus de 19 mitoses pour 10 champs

### 3) Nécrose tumorale :

Score 0 : Absence de nécrose

Score 1 : < 50 % de nécrose tumorale

Score 2 : > 50 % de nécrose tumorale

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

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

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

## 6-Immunohistochimie :

L'étude immunohistochimique est une technique complémentaire à l'analyse histologique et pratiquement incontournable dans le cas des liposarcomes. Cependant, il n'y'a pas un anticorps spécifique à ces tumeurs.

C'est une technique qui nécessite une bonne qualité de pratique et l'utilisation d'un panel d'anticorps pour une même tumeur. Elle permet de confirmer la nature sarcomateuse de la tumeur en éliminant une tumeur non conjonctive (carcinome, mélanome, lymphome). Ainsi, il est recommandé au pathologiste d'avoir en sa possession les anticorps suivants : la myogenine, le CD34, le CD31, la cytokératine, l'EMA, la PS100, l'HMB45, le MIC2, le CD117, l'HHV8, le Fli1, le MDM2 et le CDK4. (Réseau de cancérologie des midi pyrénées 2008)

La *MDM2* et *CDK4* et *HMGA2* peuvent aider à diagnostiquer un liposarcome bien différencié. Toutefois, dans les formes de liposarcome bien différencié de type « lipoma-like », le marquage avec *MDM2* et/ou *CDK4* peut être très faible voir absent, de plus que la *MDM2* n'est pas spécifique du liposarcome, d'ailleurs elle peut être positive dans d'autres types de tumeurs comme les carcinomes et les mélanomes, cela nécessite dans certaines situations cliniques (tumeur profonde/rétro-péritonéale, grande taille) une confirmation ou infirmation formelle par une analyse moléculaire.

Dans ces situations à problème, la biologie moléculaire (recherche d'une amplification des gènes *MDM2* et/ou *CDK4* par FISH ou PCR) peut apporter des arguments décisifs en faveur de la bénignité ou de la malignité (Fletcher CDM 2013), elle est surtout indispensable lorsqu'il n'existe qu'une composante dédifférenciée sur les prélèvements, Néanmoins la vérification de la cohérence avec l'imagerie reste primordiale. (Réseau de cancérologie des midi Pyrénées 2008)

## 7-Biologie moléculaire :

Au cours des dix dernières années, de nombreuses anomalies génétiques spécifiques ont été décrites permettant une classification moléculaire.

La description initiale de ce type de lésions a été faite par étude cytogénétique classique sur caryotype nécessitant du matériel tissulaire à l'état frais et une mise en culture des tissus prélevés. Cette technique est relativement contraignante et difficile à mettre en œuvre en pratique quotidienne.

Des techniques de biologie moléculaire, plus sensibles et plus précises, ont été développées et sont plus adaptées à la routine. Il s'agit principalement des techniques de PCR (Polymerase Chain Reaction) et de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) qui sont facilement adaptées et utilisées sur du matériel fixé et inclus en paraffine.

Ces techniques sont de plus en plus obligatoires et indispensables pour préciser le diagnostic basé sur l'étude morphologique. Un diagnostic précis permet d'orienter et d'adapter le traitement par rapport au type histologique des liposarcomes.

### **7.1 – La technique d'hybridation in situ par fluorescence « FISH » :**

Le principe est de visualiser des séquences spécifiques d'acides nucléiques portant l'anomalie génétique à l'aide d'un fluorochrome. Le protocole technique peut être appliqué aussi bien sur des cellules métaphasiques que sur un noyau interphasique, pour cela on peut utiliser des appositions ou frottis sur lames, des coupes de tissu congelé ou du tissu fixé et inclus en paraffine.

L'avantage de cette technique est qu'elle est pratiquement réalisable sur tout type de matériel conservé dans les laboratoires d'anatomie pathologique.

La reproductibilité de cette technique dépend du matériel utilisé, mais principalement du type du fixateur (le liquide de bouin est formellement interdit parce qu'il détruit le matériel génétique) et de la durée de fixation, il est également nécessaire de réaliser des étapes de prétraitements pour l'accès des sondes aux acides nucléiques cibles et pour la bonne conservation de la morphologie tissulaire. Par ailleurs, l'interprétation des résultats doit se faire sous microscope à fluorescence

pour mettre en évidence l'anomalie génétique portée par les cellules et détectée par sondes spécifiques à savoir des amplifications, des délétions et des translocations. Toutefois, l'interprétation peut parfois être difficile, c'est pour cela qu'il est recommandé de faire au moins une double lecture assurée respectivement par un biologiste moléculaire/généticien et un pathologiste tout en respectant le consensus international. (G.Abadjian 2004)

### **7.2-LA TECHNIQUE DE POLYMERASE REACTIONS EN CHAINE « PCR »**

Cette technique, mise au point en 1983, a révolutionné l'exploration de l'ADN et de l'ARN et est maintenant utilisée de manière quotidienne et routinière dans de nombreux laboratoires aussi bien de recherche que d'analyses médicales.

Son principe consiste à amplifier de manière exponentielle et spécifique un fragment d'ADN grâce à l'utilisation de l'enzyme ADN polymérase stable à la chaleur (Taq polymérase extraite d'une bactérie vivant dans l'eau chaude dénommée *thermusaquaticus*). L'amplification de quelques copies d'ADN peut atteindre le milliard d'exemplaires après 30 cycles de PCR.

Cette amplification peut se faire à partir d'ADN ou d'ADN complémentaire (ADNc = dérivant d'ARN après reverse transcription, RT).

Il convient de connaître la séquence nucléotidique de l'acide nucléique cible que l'on veut amplifier (séquences disponibles sur des bases de données accessibles par Internet) et la position de l'anomalie portée par la séquence pour le bon choix des amorces. Ces dernières sont des séquences oligonucléotiques courtes de l'ordre de 20 paires de bases et qui encadrent le brin d'acide nucléique à amplifier. Des programmes informatiques également accessibles par Internet sont disponibles pour aider à donner la bonne séquence nucléotidique de ces amorces. Chaque cycle de PCR comprend trois étapes, d'abord une dénaturation de l'ADN cible

en chauffant à plus de 90° , ensuite une hybridation des amorces sur le brin d'ADN cible qui se fait à environ 55° et enfin une extension ou copie du brin d'ADN cible à partir des amorces qui se fait à environ 72° grâce à la Taq polymérase. Chaque cycle complet de PCR double donc le capital initial d'acides nucléiques. Cette amplification exponentielle permet ainsi d'aboutir à une quantité très importante d'ADN cible de manière spécifique. La visualisation des produits de PCR peut se faire sur gel d'agarose, par électrophorèse capillaire ou de plus en plus par fluorescence d'où la technique de PCR en temps réel ou PCR quantitative. Des automates commercialisés assurent la réalisation de cette technique qui permet de noter, pour chaque cycle d'amplification, la quantité réelle de produit amplifié détecté par fluorescence. On obtient donc en temps réel une courbe d'amplification.

La PCR en temps réel est une technique ayant de nombreuses applications, basée sur une réaction enzymatique et sur une mesure en continu de son produit. Il existe différents appareils de PCR en temps réel. À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicons est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR en point final.

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR point final, cycle  $n < 40$  = PCR semi-quantitative). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (à cause d'un « quencher » ou d'un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un

numéro de cycle PCR appelé « Ct » pour « Cycle Threshold » soit « cycle seuil ». C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisées.(Elyse.P , Alain.H 2002)

Les techniques de PCR sont réalisables à partir d'une très faible quantité d'ADN ou d'ARN. Ces acides nucléiques peuvent être extraits à partir de tissu congelé, de tissu fixé et inclus en paraffine ou même de tissu micro-disséqué. En cas de tissu fixé et inclus en paraffine, la longueur du brin d'acide nucléique amplifié ne pourra pas dépasser 200 paires de base, du fait de la fragmentation des acides nucléiques liée à la fixation.

.Les différents fixateurs utilisés, excepté le liquide de bouin, donnent de bons résultats en biologie moléculaire. Il convient cependant de savoir que la qualité des acides nucléiques extraits dépend en grande partie de la durée de la fixation et qu'en pratique une fixation de plus de trois jours donnera difficilement des acides nucléiques exploitables. Il est donc recommandé de respecter les étapes de pré-analyse comme cela a été démontré et décrit dans plusieurs revues (Louati et Bennis 2018)

La technique PCR a également des avantages et des limites, l'avantage c'est qu'elle est d'une grande spécificité et surtout sensibilité pour les liposarcomes, pratiquement tous les types de matériel, en particulier ceux conservés dans les laboratoires d'anatomie pathologie sont utilisables.

La technique de PCR en temps réel permet de quantifier de manière fiable l'acide nucléique cible. On peut ainsi évaluer le nombre de copies d'un gène en fonction d'un gène de référence. La limite de cette technique est que sa grande sensibilité explique la plupart des faux positifs observés. En effet, une seule copie de la séquence à

amplifier aboutit à un résultat positif. Cette copie peut très facilement venir de la contamination d'un prélèvement à un autre. Il convient d'être donc très rigoureux lorsque l'on manipule cette technique et de séparer physiquement les différents temps d'extraction d'acides nucléiques et d'amplification en utilisant des pièces différentes et non communicantes.

### **.7.3–Les applications actuelles :**

Ces dernières décennies ont été marquées par l'utilisation de la biologie moléculaire comme outil complémentaire et parfois indispensable pour le diagnostic des sarcomes, particulièrement lorsque leur localisation est inhabituelle ou lorsqu'il y'a un diagnostic différentiel avec une autre tumeur. Ce diagnostic moléculaire basé sur la détection d'expression des gènes a un impact sur la prise en charge des patients.

#### **❖ La détection de translocations :**

Il s'agit principalement de la détection des translocations réciproques spécifiques de certains types histologiques. En pratique, les sarcomes pour lesquels cette détection est le plus souvent utilisée sont le synoviosarcome, le sarcome d'Ewing/PNET le rhabdomyosarcome alvéolaire et le liposarcome myxoïde. La recherche de cassure chromosomique est indispensable pour la fiabilité du diagnostic puisque le traitement dépend du diagnostic.

La détection de translocation dans les sarcomes d'ewing est le plus souvent localisée entre les chromosomes 11 et 22, fusionnant ainsi les gènes EWS du chromosome 22 et FLI1 du chromosome 11. Dans les sarcomes d'Ewing, il existe une hétérogénéité moléculaire importante, ainsi la translocation t(11;22) fusionnant EWS et FLI1 comporte 18 types de transcrits différents ce qui nécessite un long produit d'amplification de l'ordre de 800 paires de bases pour les mettre tous en évidence. La

démonstration de cette translocation spécifique est maintenant presque indispensable pour affirmer formellement le diagnostic de sarcome d'Ewing. En effet, le sarcome d'Ewing correspond à une tumeur maligne à petites cellules rondes dont le profil immunohistochimique est peu spécifique et les cas de diagnostics incertains sont nombreux en pratique. Etant donné qu'il existe des protocoles thérapeutiques adaptés à ce type histologique, il convient donc systématiquement de congeler un fragment de tumeur chez les sujets susceptibles d'être porteurs d'un sarcome d'Ewing, en particulier chez les sujets jeunes de moins de 30 à 40 ans porteurs d'une tumeur des tissus mous ou d'une tumeur osseuse. (M.Taylor 2005).

Dans plus de 95 % des cas des synoviosarcomes, il existe plutôt une translocation spécifique faisant intervenir le gène SYT sur le chromosome 18 et le gène SSX1 ou SSX2, et plus rarement SSX4 sur le chromosome X . La technique développée sur tissu fixé et inclus en paraffine, qu'il s'agisse d'une technique de PCR classique ou d'une technique de PCR en temps réel est sensible et spécifique.

Un autre type de sarcome caractérisé par la même anomalie génétique « cassure chromosomique » sont les rhabdomyosarcomes alvéolaires qui représentent 30 à 40 % de l'ensemble des rhabdomyosarcomes du sujet jeune. Ils ont un très mauvais pronostic avec un potentiel métastatique important et bénéficient actuellement d'une intensification thérapeutique avec chimiothérapie première. Ils nécessitent donc d'être reconnus de manière fiable. Ces tumeurs comportent une translocation spécifique rapportée dans 85 % des cas. Il s'agit le plus souvent d'une translocation t(2;13) fusionnant les gènes PAX3 et FKHR ou plus rarement t(1;13) fusionnant les gènes PAX7 et FKHR (Edward RH 1997).

Les liposarcomes myxoïde et à cellules rondes sont des sarcomes qui possèdent le même type de translocation montrant ainsi qu'ils appartiennent à la

même catégorie de tumeurs. Il s'agit d'une translocation t(12;16) dans plus de 90 % des cas fusionnant les gènes DDIT3 et FUS ou plus rarement une translocation t(12;22) fusionnant les gènes DDIT3 et EWS (Antonescu CR 2001). Cette translocation est spécifique de cette catégorie de tumeurs. Elle peut être retrouvée sur tissu fixé et inclus en paraffine soit par RT-PCR, soit par technique de FISH. Le diagnostic de liposarcome myxoïde/à cellules rondes est habituellement facile, mais la mise en évidence de cette translocation peut être utile pour le diagnostic de certains liposarcomes exclusivement constitués de cellules rondes, pour distinguer un liposarcome bien différencié sclérosant myxoïde d'un liposarcome myxoïde, un liposarcome pléomorphe d'un liposarcome à cellules rondes ou identifier un liposarcome à cellules rondes ou myxoïde dans une localisation inhabituelle telle le mésentère. Le type de translocation en cause n'a pas de valeur pronostique (Antonescu CR 2000).

❖ La détection d'amplification :

Différents travaux de cytogénétique classique ou moléculaire FISH et PCR ont montré que les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés ont un profil génomique particulier avec une amplification des gènes *MDM2* anti apoptose (95% – 100%) et *CDK4* activateur de la division cellulaire (90% –95%) localisées sur la région q13–15 du chromosome 12. L'amplification de ces deux gènes peut être mise en évidence en pratique diagnostique par immunohistochimie, FISH et PCR quantitative. Les anticorps anti-MDM2 et CDK4 sont relativement sensibles, mais pas très spécifiques pour détecter une amplification de ces gènes. En outre, la technique est parfois difficile à mettre au point du fait de la fixation non contrôlée aboutissant à un bruit de fond rendant la technique ininterprétable. Il convient donc de se souvenir qu'une positivité en immunohistochimie révèle une hyper expression de la protéine mais pas toujours une amplification du gène contrôlant cette protéine. La technique FISH est, en revanche, spécifique de l'amplification et a l'avantage de montrer les cellules tumorales porteuses de cette anomalie génétique. Bien entendu, se fier des cellules tumorales qui sont parfois intriquées à de nombreuses cellules inflammatoires. La technique FISH est tributaire des étapes de pré analyse, particulièrement pour le tissu fixé en paraffine, où parfois le biologiste moléculaire ou le cytogénéticien est confronté à une vraie difficulté d'interprétation ce qui entraîne un résultat définitif douteux qu'on ne doit pas prendre en considération.

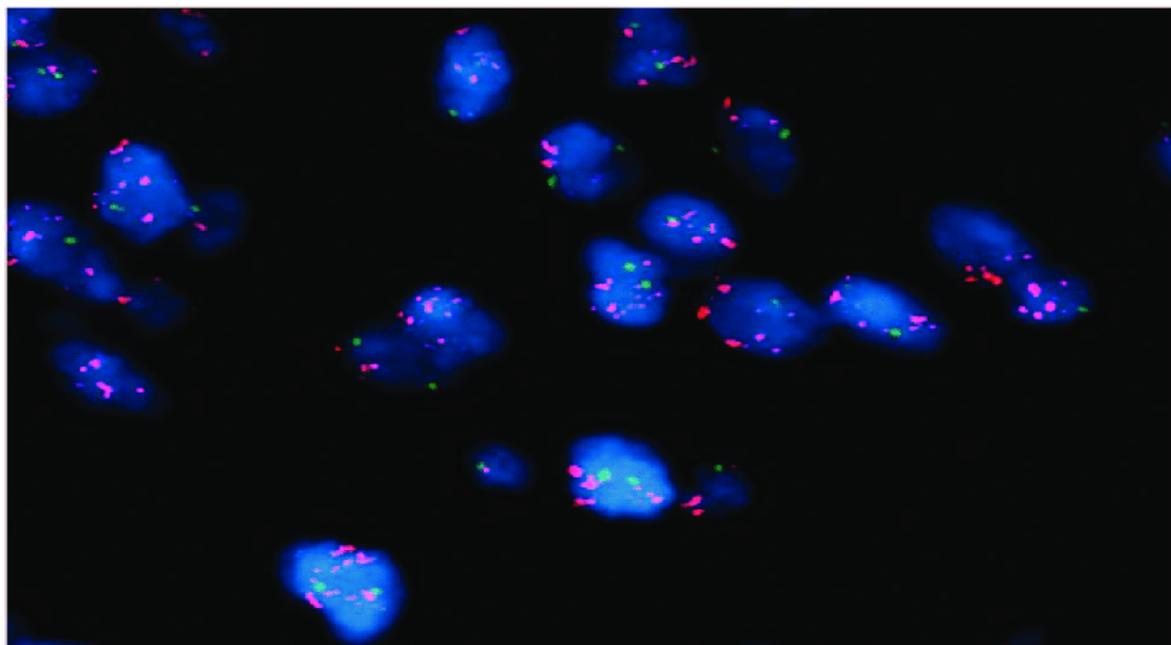


Figure 6: Amplification du gène *MDM2* par la technique FISH (Thèse nationale 155/2018)

La PCR quantitative permet elle aussi de détecter une amplification de ces gènes à partir de tissu fixé et inclus en paraffine. Elle a l'inconvénient de mélanger l'ensemble des cellules tumorales et non tumorales et de donner une moyenne de nombre de copies de gènes. Elle peut de ce fait être faussement négative lorsque les cellules tumorales sont minoritaires par rapport aux cellules réactionnelles. Cette recherche d'amplification de *MDM2* et *CDK4* est importante au niveau des tumeurs du rétro péritoine qui correspondent souvent à des liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés. Elle est particulièrement utile en cas de liposarcomes à cellules fusiformes ou pléomorphes et qui correspondent, le plus souvent au niveau du rétro péritoine, à la composante dédifférenciée d'un liposarcome.

#### **7.4-MDM2 :**

Le proto-oncogène *MDM2* a été découvert dans une lignée cellulaire murine spontanément transformée (3T3DM) qui contenait une amplification de ce gène dans des fragments d'ADN « double-minutes » (minichromosome en surnombre) (Cahilly.S 1987 , Haines DS 1997). Deux types de résultats ont, par la suite, permis de classer *MDM2* parmi les oncoprotéines : l'augmentation du potentiel tumorigène de cellules murines présentant une expression élevée du gène *MDM2* (Fakharzade SS 1991) et l'observation de différents types de tumeurs humaines présentant un gène *MDM2* amplifié aboutissant à une surexpression de la protéine.

A cet égard, un travail récent de compilation de données a montré un taux élevé d'amplification du gène *MDM2* dans les sarcomes des tissus mous et les ostéosarcomes qui sont de l'ordre de 20 % et 16 % respectivement ; alors que les leucémies et lymphomes ne présentent pas d'amplification (Momand .J 1998). D'autres mécanismes, cependant, peuvent aussi aboutir à une accumulation de la protéine *MDM2* dans des cellules tumorales humaines. Ainsi, une surexpression des ARN et de la protéine a été observée dans diverses leucémies, en absence d'amplification du gène et une augmentation spécifique du niveau de traduction du messager *MDM2* a été décrite dans plusieurs types de tumeurs. (Landes JE 1997 , Capoulade.C 1998)

Le gène humain *MDM2* (appelé également « *hDM2*»), localisé sur le chromosome 12 (région 12q14-q15), code pour une protéine nucléaire ayant une masse de 90/95 kDa (Olson DS 1993) (La protéine de 90 kDa se compose de plusieurs régions conservées phylogénétiquement: un domaine amino-terminal essentiel pour la liaison à la p53 ; un domaine contenant un site de localisation nucléaire ; une région acide (caractéristique de certains facteurs transactivateurs) ; une région à doigts de zinc et enfin un domaine carboxyterminal contenant des doigts de zinc de type RING-finger.

#### **7.5- Le couple p53/MDM2, un élément majeur de la transformation maligne :**

La p53 est le produit de l'un des gènes appelé « suppresseurs de tumeurs ». Cette protéine est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort des cellules par apoptose, lorsque celles-ci sont soumises à divers types de stress notamment le stress génotoxique (May .P 1994). C'est par l'activité transcriptionnelle de la protéine, localisée dans sa partie amino-terminale, que la p53 exerce la majorité de ses effets. *MDM2* se lie à cette partie amino-terminale et la formation du complexe p53/*MDM2* a pour conséquence d'inhiber la fonction transactivatrice de la p53.

En outre, il a été montré que l'association de ces deux protéines induit une dégradation accélérée de la p53. Des résultats récents indiquent que cette dégradation, qui fait intervenir le système ubiquitine-protéase, pourrait être due à une activité ubiquitine ligase de *MDM2* et nécessiterait la présence dans le complexe p53/*MDM2* du co-activateur de la transcription p300 (Grossman.SR 1998).

Très récemment, il a été montré que *MDM2* pouvait se lier à l'un des produits du gène suppresseur de tumeurs Ink4a (appelé p19Arf chez la souris et p14Arf chez l'humain) ce qui entraînerait sa neutralisation (par un mécanisme qui n'est pas encore clairement établi) et aboutirait, de ce fait, à la restauration de la fonction transactivatrice de la p53. Si *MDM2* contrôle le niveau et l'activité de la protéine p53, on sait aussi aujourd'hui, qu'en retour, la p53 contrôle *MDM2* au niveau transcriptionnel, en effet, le gène *MDM2* possédant un site de fixation pour la p53 dans son premier intron, sa transcription peut être spécifiquement activée par cette molécule. (Barak .Y 1993)

Une boucle de rétrocontrôle existe donc entre la p53 et *MDM2* qui permet à la p53 de moduler son propre niveau d'expression ainsi que son activité en induisant l'expression de son régulateur négatif *MDM2*. La rupture de cet équilibre vers une accumulation de *MDM2*, par un mécanisme quelconque, entraîne donc une incapacité

de la p53 à contrôler le cycle cellulaire et/ou l'apoptose et favorise ainsi la transformation maligne des cellules.

L'utilisation de souris dont le gène *MDM2* a été invalidé a, par ailleurs, permis de montrer l'importance de la régulation de l'activité de la p53 par *MDM2* au cours du développement. En effet, les souris *MDM2*<sup>-/-</sup> meurent à des stades embryonnaires précoces, alors que la même invalidation génique n'entrave pas le développement embryonnaire de souris déjà déficientes en p53. Outre cette activité régulatrice de la p53, il apparaît aujourd'hui que *MDM2* possède des fonctions supplémentaires pouvant, ou non, mettre en jeu des interactions avec d'autres molécules.

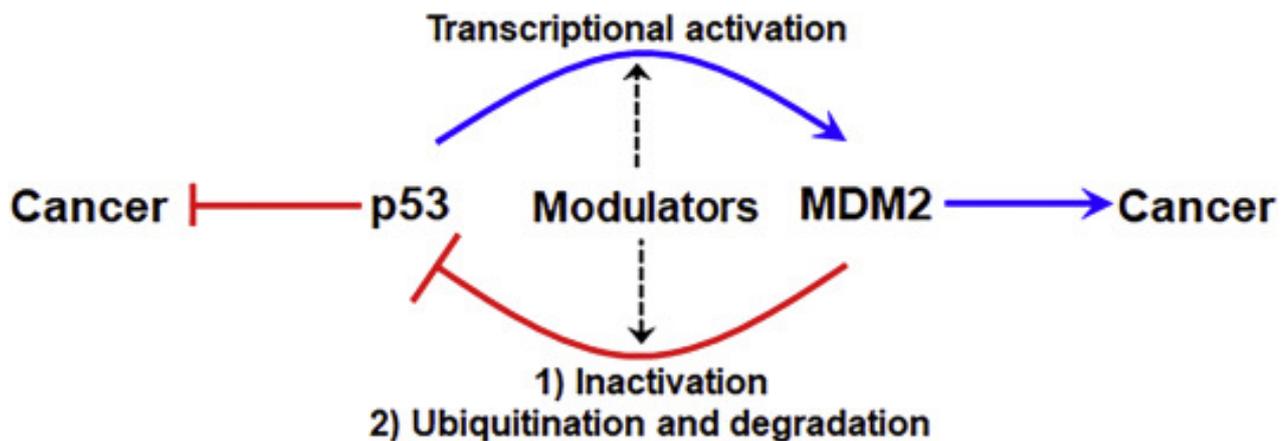


Figure 7 : rôle du couple p53/*MDM2*

### 7.6–L'intérêt de la mise en évidence de l'amplification du gène *MDM2/CDK4* :

L'utilisation des anomalies moléculaires spécifiques dans les sarcomes des tissus mous a plusieurs intérêts : intérêt diagnostique majeur avec une amélioration du diagnostic et de la classification des sarcomes.

- L'amplification du *MDM2* présente une double utilité selon le contexte :

- devant une tumeur adipeuse différenciée, elle permet de distinguer deux tumeurs dont la prise en charge thérapeutique n'est pas la même, à savoir le liposarcome bien différencié, d'un lipome mature.
- devant un sarcome indifférencié de haut grade, l'amplification du MDM2 permet d'orienter le diagnostic de façon plus précise vers un liposarcome dédifférencié ; ceci est particulièrement utile dans les localisations péritonéales où l'analyse morphologique repose le plus souvent une petite biopsie à l'aiguille.

A noter qu'il n'y a pas de marqueurs génétiques permettant de distinguer de façon formelle le liposarcome dédifférencié de la forme bien différenciée. (H. Atoine-Poirel 2015)

## **8-Traitement des Liposarcomes :**

Le traitement des sarcomes est différent d'un type à un autre, leur prise en charge nécessite une approche pluridisciplinaire gérée par des centres experts dans le domaine des sarcomes. Ce sont des tumeurs rares qui ont des particularités cliniques à prendre en considération, comme l'évolution rapide et la compression d'organes, et également des spécificités histo-moléculaires dont le traitement des sarcomes des tissus mous dépend.

Les liposarcomes sont souvent diagnostiqués tardivement. Le traitement doit donc être mis en place le plus rapidement possible, avec un seul objectif qui est le retrait définitif et en bloc de toute la tumeur. Le traitement passe donc principalement par la chirurgie basée sur une résection radicale et large en monobloc, considérée comme méthode fiable qui aboutit à un R0 et évite toute effraction tumorale. L'acte chirurgical doit se faire en préservant au maximum une fonctionnalité et une

anatomie conservatrice des organes et/ou des membres. L'association d'une radiothérapie néo-adjuvante ou post opératoire à la chirurgie est préconisée pour éviter toute réapparition de la tumeur.

### **8.1-Liposarcomes non métastatiques :**

Le traitement standard des liposarcomes localisés consiste en une EXÉRÈSE CHIRURGICALE LARGE R0 c'est-à-dire avec une marge de tissu sain sur toute sa surface.

L'exérèse large consiste à emporter 1 à 2 cm de tissu sain (muscle strié) et/ou une barrière anatomique (aponévrose, adventice, périoste, épinèvre).

Il n'y a pas d'indication à un curage ganglionnaire régional de principe.

Types d'exérèses : (Enneking&Campanacci1983)

- Exérèse Intralésionnelle (I) : lésion "énucléée", "épluchée à l'intérieur de la pseudo-capsule". Un sarcome n'est jamais une tumeur réellement encapsulée.
- Exérèse Marginale (M) : lésion enlevée en bloc mais seulement recouverte de sa pseudo-capsule, sans réelle marge de tissu sain péri lésionnel.
- Exérèse Large (L) : lésion enlevée en bloc et enveloppée de façon uniforme d'une couche de tissu sain (en cas de tumeur superficielle, sous-cutanée : l'exérèse comporte le fascia profond).
- Exérèse Radicale (R) : lésion enlevée en bloc au sein de son compartiment anatomique d'origine limité par ses enveloppes naturelles (en cas de tumeur superficielle, sous cutanée : l'exérèse emporte le fascia profond)

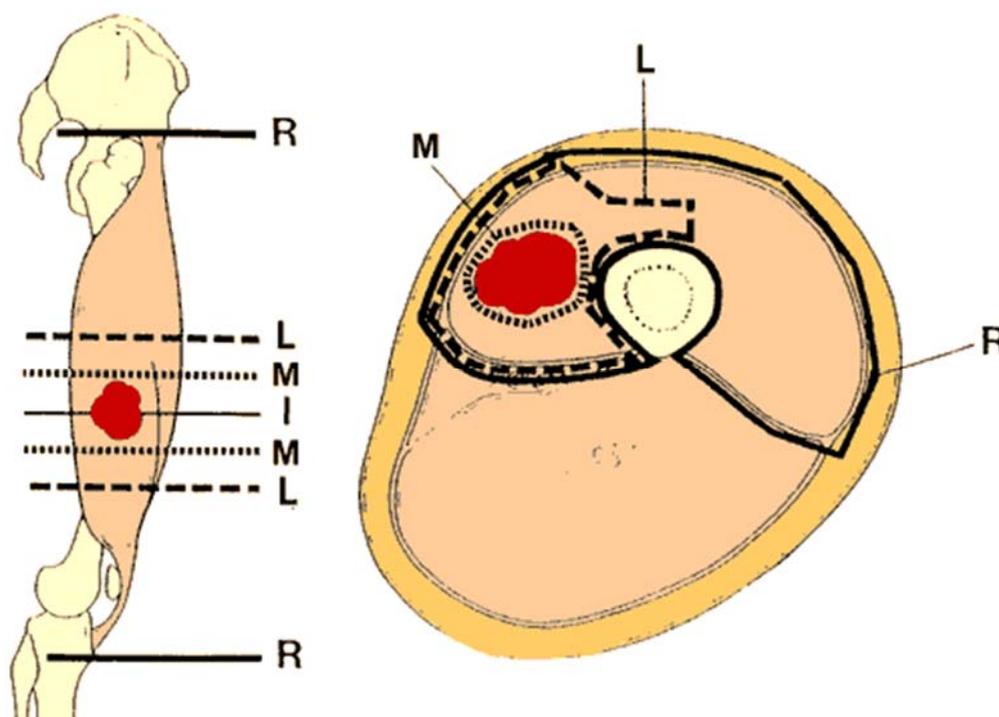


Figure 8 : types d'exérèse d'un liposarcome

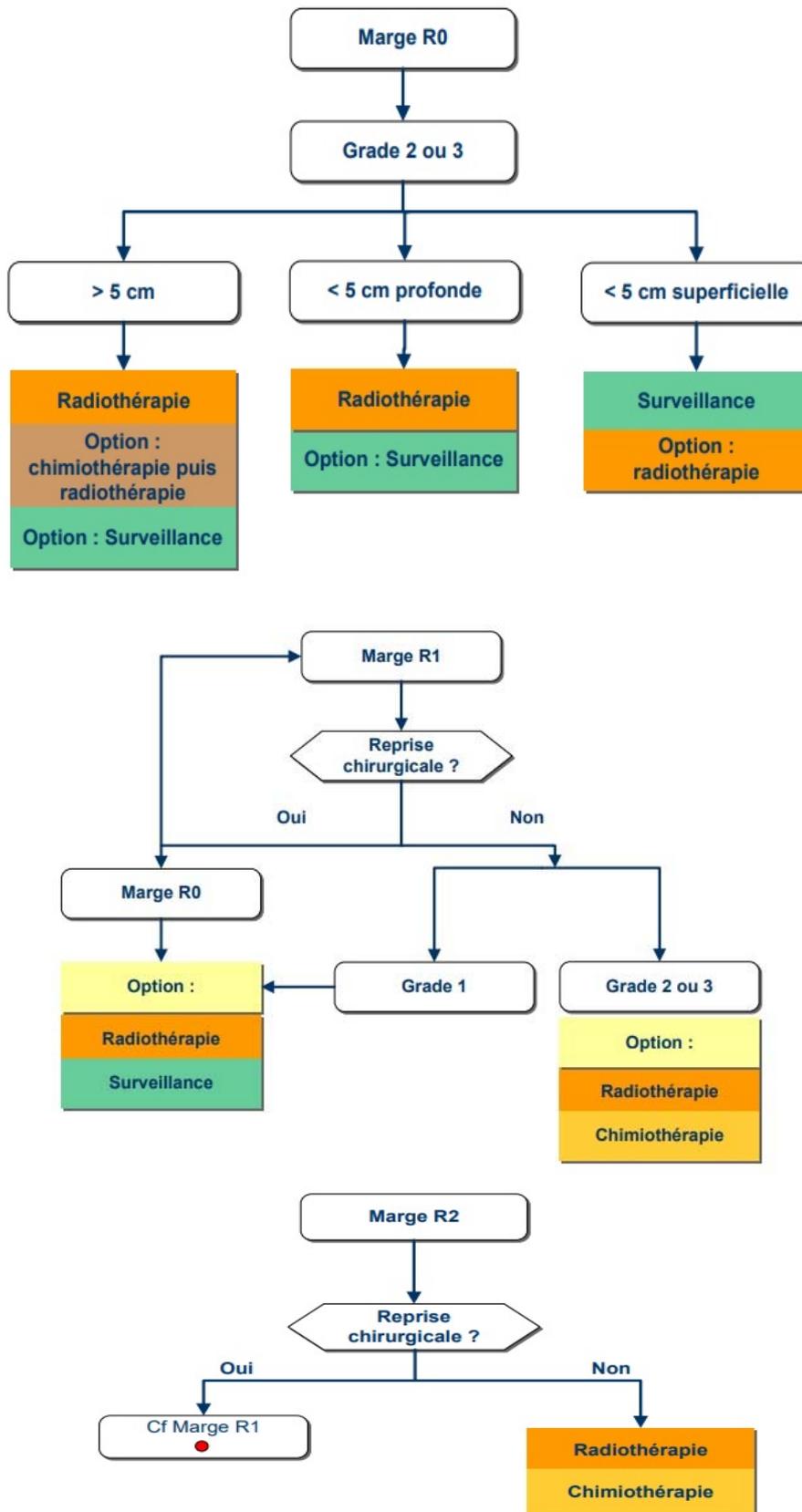
### 8.2-Liposarcomes métastatiques :

Métastases synchrones : Le traitement standard d'une maladie métastatique synchrone au diagnostic est une chimiothérapie. Dans certains cas, une exérèse chirurgicale peut néanmoins se discuter en RCP.

Métastases métachrones :

- En cas de métastases pulmonaires métachrones résécables en totalité, sans lésions extra pulmonaires associées, l'exérèse chirurgicale est le standard.
- En cas de métastases extrapulmonaires, la chimiothérapie est le standard. L'exérèse chirurgicale peut être, dans des cas bien sélectionnés, une option en cas de bonne réponse à la chimiothérapie.(Centre de cancérologie Alsace)

**Tableau 3 : Conduite à tenir devant un liposarcome selon les marges de résection chirurgicale :** (J.Kurtz 2017)



### **8.3– Radiothérapie :**

Toute indication de radiothérapie doit être discutée en RCP. En cas de refus ou contre-indication chirurgicale, une radiothérapie exclusive peut-être proposée.

Indications :

#### **❖ Radiothérapie post-opératoire :**

Une radiothérapie post-opératoire devra être systématiquement discutée en présence d'un ou de plusieurs critères tumoraux : Tumeur de grade 2 ou 3, taille supérieure ou égale à 5 cm, tumeur profonde ou en cas de reprise chirurgicale pour exérèse initiale non R0. La radiothérapie permet de diminuer significativement le risque de récurrence locale, mais n'a pas d'impact sur la survie globale.

En cas d'exérèse R2, la reprise chirurgicale doit toujours être privilégiée. Si elle n'est pas possible, la radiothérapie devra être réalisée avec un boost sur le résidu tumoral.

A l'heure actuelle, il n'y a pas d'indication de radio-chimiothérapie concomitante, hors essai. L'absence de radiothérapie post-opératoire peut se discuter dans les cas suivants : Tumeur superficielle ou profonde réséquée largement à la chirurgie initiale (pas de reprise), de grade faible et de taille tumorale inférieure à 5 cm de plus grand axe.( Haas et al 2012)

#### **❖ Radiothérapie pré-opératoire:**

Dans certains cas, la radiothérapie peut être réalisée en pré-opératoire (par exemple, tumeurs volumineuses avec risque de chirurgie R1 et mutilante) Idéalement, la radiothérapie doit être réalisée dans les huit semaines suivant la chirurgie. Toutefois, ce délai peut être rediscuté en fonction des suites et des résultats opératoires, de la localisation tumorale. La qualité de la cicatrisation notamment l'absence de désunion, l'absence de surinfection, de collection post-opératoire sont des éléments nécessaires à la tolérance immédiate et tardive du traitement. Après un

délai supérieur à trois mois de l'acte chirurgicale, il sera nécessaire de discuter en réunion pluridisciplinaire la réalisation d'une nouvelle imagerie (afin d'éliminer une récurrence locale précoce) mais également du maintien de l'indication de radiothérapie. Il faudra être vigilant à ce que l'irradiation du membre ne soit pas circonférentielle (risque de syndrome des loges). L'os doit au maximum être épargné (risque de fracture). Il est également impératif de s'assurer du bon déroulement de la radiothérapie qui doit être faite de façon hebdomadaire.

La dose est délivrée en fractionnement classique (5 fractions hebdomadaires de 1,8 à 2 Gy par jour, tous les faisceaux étant délivrés le même jour) :

- Exérèse R0 : 50 Gy dans l'ensemble du volume irradié
- Exérèse R1 : 50 Gy dans l'ensemble du volume irradié + boost sur lit tumoral de 4 à 10 Gy (dose totale 54-60 Gy) 37
- Exérèse R2 : 50 Gy dans l'ensemble du volume irradié + boost sur lit tumoral de 10 à 16 Gy (dose totale 60-66 Gy) Radiothérapie pré-opératoire : entre 45 et 54 Gy (adapter au cas par cas) Radiothérapie exclusive : entre 60 et 66 Gy (Haas et al 2012)

#### **8.4-Chimiothérapie :**

L'indication d'une chimiothérapie doit être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire « RCP » La chimiothérapie des STM de l'adulte doit comporter en première intention une anthracycline administrée à une dose optimale. Les polychimiothérapies majorent les taux de réponse objective, mais ne modifient pas la survie globale de ces patients. (Bonvalot .S 2013)

- Liposarcomes non métastatiques :

L'emploi d'une chimiothérapie adjuvante systématique reste controversée dans le traitement des STM de l'adulte. Elle ne représente pas un standard. Si la preuve est faite qu'une chimiothérapie adjuvante améliore la survie sans récurrence locale et la récurrence sans métastase, son incidence sur la survie globale n'est pas démontrée. Cette approche peut être proposée aux patients sélectionnés à haut risque (grade 2-3, > 5cm). Si chimiothérapie adjuvante : utilisation d'une association de la doxorubicine et de l'ifosfamide à doses optimales (4 à 6 cycles).

- Indications

Les liposarcomes localement avancés ne pouvant pas bénéficier d'emblée d'une chirurgie carcinologiquement satisfaisante. La chimiothérapie néoadjuvante peut induire une réduction du volume tumoral et permet ainsi la réalisation d'un geste locorégional secondaire (chirurgie ± radiothérapie) carcinologiquement satisfaisant, de plus elle agirait en traitant de façon précoce les métastases infracliniques. Malgré les points positifs de la chimiothérapie, il reste judicieux de discuter en RCP les cas de liposarcome de taille tumorale volumineuse et de haut grade.

Pour les tumeurs d'emblée opérables, il n'a pas été démontré que la chimiothérapie néoadjuvante améliore la survie globale ou la survie sans récurrence. Par ailleurs, il n'existe pas de protocole de chimiothérapie néoadjuvante standard dans les liposarcomes. Il est préférable de suivre des protocoles de polychimiothérapie (association doxorubicine + ifosfamide) qui aboutissent à une amélioration des taux de réponse (Bonvalot .S 2013)).

- Liposarcomes métastatiques :

Elle s'adresse aux patients métastatiques pour lesquels un programme à visée curative ne peut pas être proposé. Le traitement est basé sur des mono-chimiothérapies successives.

Si les associations des drogues donnent régulièrement des taux de réponses optimal qui ne se traduit pas forcément par un taux de survie globale. Cependant, la toxicité des drogues est toujours plus forte et plus importante. La doxorubicine est utilisée en premier ligne à la dose de 75 mg/m<sup>2</sup> toutes les 3 semaines, suivi par l'ifosfamide en deuxième ligne à la dose de 5 à 9 g/m<sup>2</sup> toutes les 3 semaines. Il y a toujours la possibilité d'un traitement secondaire, complémentaire chirurgical et/ou radiothérapeutique permettant un gain en survie globale, sans oublier une optimisation de la réponse tumorale avec l'utilisation d'une polychimiothérapie. (Bonvalot .S 2013)

#### **8.5–Les thérapies ciblées :**

Des thérapies ciblées sont en cours d'essai, à titre d'exemple, les nutlines qui bloquent l'activité de la protéine *MDM2*, le flavopéridol qui est un inhibiteur de CDK4, l'aplidine est un agent marin qui induit l'apoptose tout en activant la voie de signalisation JUN–kinase.

#### **9–Surveillance :**

Elle vise à diagnostiquer une récurrence de manière suffisamment précoce pour permettre un traitement utile. Les récurrences à distance sont essentiellement pulmonaires. En cas de tumeur de haut grade, les rechutes surviennent à 75–80% dans les 3 premières années suivant le diagnostic. En cas de tumeur de bas grade les récurrences essentiellement locales peuvent survenir de très nombreuses années après (J.KURTZ 2017)

La surveillance vise aussi à mettre en évidence les problèmes de réadaptation et les effets secondaires des traitements et à les prendre en charge.

- Standards: examen clinique, scanner thoracique.
- Recommandation interrégionale : examen clinique + IRM locale, TDM thoraco-abdominal avec injection pour les sarcomes avec contingent myxoïde ,bilan biologique chaque année après chimiothérapie, , pour les patients traités par anthracyclines : examen cardiaque avec échographie tous les 2-3 ans.
- Rythme :

**Tableau 4 : Rythme de surveillance d'un liposarcome**

Surveillance	1 <sup>ere</sup> et 2 <sup>eme</sup> année	3 <sup>eme</sup> à 5 <sup>eme</sup> année	5 <sup>ème</sup> à 10 <sup>ème</sup> année
Examen clinique	Grade 1 : 6 mois Grade 2 ou 3 : 4 mois	6 mois	12 mois
TDM thoracique	Grade 1 : 6 mois Grade 2 ou 3 : 4 mois	6 mois	12 mois
IRM membre	Grade 1 : 6 mois Grade 2 ou 3 : 4 mois	6 mois	12 mois

## 10-Pronostic :

Sur le plan évolutif, les liposarcomes présentent deux caractères communs qui sont :

- une tendance à la récurrence locale, quelque soit le type histologique.
- la fréquence de survenue de métastases à distance ; surtout pulmonaire.
- **Les facteurs de risque de rechute locale :**
  - ❖ La qualité de l'exérèse chirurgicale : Elle est le facteur pronostique essentiel du control local, et il est indispensable d'apprécier les limites d'exérèses macroscopiquement et microscopiquement.

- ❖ L'atteinte de la marge, qu'elle soit macroscopique ou microscopique, constitue dans tous les cas un facteur défavorable. Le taux de récurrence locale dépend directement du type de la chirurgie appliquée avec des taux de récurrence locale de l'ordre de 50 à 93% en cas d'énucléation simple de la tumeur, de 30 à 50% en cas d'exérèse large et autour de 20% en cas d'exérèse radicale ou compartimentale.
- ❖ Le grade de malignité : Apparaît comme deuxième facteur pronostique de rechute locale dans plusieurs études, la probabilité de récurrence est plus élevée chez les patients atteints de tumeurs de grade 3. (Nijhus PH 2000) ; alors que dans une autre étude (KILPATRICK E 1996), c'est la composante nécrose qui est considérée élément principal de haut grading des tumeurs et qui est retenue comme facteur pronostique.
- ❖ Le siège de la tumeur est considéré comme un facteur augmentant le risque de récurrence locale ainsi que la réalisation ou non d'une radiothérapie avec des facteurs propres aux malades tels que le sexe et les symptômes.
- **Les Facteurs prédictifs de survie globale et de la survenue de métastases :**

Le taux de survie pour l'ensemble des liposarcomes est de l'ordre de 74% à 80%.

Plusieurs facteurs semblent influencer cette survie :

- ❖ Taille de la tumeur : La taille tumorale a une valeur prédictive sur l'évolution générale. Ce critère est un facteur pronostique quel que soit le niveau de taille retenu pour la coupure statistique : 5 cm (taille retenue dans les classifications). Il s'agit en fait d'une variable continue avec un risque relatif de métastases ou de décès qui augmente avec la taille, de 1,5 % par tranche de 5 cm ( Trovik et al. 88)
- ❖ Profondeur : La profondeur, définie comme la position de la tumeur par rapport à l'aponévrose superficielle est aussi fortement corrélée à l'évolution générale.

La survie à 5ans sans métastases est de 80% pour les tumeurs superficielles contre 56% pour les tumeurs profondes (Coindre JM 1990)

- ❖ Grade histologique : Le grade histologique est un facteur pronostique important pour la survie globale sans métastase, combiné avec la taille de la tumeur, il permet d'établir le stade de la maladie dans la classification TNM. Selon Coindre *et al* en cas de liposarcome, la survie à 5 ans est de 93,8% pour les tumeurs de grade 1, 71,6% pour les tumeurs de grade 2 et 58,7% pour les tumeurs de grade 3. La combinaison du grade histologique et de la profondeur tumorale a permis de définir des groupes de malades de pronostic différents. Les tumeurs superficielles de grade 2 ont le même bon pronostic que l'ensemble des tumeurs de grade 1, alors que les tumeurs profondes de grade 2 et les tumeurs grade 3 sont de mauvais pronostic. (Coindre JM 2001)

**Autres facteurs prédictifs:**

- ❖ La nécrose tumorale
- ❖ L'existence d'un envahissement vasculaire, nerveux, osseux ou de plusieurs groupes musculaires
- ❖ La récurrence locale : le risque métastatique est majoré en cas de récurrence locale bien que cela ne soit pas clairement démontré après association chirurgie et irradiation à dose optimale

## **11 – Evolution :**

Elle est marquée essentiellement par la tendance à la récurrence locale survenant dans 50 à 93% des cas à 5 ans. Le délai de récurrence varie de 6 mois à plusieurs années. (Pearlston DB 1999). Les récurrences sont principalement en rapport avec une exérèse insuffisante en condition non carcinologique. L'évolution des liposarcomes est aussi variée que l'aspect anatomopathologique, et chaque groupe histologique correspond le plus souvent à un mode évolutif différent. Ainsi, les formes bien différenciées ont habituellement une invasion locale et peuvent récidiver localement, mais dans certains cas leur récurrence ne survient que plusieurs années plus tard. A l'opposé, les formes peu ou non différenciées peuvent être des lésions très agressives, ayant des évolutions explosives, elles peuvent non seulement récidiver localement mais également à distance sous forme de métastases. Les métastases surviennent, en général, rapidement dans les formes dédifférenciées avec un taux de l'ordre de 78%. (N. Bui 2006) Dans les formes différenciées, elles sont rares ou d'apparition plus tardive. En règle générale, il s'agit de métastases hématogènes, les métastases par voie lymphatiques sont exceptionnelles. Les sites électifs des métastases sont les poumons et le squelette.

# MATERIEL ET METHODES

## **I-MATERIEL :**

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 de liposarcomes diagnostiqués au service d'anatomopathologie entre 2010 et 2018 pour un total de 47 patients. Nous remercions les différents services du CHU qui nous ont fait confiance pour le diagnostic moléculaire

## **II-METHODES :**

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

Pour réaliser cette étude, nous avons collecté les données suivantes :

- L'identité du malade
- L'âge et le sexe
- La localisation de la tumeur.
- Les résultats anatomopathologiques.
- Les résultats de la biologie moléculaire.

### **2- Étude macroscopique**

La pièce d'exérèse arrivée au service d'anatomopathologie nécessite un L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire : la pièce est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée.

Chaque lésion est repérée sur un schéma et éventuellement photographiée. Ces constatations sont confrontées aux documents cliniques et/ou radiologiques, ce qui souligne l'importance des renseignements écrits fournis par le médecin clinicien. Il est utile de marquer les berges d'une pièce de résection de tumeur avec une encre indélébile, ceci ne nuit pas à l'étude histologique et permet d'apprécier exactement la distance entre la tumeur et la limite chirurgicale de la pièce

L'examen macroscopique donne des indications pour le pronostic de la maladie, et il permet de sélectionner les territoires à prélever pour l'étude microscopique : zones lésées, zones d'aspect macroscopique sain et limites d'exérèse. Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires.

### 3- Histologie :

L'étude histologique se base sur la réalisation des coupes en passant par différentes étapes successives 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.

En ce qui concerne les pièces opératoires, une étape d'analyse macroscopique est indispensable, idéalement avant la fixation de la pièce.

#### **Fixation** :

La fixation est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement. Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible (dessiccation et/ou autolyse du tissu).

Le volume du fixateur doit représenter environ 10 fois le volume de la pièce, après cette dernière doit être mise dans un récipient de taille suffisamment grande pour prévenir les déformations des pièces opératoires volumineuses .

La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie et 48 heures pour une pièce opératoire.

Le fixateur le plus habituellement utilisé est le formol à 10 % tamponné. Pour les biopsies de petites tailles, des fixateurs à base d'alcool peuvent être utilisés , dans ce cas-là la fixation est encore plus rapide, mais a un effet délétère sur certains antigènes, ce qui peut nuire à des techniques particulières d'immunohistochimie.



Figure 9 : fixation d'une pièce opératoire de liposarcome.

### **Imprégnation et inclusion :**

Cette étape a pour objectif de remplacer l'eau contenu dans les tissus par de la paraffine. La « paraffine », au sens histologique du terme, est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelquefois de cires. Son intérêt est d'être chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants et facile à couper.

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 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



Figure 10 : Inclusion du tissu dans un moule de paraffine

### Coupes et colorations :

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames.

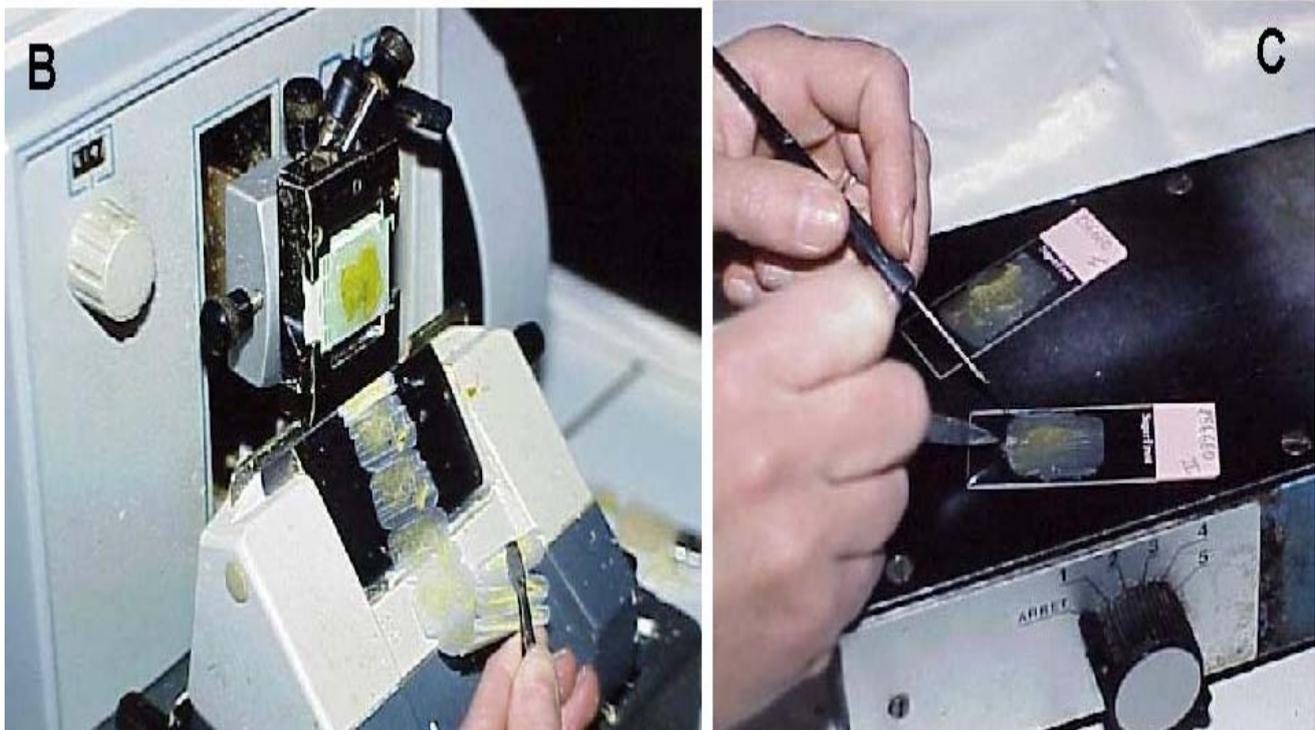


Figure 11 : coupe au microtome et étalement

Après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, le tissu est coloré. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hémateïne, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine, ou phloxine). On y ajoute souvent du safran qui se fixe sur le collagène.



Figure 12 : coloration des coupes

La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée, ou par un film plastique transparent. Elle est alors prête à être analysée au microscope par un médecin anatomopathologiste.

#### 4-IMMUNOHISTOCHEMIE :

La réalisation de la technique d'immunohistochimie est nécessaire pour mettre en évidence les différents antigènes grâce à des anticorps spécifiques. EN effet, il faut tout d'abord passer 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 qui suivent le déparaffinage et qui se succèdent de la façon suivante :

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, rinçage à l'eau courante durant 10 min, puis démasquage antigénique après un 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 application 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.

**Tableau 5 : Anticorps utilisés dans l'immunohistochimie pour le diagnostic des liposarcomes.**

Anticorps	clone	Pré traitement	Dilution
MDM2	BSB-64	Tampon Citrate Ph 6	Prêt à l'emploi
CDK4		Tampon Citrate Ph 6	Prêt à l'emploi

## 5-Biologie moléculaire

### 5.1-Extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN sur tissu fixé et inclus en paraffine est la première étape pour l'analyse à la recherche de anomalies moléculaires .Elle consiste en l'isolement de l'ADN a partie d'un bloc tumoral dont la qualité et la quantité sont suffisantes et satisfaisantes pour permettre son analyse .La zone tumorale est ainsi déterminée par un pathologiste dont le but d'augmenter le nombre de cellules tumorales et d'éviter par conséquent les faux positifs .L'extraction d'ADN est réalisée par le kit ( QIAamp<sup>®</sup> DNA FFPE Tissue) selon les étapes suivantes :

- Déparaffinage

Avant de démarrer l'extraction il faut traiter tout le matériel et la paille avec du *DNase away* pour éviter toute dégradation des ADN et une éventuelle contamination

Dans un tube eppendorf 1.5 ml plusieurs coupes de 5 µm sont ajoutées et 1 ml de toluène est ajouté pour retirer la paraffine. Après centrifugation et rejet du surnageant 1ml d'éthanol est ajouté afin d'éliminer les résidus de toluènes sur l'échantillon. Une nouvelle centrifugation permet d'éliminer le surnageant et l'incubation des échantillons pendant 10 min à 37°C permet l'évaporation des résidus d'éthanol.

- Lyse des tissus

Le culot ainsi obtenu est suspendu dans 180 µl de tampon de lyse et 20µl de protéinase K est ajouté puis une incubation toute la nuit sous agitation à une température de 56 °C est nécessaire. Le temps d'incubation peut être prolongé si le tissu n'est pas parfaitement digéré

- Isolement de l'ADN

2µl d'ARNase A est ajouté et est incubé durant 2 min à température ambiante pour obtenir un ADN génomique sans ARN. L'isolement de l'ADN des débris cellulaires et protéiques se fait par un mélange tampon AL/Ethanol préparé au préalable. L'ensemble du lysat est transféré soigneusement dans une colonne QIAamp MinElute.

- Lavage de l'ADN des contaminants résiduels

500 µl du tampon de lavage AW1 est ajouté à la colonne suivi d'une centrifugation pendant 1 min. Un nouveau lavage avec 500µl du tampon AW2 est effectué, suivi encore une fois d'une centrifugation de 1 min. Ensuite une centrifugation maximale de 3 min est requise pour sécher la membrane de la colonne de toute trace d'éthanol.

- Elution de l'ADN :

50µl du tampon d'éluion ATE est ajouté par-dessus de la membrane de la colonne QIAamps MinElute. Le tout est incubé pendant 30 min à 70°C puis pendant 5 min à température ambiante. La centrifugation a vitesse maximale pendant 1 min permet de récupérer la solution contenant l'ADN dans un tube eppendorf de 1.5 ml

#### **Quantification de l'ADN :**

Apes extraction de l'ADN à partir du tissu tumorale, un test qualifié d'ADN est réalisé. La concentration de l'ADN extrait est mesurée par spectrophotométrie. Afin de passer à la phase d'amplification d'un gène recherché par PCR, il est nécessaire que les ADN extraits aient la même concentration, il est donc nécessaire de connaitre la concentration initiale pour faire la dilution désirée.

Le dosage se fait au spectrophotomètre par mesure de la DO a 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction à savoir la présence de protéines résiduels dans la solution d'ADN. Pour une solution d'ADN purifié le rapport R doit être compris entre 1.8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1.8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Si le rapport est supérieur a 2 cette valeur indique une probable contamination par des ARN.

### **5.2-La technique d'hybridation in situ fluorescente : FISH**

C'est une technique de cytogénétique moléculaire qui consiste en une hybridation avec complémentarité d'une séquence nucléotidique avec une sonde marquée (fragment d'ADN marqué par un fluorochrome). Pour cela, il faut avoir en sa possession un matériel adéquat et il faut également préparer des solutions dont la salinité et le Ph soient extrêmement précis pour faciliter l'hybridation de la sonde avec sa séquence d'ADN cible. (Centre de biologie moléculaire CHU Hassan II de Fès 2019)

#### **a/ Matériel requis**

Avant toute manipulation, vérifier la disponibilité et le bon fonctionnement des instruments suivants :

- Agitateur magnétique
- Bain-Marie
- Balance à précision
- Microcentrifugeuse
- Chronomètre
- Microscope à Epi-fluorescence
- P 0.5–10 $\mu$ l
- P 10–100 $\mu$ l
- P 100–1000 $\mu$ l
- pH mètre
- Thermomètre calibré
- Agitateur Vortex
- Platine d'hybridation

#### **b/ Préparation des solutions**

##### **b.1 / 20X SSC (Sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH 5.3)**

Diluer 66g de 20X SSC dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O déminéralisée sur agitateur magnétique. Mesurer le pH et ajuster celui-ci à pH 5.3 (avec HCl concentré), compléter à 250ml avec H<sub>2</sub>O, puis filtrer la solution et stocker à température ambiante jusqu'à 6 mois. Si la solution présente un aspect trouble ou contaminé, il faut reprendre la préparation et travailler avec une solution fraîche.

**b.2/ Tampon de lavage post hybridation (20X SSC/ 0.3% NP 40) :**

Diluer 3 ml de NP40 (Nonyl Phenoxy polyethoxyl ethanol) dans 100 ml de 20X SSC et laisser sur agitateur magnétique jusqu'à la dissolution totale. Ajouter 850 ml d'H<sub>2</sub>O déminéralisé, et ajuster le pH à 7–7.5 avec du NaOH (1N). Cette solution stock peut être gardée jusqu'à 6 mois à température ambiante (à ne pas utiliser si elle présente un aspect trouble ou contaminé).

**b.3/ Dilution d'Ethanol :**

Pour 1 litre de solution :

Ethanol 70% : 700 ml Ethanol à compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O.

Ethanol 85% : 850 ml Ethanol à compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O.

**c/ Technique :****c.1/ Réactifs nécessaires**

Pour la préparation de la pepsine diluée : on mélange 1 tube de 250 mg de pepsine Vysis dans un flacon de tampon pepsine Vysis puis on laisse incuber 15 min à 37°C. La solution stock obtenue est aliquotée en petites quantités puis congelée à –20°C.

DAPI (4',6'-diamidino-é-phenylindole): Flacon contenu dans le kit PathVysion

**c.2/ Préparation des lames**

La veille de la technique, on place les lames avec tissus à hybrider dans un incubateur à 56°C. Le lendemain matin, on met à chauffer le bain-marie jusqu'à l'obtention d'une température de 80°, puis on met la solution de prétraitement 1X SSC dans le bain marie chauffé

### 1-Déparaffinage

Immerger les lames dans du toluène pendant 10 min puis les immerger dans des bains d'éthanol pendant 5 min enfin les sécher sur le THERMOBRITE réglé à 45°C ou à température ambiante pendant 3 à 5 min

### 2-Prétraitement

Immerger d'abord les lames pendant 35 min dans la solution de 1X SSC portée à 80°C, puis à mettre dans l'H<sub>2</sub>O pendant 3 min

### 3-Traitement à la pepsine

Pour une bonne digestion enzymatique, il faut recouvrir la section tissulaire avec de la pepsine diluée et on place les lames sur le Thermobrite à 37 °C pendant 24mn. Ensuite on immerge les lames dans de l'H<sub>2</sub>O pendant 3 min, puis on les met à déshydrater dans de l'éthanol à ordre croissant 70 ,85,100% 2 min chacun .Laisser sécher les lames avant de procéder à l'étape d'hybridation

### 4-Hybridation des échantillons

Une fois que les lames sont séchées, on dépose entre 7- 10µl de sonde sur une lamelle, puis on couvre toute la section tissulaire et on scelle la lamelle 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.

**Tableau 6 : Programme Thermobrite de dénaturation/hybridation des sondes**

	Température	Temps
Dénaturation	73°C	5 min
Hybridation	37°C	20 min

### 5-Lavages post hybridation

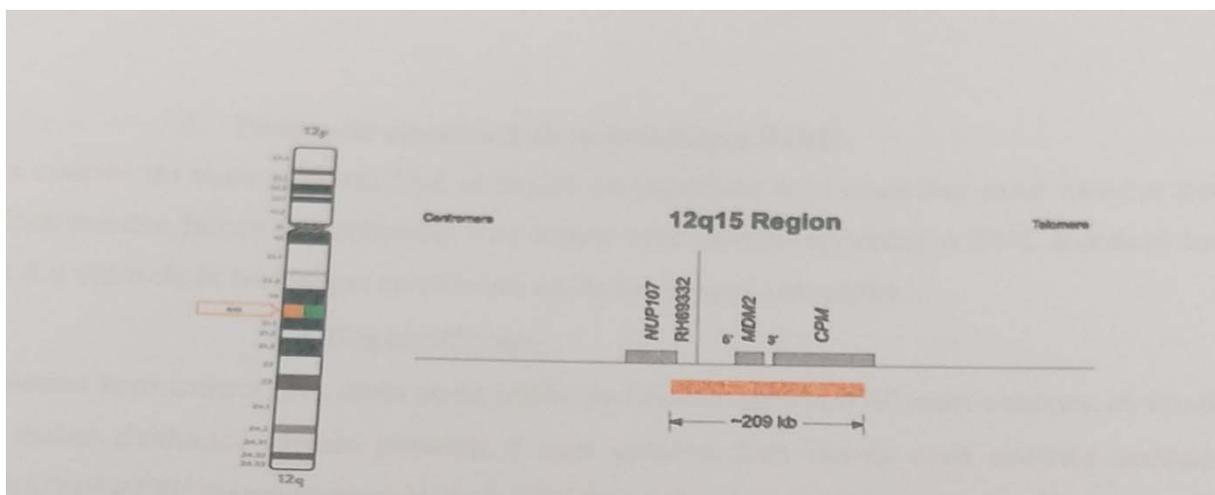
A partir de cette étape, veiller à travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes.

À la fin de l'hybridation, sortir les lames du Thermobrite, retirer le Rubber-cement 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.

### 6-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.

### 5.3- Amplification du gène *MDM2* par FISH :



**Figure 13:** Carte génétique et localisation des sondes LSI MDM2/CEP 12 sur le chromosome 12.

L'amplification du gène *MDM2* est détectée au niveau du LSI du chromosome 12. L'analyse se fait en fonction des noyaux de la zone tumorale déterminée sur la coupe histologique.

Le nombre de noyaux analysés a été fixé selon la littérature et selon les recommandations internationales à 100 noyaux, on compte aussi bien les signaux du gène *MDM2* que les signaux du témoin CEP12 (Terrier –Lacombe MJ et al.2009).

L'interprétation et le calcul du gène *MDM2* se fait selon le rapport *MDM2*/CEP12 :

- *MDM2*/CEP12 supérieur ou égal à 2 signifie qu'il y a une amplification du gène *MDM2*.
- *MDM2*/CEP12 inférieur à 2 signifie qu'il n'y a pas d'amplification du gène *MDM2*.

#### 5.4-PCR en temps réel (QPCR):

Le système de PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent (reporter) pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction de PCR (E.Poitras 2002). Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR.

A l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus, la PCR en temps réel est une technique qui nous permet de suivre la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle. L'augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template)

La détection quantitative des amplicons peut se faire à l'aide de la technologie SYBR green, composé organique fluorescent qui se lie sur l'ADN double brin. Pendant la dénaturation, le SYBR Green libre exhibe peu de fluorescence. À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant

en une émission de fluorescence lors de l'excitation. Au fur et à mesure que les molécules se lient au brin naissant, l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel.

Une autre technologie Taqman- FRET peut être utilisée pour la détection quantitative des amplicons. La sonde se fixe sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon) et émet une fluorescence par hydrolyse. En effet, le fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'(J.Liu 2002)

Un seuil de fluorescence est établi par le programme de l'appareil RT PCR. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient ce qu'on appelle cycle seuil « *Ct*, *Cycle Threshold* ». C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est également important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons à dilutions croissantes afin d'obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (E.Poitras 2002). Le profil d'une réaction PCR quantitative classique peut se décomposer en 3 phases :une première dite de bruit de fond où la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée), une seconde correspondant à la phase exponentielle de croissance où la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil (*Ct*), puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite et une dernière étape de phase de plateau où certains composants de la réaction deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle (Jaai KIM 2013)

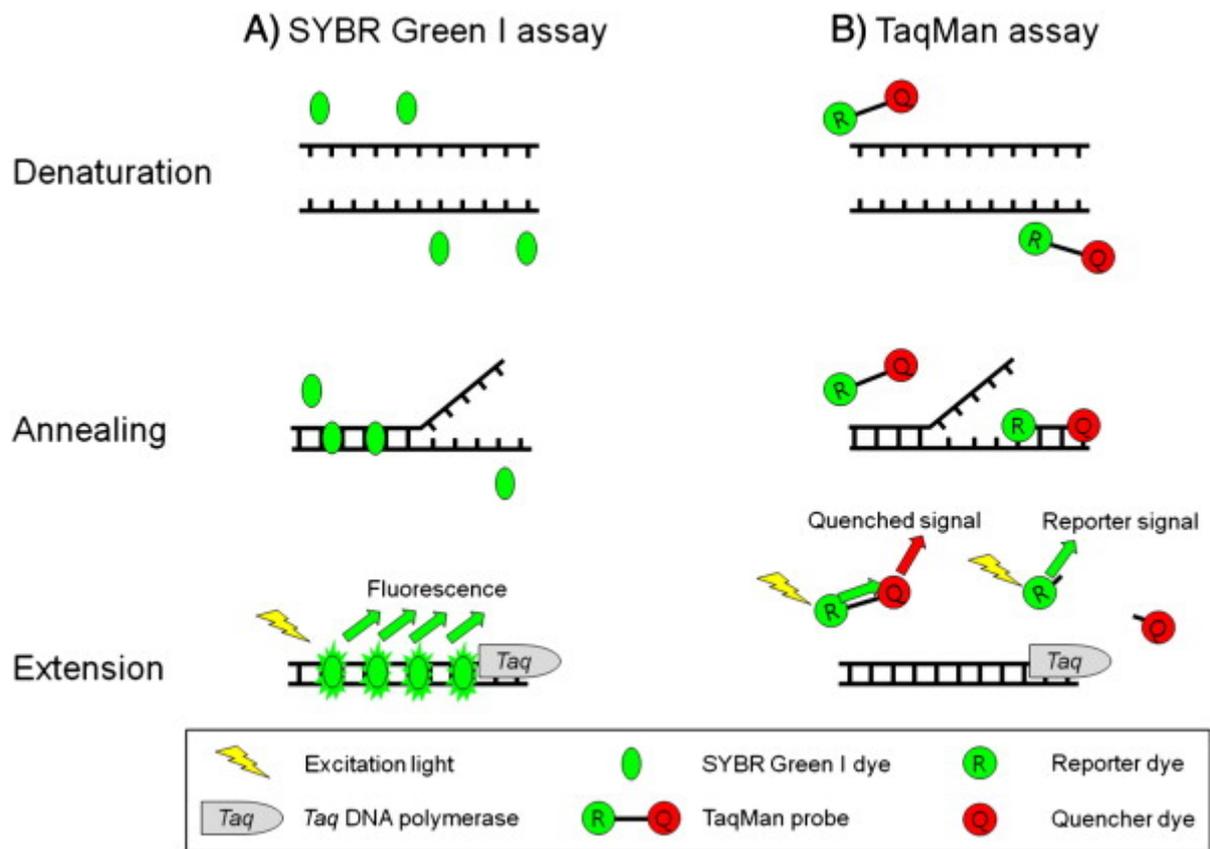


Figure 14 : Technique SYBR green et TaqMan

Pour la recherche de l'amplification du gène *MDM2*, nous avons utilisé un couple d'amorces et une sonde taqman (voir l'explication ci-dessus) qui va s'hybrider à la séquence cible du gène. La composition nucléotidique des amorces et de la sonde sont résumées dans le tableau suivant:

Tableau 7 : Amorces et sonde Taqman utilisées pour la mise en évidence de l'amplification du gène *MDM2*

Amorce/sonde	Séquence nucléotidique
MDM2-F (amorce)	5'-TTGGTTTCTAGACCATCTACCTCATCT-3'
MDM2-R (amorce)	5'-AAAAGCTGTGTGAATGCGTCAAAT-3'
MDM2 (sonde)	5'-ACCTGTCTCACTAATTGC-3'

Le milieu réactionnel est préparé à partir d'un Master Mix PCR prêt à l'emploi. Celui-ci est contribué d'une solution concentrée 2X contenant à la fois la Taq polymérase, les dTNP et tous les composants nécessaires pour la PCR, à l'exception des amorces, de la sonde et de l'ADN.

Après la réalisation des mix PCR et sa répartition dans les puits de la plaque, cette dernière est scellée de manière hermétique tout en faisant attention pour ne pas créer des bulles d'air. La plaque est installée dans le Thermocycleur et le run est démarré selon le programme suivant:

**Tableau 8:** Programme PCR pour la détection et l'amplification du gène *MDM2*

	Température	Temps
Stage I	50°C	2min
Stage II	95°C	15 min
	95°C	15 sec
Stage III	60°C	1 min

Le profil type de l'amplification par QPCR est généralement composé de 3 parties :

- Une première partie dans laquelle le nombre d'amplicons formés ne permet pas d'obtenir une fluorescence détectable par l'appareil.
- une deuxième partie où la fluorescence augmente de manière exponentielle .
- une 3ème partie de plateau correspondant à une saturation de la réaction d'amplification .

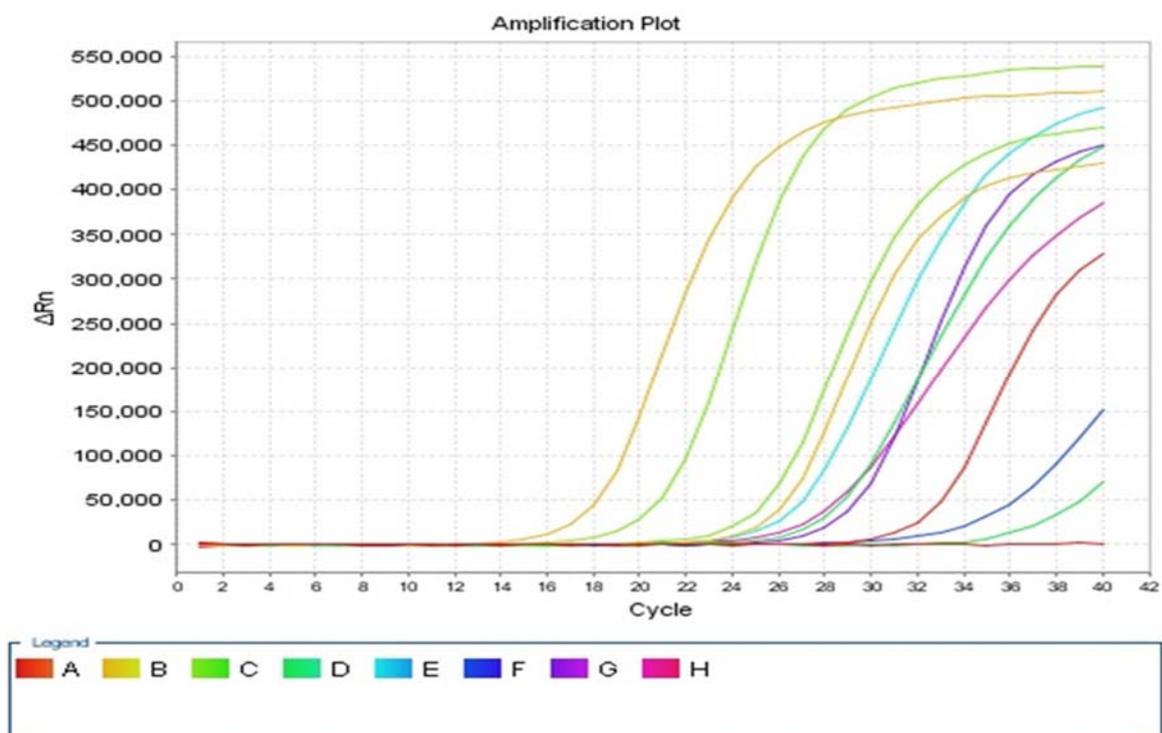


Figure15 : Exemple de courbes obtenues en Q PCR

# RESULTATS

- Caractéristiques générales de la population :

5 patients sur 47 (soit 11% des cas) ne présentent pas au moins un des critères de sélection donc ils sont systématiquement exclus de l'étude.

**1 – Répartition selon l'âge :**

Sur les 47 cas étudiés, l'âge des patients au moment du diagnostic variait entre 10 et 85 ans avec une moyenne d'âge de 52 ans et un écart type de 17,5. On note un pic d'incidence pour la tranche d'âge entre 51 et 60 ans. L'âge n'a pas été précisé chez 5 patients

**Tableau 9 : répartition selon la tranche d'âge.**

Tranches d'âge	Nombre de cas
1-10 ans	1
11-20 ans	0
21-30 ans	3
31-40 ans	8
41-50 ans	7
51-60 ans	11
61-70 ans	5
71-80 ans	5
81-90 ans	2

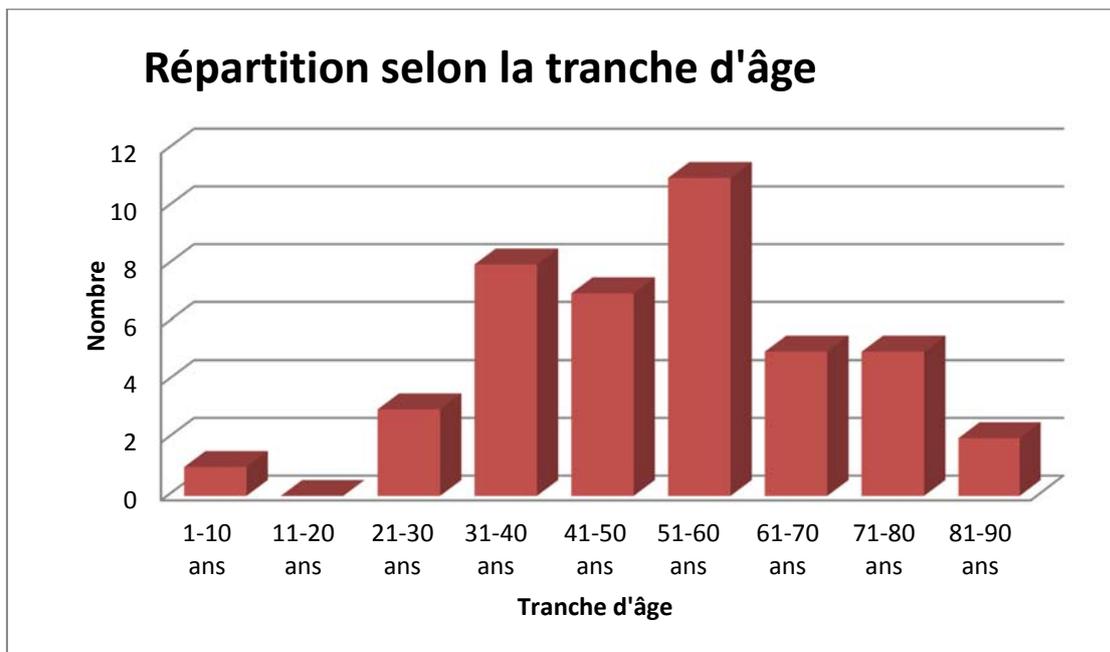


Figure 16 : répartition selon la tranche d'âge

## 2-Répartition selon le sexe :

L'étude de la répartition selon le sexe montre une prédominance féminine avec 24 femmes, soit 51% de la population étudiée et 18 hommes, soit 38 % de la population étudiée. Le sexe n'a pas été précisé chez 5 patients soit 11% des cas.

Le sex- ratio M/F est de 0.75

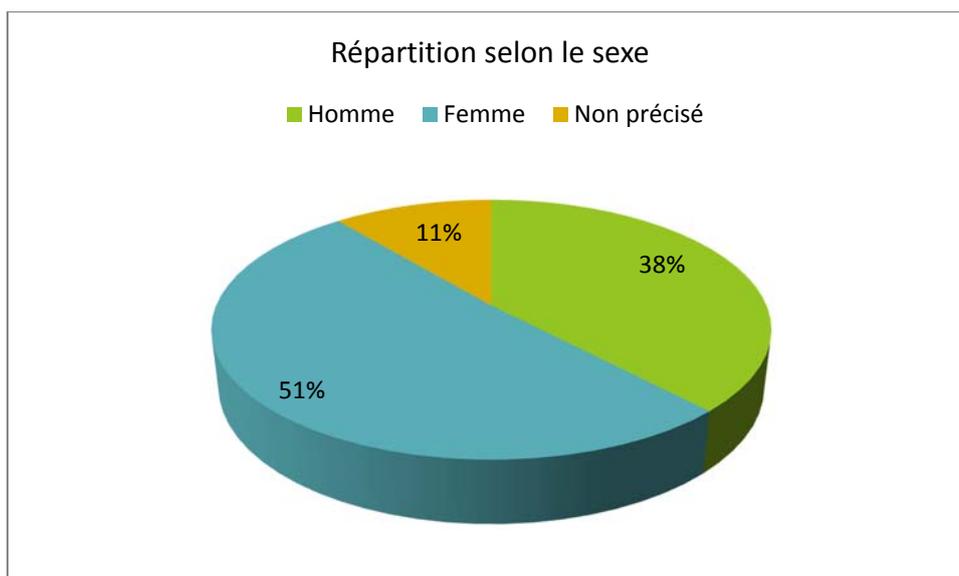


Figure 17 : répartition selon le sexe

### 3-Répartition selon la localisation :

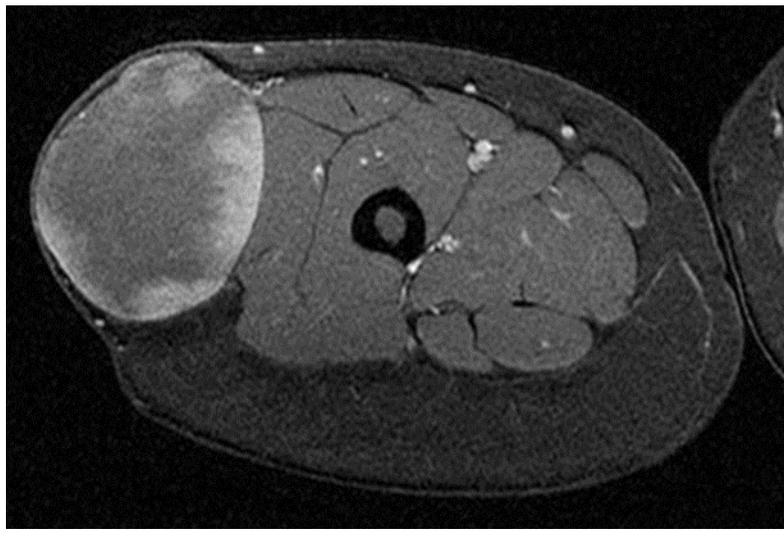


Figure 18 : séquence IRM transversale d'un liposarcome

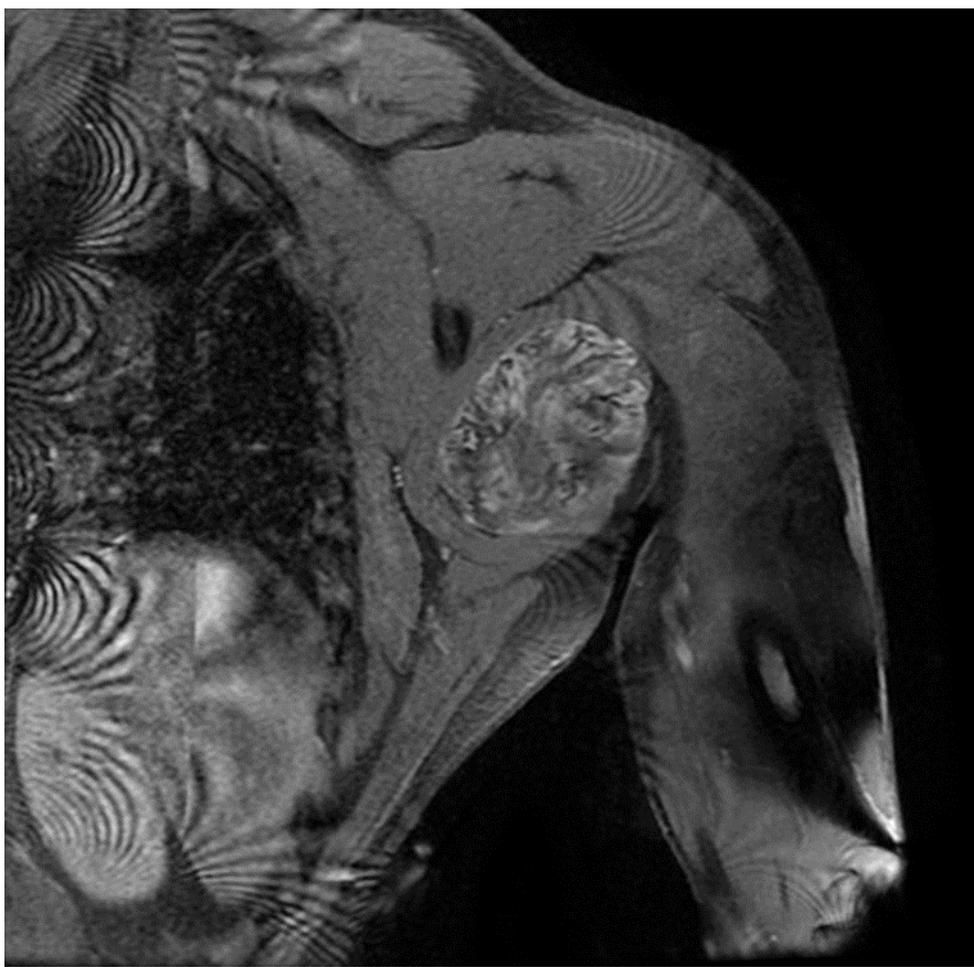


Figure 19 : séquence IRM longitudinale d'un liposarcome du membre supérieur

La localisation la plus fréquente des liposarcomes, dans notre étude, est au niveau du membre inférieur avec 15 patients soit 32 % de la population étudiée, suivi du membre supérieure dont la localisation a été trouvée chez 10 patients soit 21% des cas. La localisation au niveau de l’abdomen est trouvée chez 7 patients soit 15% des cas, alors qu’elle est n’est que de 9% (soit 4 patients) au niveau de la tête et du cou. Le liposarcome localisé au niveau du thorax et du péritoine est faible il ne représente que 6% chacun (soit 3 patients). Toutefois, la localisation n’as pas été précisée chez 5 patients soit 11% des cas.

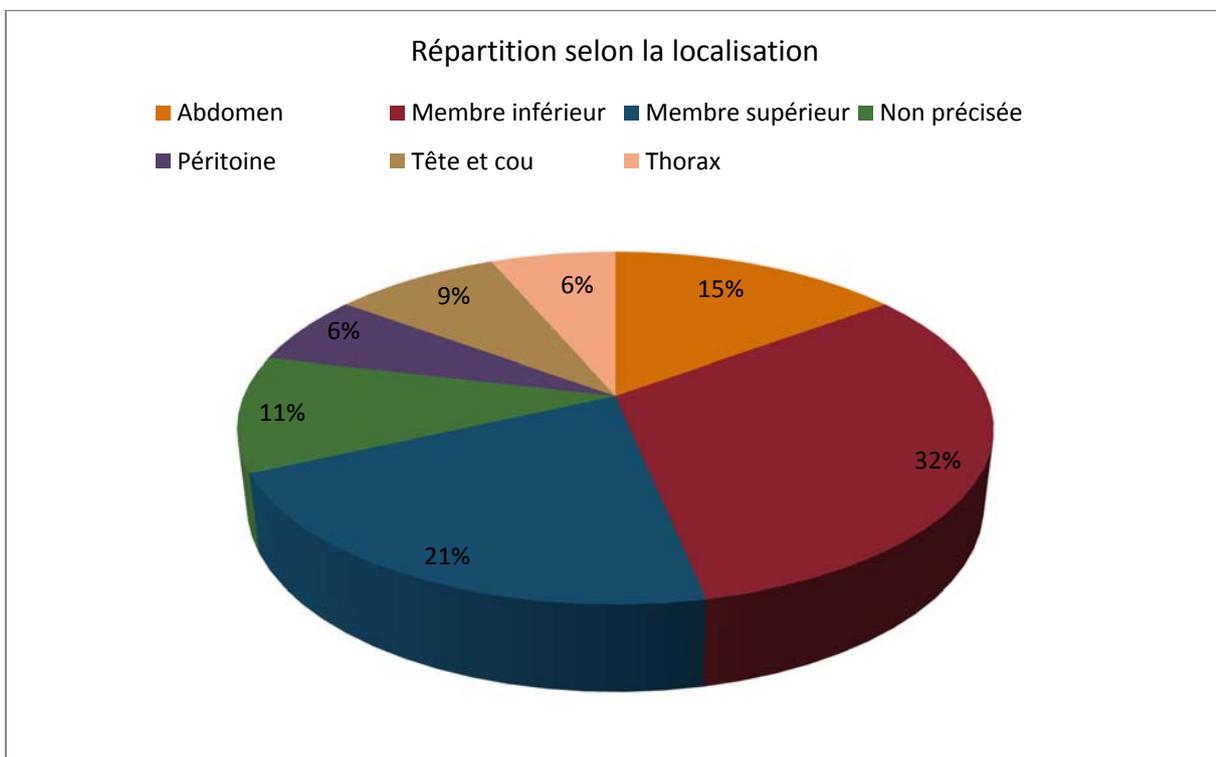


Figure 20: Répartition selon la localisation

## 4-Répartition selon le grade FNCLCC :

L'étude du grade FNCLCC a permis de classer les cas étudiés en 3 grades selon le tableau suivant :

Tableau 10: répartition selon le grade FNCLCC

GRADE	Nombre de cas	Pourcentage
GRADE 1	18	38%
GRADE 2	16	34%
GRADE 3	8	17%
Non précisé	5	11%

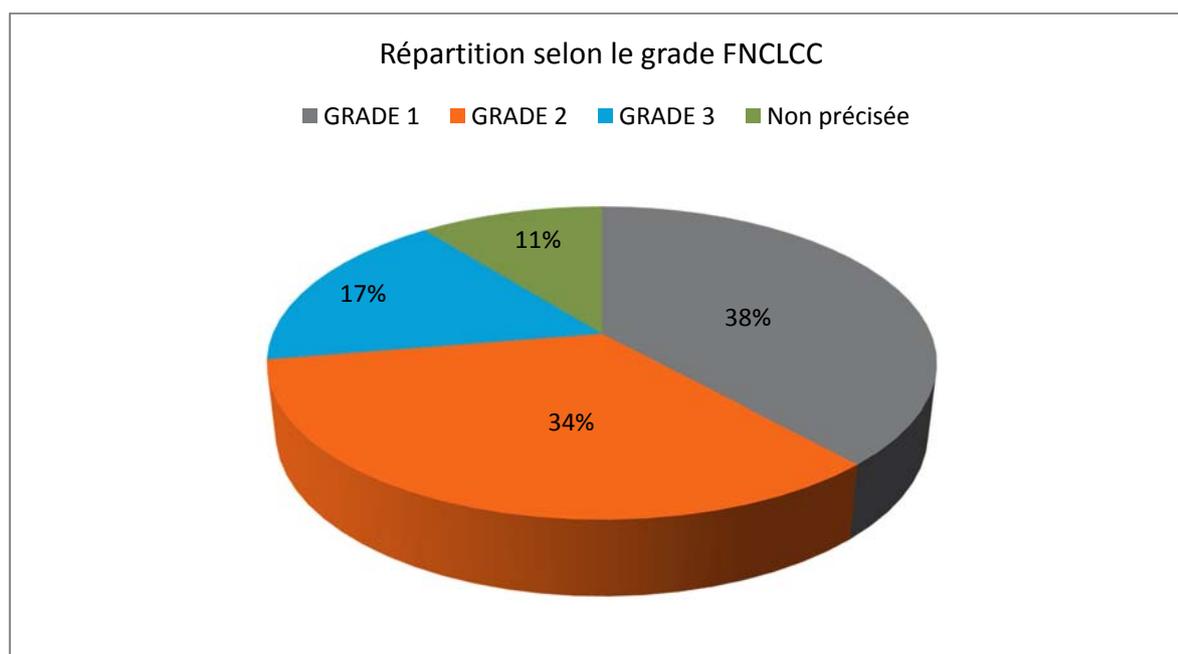


Figure 21 : Répartition selon le grade FNCLCC

## 5-Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine CDk4

La détection de la protéine *CDk4* en immunohistochimie avec l'anticorps anti CDK4 montre une immunoréactivité positive chez 18 patients (soit 38% des cas) et négative chez 5 patients soit 11% des cas.

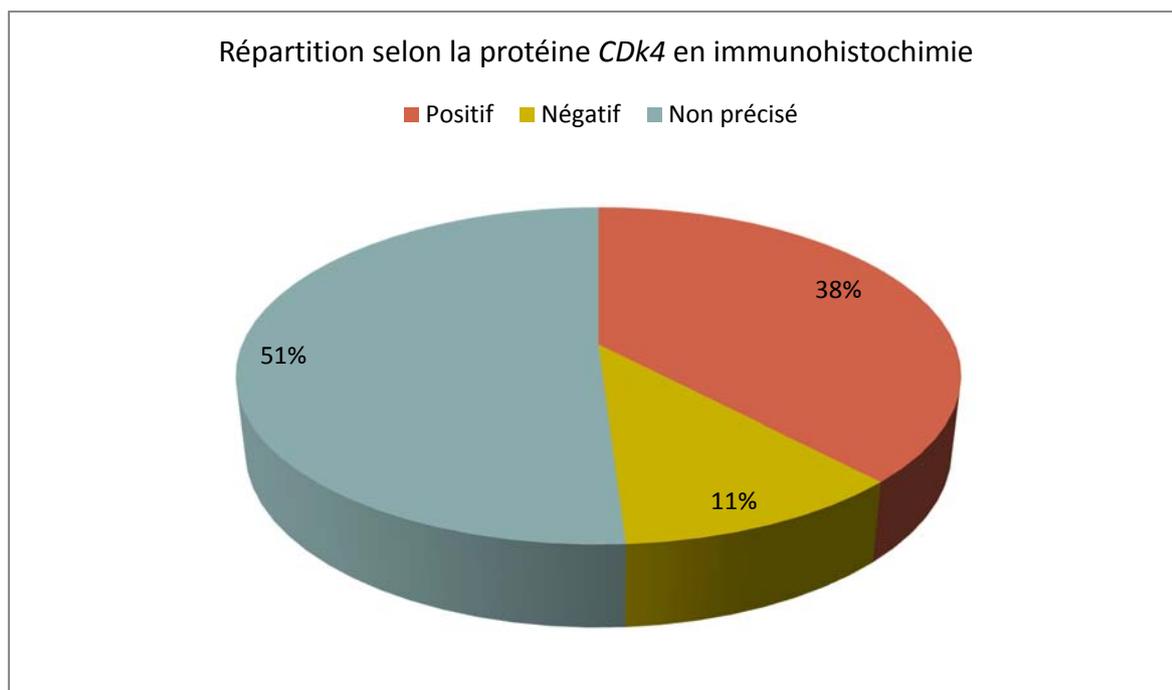


Figure 22: Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine CDk4

## 6-Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine MDM2

L'étude de la détection de la protéine MDM2 en immunohistochimie montre une immunoréactivité positive avec l'anticorps anti MDM2 chez 19 patients soit 40% des cas et négative chez 4 patients soit 9% des cas. Aucun résultat n'a été noté sur la moitié des patients (soit 51% des cas).

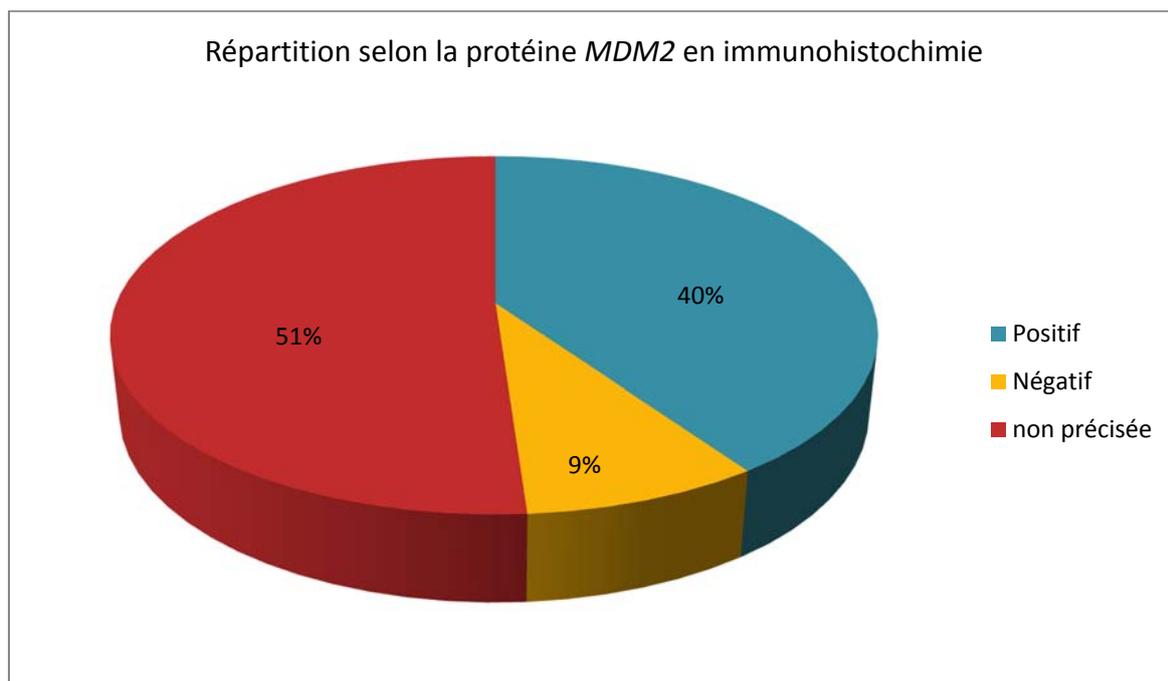
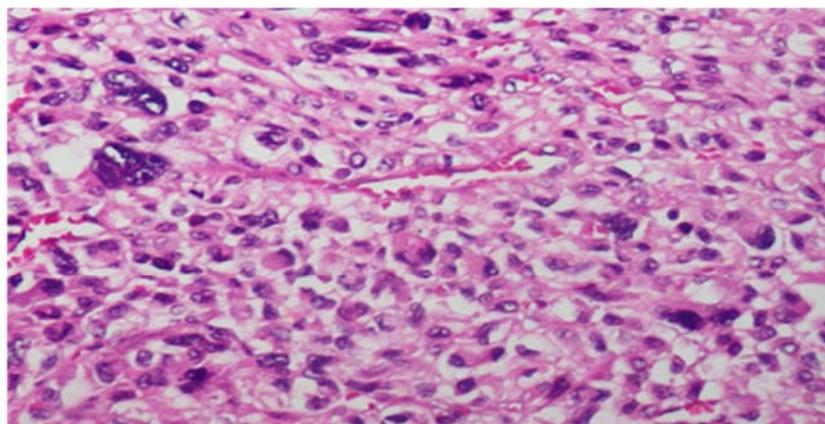
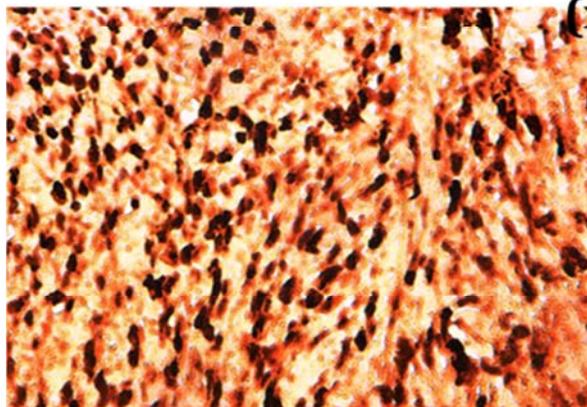


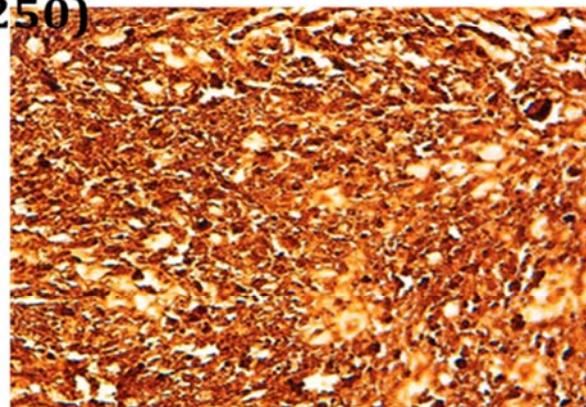
Figure 23 : Répartition selon l'immunoréactivité de la protéine *MDM2*



**Coloration HES d'un LPS dédifférencié  
(x250)**



**Anti-MDM2  
(x400)**



**Anti-CDK4 (x400)**

**Figure 24 : Immunoréactivité de l'anticorps anti MDM2 et anti CDK4 par  
immunohistochimie**

## 7-Répartition de la détection du gène *MDM2* selon la technique

### FISH :

La détection d'amplification du gène *MDM2* peut être recherchée aussi bien sur des cellules en culture, bloquées en anaphase (figure 25), que sur du tissu fixé et inclus dans la paraffine. La technique la plus utilisée dans les laboratoires c'est l'hybridation in situ par fluorescence « FISH » en choisissant les sondes spécifiques « LSI »

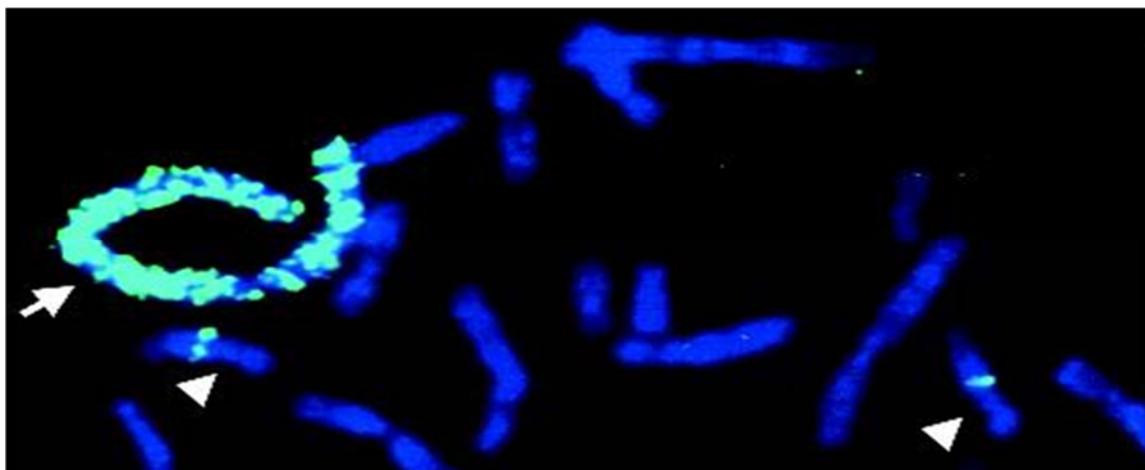


Figure 25 :

**Détection par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) de l'amplification du gène *MDM2* sur un chromosome géant surnuméraire d'un cas de liposarcome bien différencié**

- Analyse des résultats :
  - Rappel:

L'interprétation et le calcul du gène *MDM2* se fait selon le rapport *MDM2*/CEP12 :

- *MDM2*/CEP12 supérieur ou égal à 2 signifie qu'il y a une amplification du gène *MDM2*.

- *MDM2*/CEP12 inférieur à 2 signifie qu'il n'y a pas d'amplification du gène *MDM2*.
- Dans notre étude le gène *MDM2* est amplifié ou positif chez 15 patients soit 32% des cas et non amplifié ou négatif chez 27 patients soit 57% des cas.

L'étude de l'amplification du gène *MDM2* n'a pas été précisée chez 5 patients soit 11% des cas (cas non interprétables ou difficiles à interpréter).

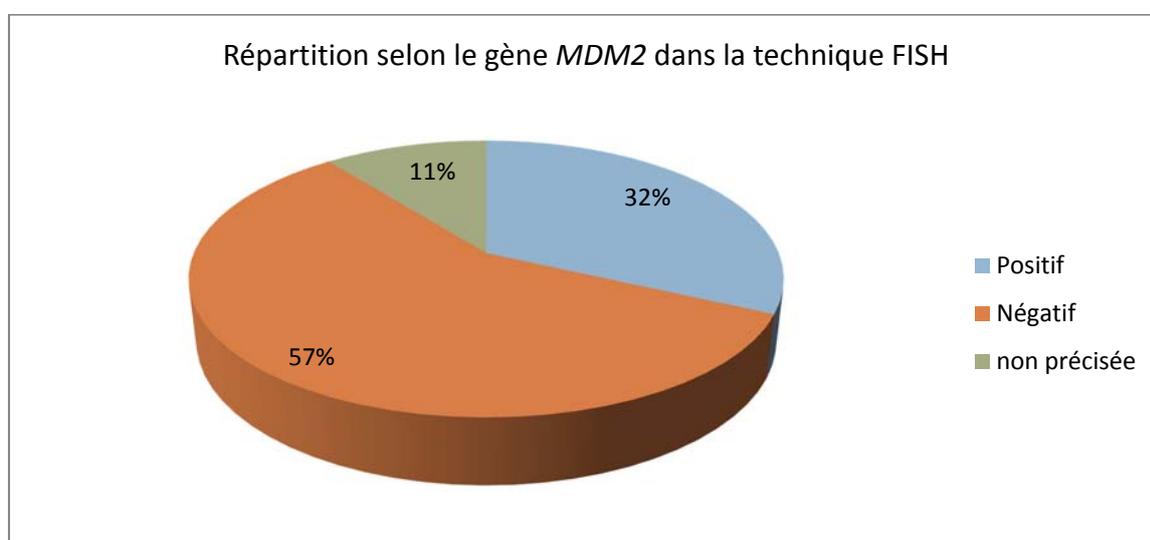


Figure 26: Répartition de la détection du gène *MDM2* selon la technique FISH:

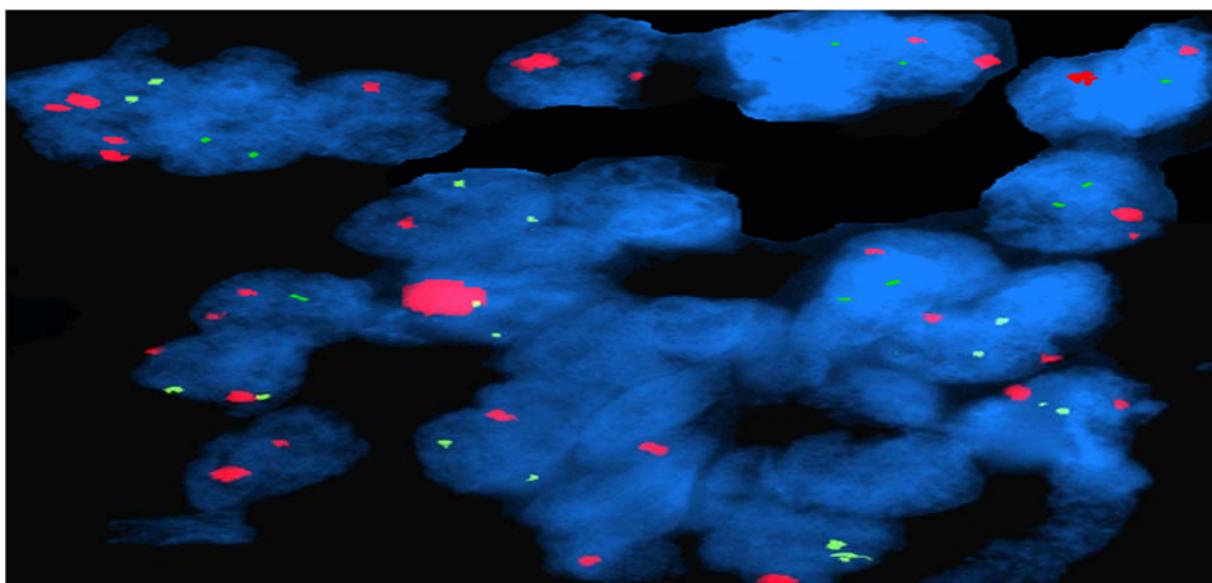
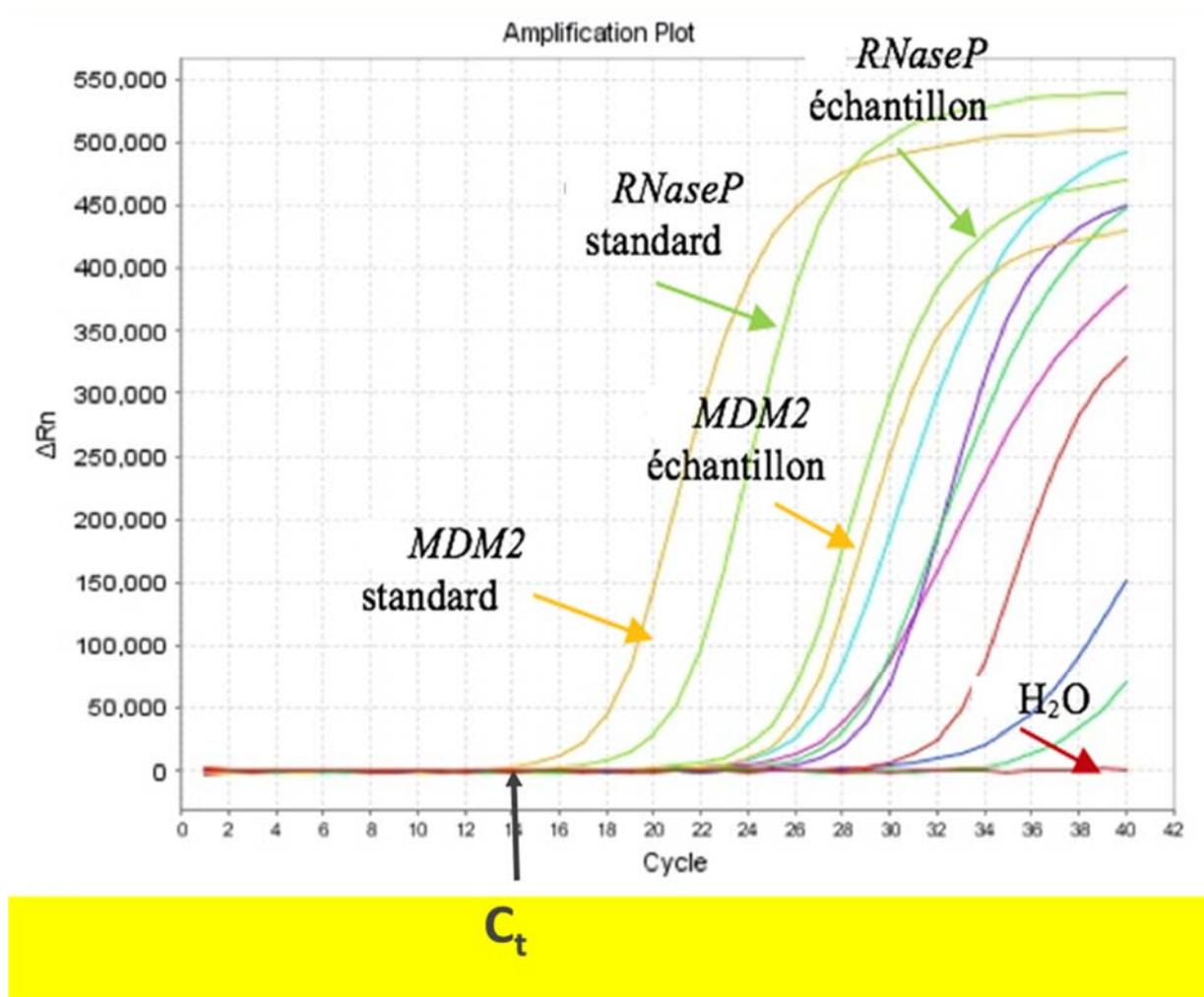


Figure 27 : Plusieurs copies de signaux rouges indiquant une amplification du *MDM2*

## 8- Répartition de la détection du gène *MDM2* selon la PCR en temps réel (QPCR)

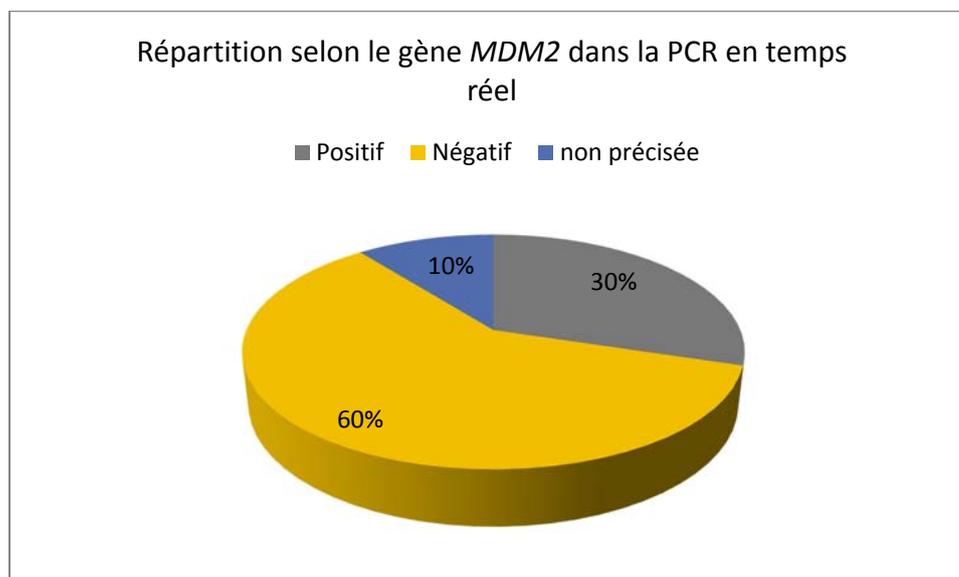
-Analyse des résultats:



**Figure 28** : Profil d'amplification du gène *MDM2* par qPCR

L'étude de l'amplification du gène *MDM2* selon la PCR en temps réel montre un gène *MDM2* amplifié ou positif chez 14 patients soit 30% des cas et non amplifié ou négatif chez 28 patients soit 60% des cas.

La répartition n'a pas été précisée chez 5 patients soit 10% des cas.



**Figure 29:** Répartition de la détection du gène *MDM2* selon la PCR en temps réel (QPCR)

## 9-Sensibilité et spécificité de la technique FISH par rapport à la technique d'immunohistochimie :

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.

**Tableau 11:** tableau croisé des résultats de l'amplification du gène *MDM2* par l'immunohistochimie et FISH (0 : non amplifié , 1: amplifié)

		MDM2		Total	
		0	1		
FISH	0	Effectif	4	11	15
		% compris dans FISH	26,7%=vpn	73,3%	100,0%
		% compris dans MDM2	100,0%=sp	57,9%	65,2%
		% du total	17,4%	47,8%	65,2%
		Effectif	0	8	8
		% compris dans FISH	0,0%	100,0%=vpp	100,0%
1		% compris dans MDM2	0,0%	42,1%=se	34,8%
		% du total	0,0%	34,8%	34,8%
		Effectif	4	19	23
Total		% compris dans FISH	17,4%	82,6%	100,0%
		% compris dans MDM2	100,0%	100,0%	100,0%
		% du total	17,4%	82,6%	100,0%

Dans notre étude, la valeur prédictive négative (VPN) de la technique FISH traduit la probabilité d'avoir une immunoréactivité négative avec l'anticorps anti *MDM2* (immunohistochimie) sachant que le résultat de la technique FISH est négatif dans 26.7 % avec une spécificité de 100%.

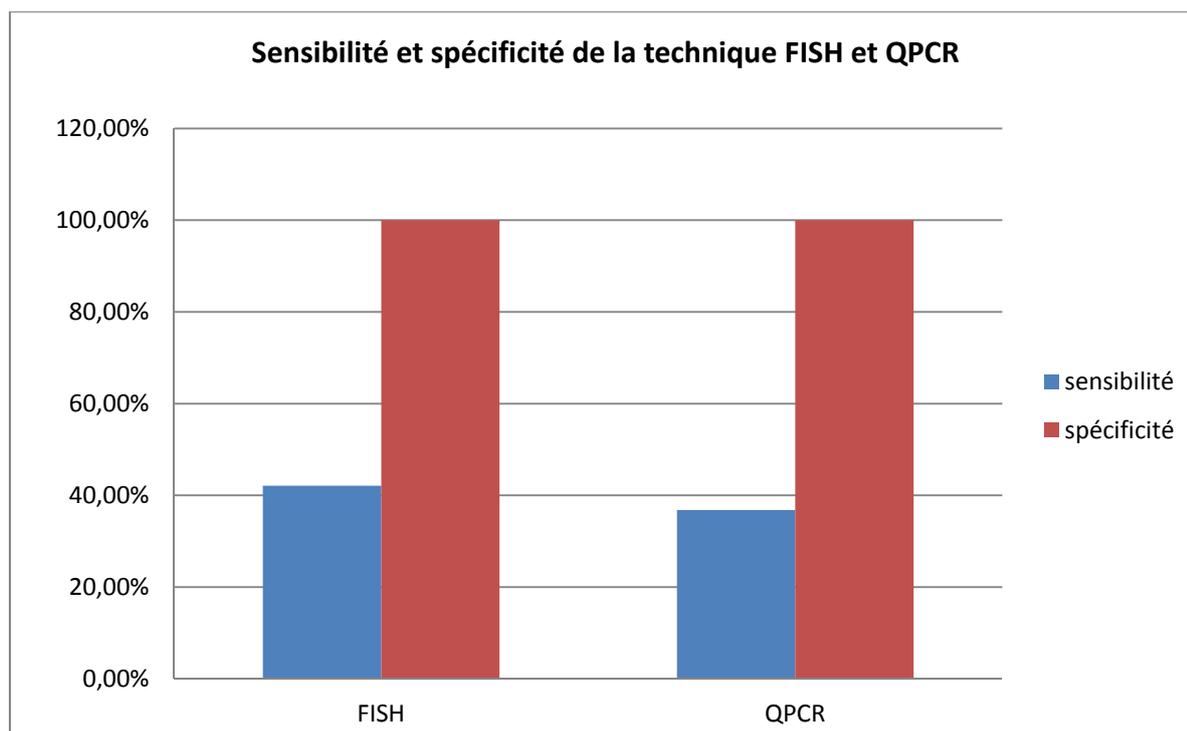
La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité d'avoir un résultat positif avec l'anticorps anti *MDM2* en immunohistochimie, sachant que le résultat de la technique FISH est positif à 100% avec une sensibilité de 42.1%.

## 10-Sensibilité et spécificité de la PCR en temps réel (QPCR):

En ce qui concerne la QPCR, notre étude a montré que sa VPN est de 25% avec une spécificité de 100% , par contre la VPP est de 100% avec une sensibilité de 36.8%.

**Tableau 12** : Tableau croisé des résultats de l'amplification du gène *MDM2* par l'immunohistochimie et QPCR

		MDM2		Total
		0	1	
QPCR	Effectif	4	12	16
	% compris dans QPCR	25,0%=vpn	75,0%	100,0%
	% compris dans MDM2	100,0%=sp	63,2%	69,6%
	% du total	17,4%	52,2%	69,6%
	Effectif	0	7	7
	% compris dans QPCR	0,0%	100,0%=vpp	100,0%
	% compris dans MDM2	0,0%	36,8%=se	30,4%
	% du total	0,0%	30,4%	30,4%
Total	Effectif	4	19	23
	% compris dans QPCR	17,4%	82,6%	100,0%
	% compris dans MDM2	100,0%	100,0%	100,0%
	% du total	17,4%	82,6%	100,0%



**Figure 30 : sensibilité et spécificité de la technique FISH et QPCR par rapport à l'immunohistochimie .**

# DISCUSSION

Le liposarcome est une tumeur maligne rare qui peut survenir à toutes les tranches d'âge et dont la probabilité de récurrence est significative si la prise en charge n'est pas correctement faite. L'étude menée sur les 47 patients diagnostiqués au CHU Hassan II montre une moyenne d'âge de 52 ans, avec des extrêmes allant de 10 et 85 ans. L'incidence augmente avec l'âge et un pic de survenue de liposarcome se situe entre 40 et 60 ans. Nos résultats concordent avec d'autres études, en effet Khin Thway et Jayson Wang (2017) ont montré que l'âge de survenue de liposarcomes différenciés et dédifférenciés à Londres varie avec l'âge allant de 12 à 95 et dont la moyenne d'âge est de 59 ans. Une autre étude menée par Kossivi Dantey et Karen Schoedel (2017) dans l'université de Pittsburgh, USA montre également que l'âge des patients varie entre 44 et 92, avec une moyenne de 69 ans.

La répartition des malades selon les tranches d'âge, dans notre étude, montre un seul pic de fréquence situé entre 51 et 60 ans. Cependant l'âge n'a pu être précisé chez 5 patients.

Selon la littérature et dans les mêmes études déjà citées ci-dessus (Khin Thway 2015 et Kossivi Dantey 2017), on note une légère prédominance masculine des liposarcomes avec une forte prédominance masculine, 61.7 % des hommes et 38.3 % des femmes, dans l'étude de Londres (Khin Thway 2015); tandis que dans l'étude faite à Pittsburgh USA (Kossivi Dantey 2017) la répartition hommes/femmes est équilibrée avec un sexe ratio de 1. Nos résultats montrent plutôt une prédominance féminine de 51%, cela n'est pas tout à fait concordant avec la littérature. On remarque que les résultats sont controversés.

Les tumeurs liposarcomateuses sont localisées à 50% au niveau de la cuisse, suivi de l'abdomen, du thorax, du retro péritoine et du médiastin qui sont représentés à 45% et enfin la tête et le cou avec 5%. Patrick Ware et Anthony Snow qui ont fait une étude à Wake Forest School of Medicine (2014) ont montré que la localisation la plus

fréquente est le rétro péritoine avec un pourcentage de 50 % puis la cuisse 13.8%, ensuite l'abdomen et le cordon spermatique avec un pourcentage pareil de 8.3% , puis le bras et fesses avec un pourcentage de 5.5% chacun et enfin le thorax- région axillaire en dernière position avec un pourcentage de 2.7 % chacun.

En outre une autre étude tunisienne menée, par F.Hammedi à l'hôpital universitaire de Sousse (2011), sur 30 patients atteints de liposarcomes montre que la localisation des cas se répartissaient en 36.6% au niveau de la cuisse ,30% du rétro péritoine, 10% de la fesse, 3% de la jambe, 3% de l'avant-bras, 3% du cou, 3%de l'épaule, 3% de la paroi thoracique, 3% du mésentère et 3% de la région iliaque. On remarque que la fréquence des localisations diffère d'une étude à l'autre, mais nos résultats restent plus au moins concordants avec ceux de la littérature qui ont montré une localisation plus fréquente au niveau du membre inférieur avec un pourcentage de 32%, suivi du membre supérieure avec un pourcentage de 21 %, puis l'abdomen 15%, la tête et le cou 9 % et en dernier le thorax et le péritoine avec un pourcentage de 6% chacun.

Le diagnostic des liposarcomes se base essentiellement sur les bases histologiques et les données anatomopathologiques. Toutes les tumeurs liposarcomateuses sont gradées 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 est en faveur de la mise en place d'un traitement adéquat et d'une bonne prise en charge du patient et donc d'une évaluation du pronostic. Ainsi, Jours et Al (2015) a rapporté dans son étude qu'il y' a plus de cas de métastases et récives dans les liposarcomes grade III par rapport aux Grades I et II. Naofumi Asano et Akihiko Yoshida (2017) ont également montré, par une étude portée sur 56

patients au Japon, que plus de 50% des liposarcomes bien différenciés et non différenciés, sont de grade III, suivi de grade II avec un pourcentage de 33%, alors que les liposarcomes de grade I ne sont représentés qu'à 17%. Selon Kossivi Dantey et Karen Schoedel (2017), les liposarcomes grade I et II confondus sont représentés avec un pourcentage de 25,4% et 74,5% sont de Grade III.

D'autre part F. Hammedi et A. Trabelsi (2011), dans leur étude menée sur les particularités anatomocliniques et évolutives des tumeurs liposarcomateuses issues de sousse en Tunisie, ont montré qu'il n'y a pas une différence très significative entre les pourcentages des différents grades ; 33,3% des liposarcomes sont de grade I, 30% sont de grade II et 36,6% sont de grade III.

L'étude menée sur les liposarcomes dans le CHU Hassan II a montré des résultats qui ne sont pas tout à fait similaires à ceux de la littérature. La plupart des patients de cette étude ont un liposarcome de grade I avec un pourcentage de 38%, suivi du grade II avec un pourcentage de 34% et seulement 17% des liposarcomes sont de grade III. Le pourcentage le plus élevé de cette étude est représenté par le groupe des patients de grade I, cela peut probablement être expliqué par le recrutement faible des patients ou bien par la discordance d'interprétation histologique.

Les anatomopathologistes se basent sur les atypies cellulaires, le rapport cytonucléaire et la présence de mitoses et/ou de nécrose pour le diagnostic tumoral. Cependant, certaines tumeurs bénignes montrent des similarités histologiques avec les tumeurs malignes comme le cas des liposarcomes bien différenciés avec les lipomes et plus particulièrement avec le sous type lipoma-like d'où, la difficulté de poser un diagnostic exact puisqu'on est confrontés à un diagnostic différentiel entre lipome et liposarcomes bien différenciés.

Par ailleurs, sur le plan génétique des lipomes , ils ne présentent pas d'amplification du gène *MDM2* ni de celui de *CDK4*, l'amplification de ces deux gènes peut se faire par biologie moléculaire, comme on peut chercher les protéines « MDM2, CDK4 » qui codent pour ces gènes par immunohistochimie. Ainsi, cette technique « immunohistochimie » est devenue un moyen possible pour faire la différence entre lipome et liposarcome.

Binh et al (2005) a fait une étude sur 559 patients et a trouvé que la protéine MDM2 est détectée à 100 % et CDK4 à 91% dans les liposarcomes bien différenciés. La même protéine MDM2 a été également retrouvée dans 5% des lipomes et CDK4 dans 2% des cas, Notre étude a montré une immunoréactivité positive à l'anticorps anti MDM2 dans 40 % des cas des liposarcomes et CDK4 dans 38% des cas. 9% des cas montrent une absence de la protéine MDM2 et 11% des cas une absence de la protéine CDK4. L'expression de la protéine MDM2 est typiquement associée aux liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés, mais pas spécifiquement. Nous avons constaté dans cette étude qu'il existe peut-être un problème de clone des anticorps utilisés et c'est la raison pour laquelle nous n'avons inclus en immunohistochimie que 51 % des patients. Selon M.B Binh et S.LeGuellec (2018), l'expression du MDM2 a été trouvée dans d'autres sarcomes des tissus mous notamment l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing. L'immunohistochimie peut faire la différence entre lipomes et liposarcomes mais elle n'est pas performante quand il s'agit de différencier entre liposarcomes et d'autres types de sarcomes. Les anatomopathologistes considèrent l'immunohistochimie comme une étape incontournable dans la démarche diagnostique , mais dans le cas des sarcomes une analyse moléculaire est devenue de plus en plus indispensable parce que jusqu'à l'heure actuelle les anticorps qui sont à notre disposition sont sensibles mais non spécifiques.

Certains liposarcomes bien différenciés de type « lipoma-like » peuvent présenter un faible marquage voir absent avec les anticorps anti MDM2 et/ou anti CDK4 , en outre les tumeurs profondes localisées dans la région rétro-péritonéale ou de grande taille (supérieure ou égale à 5cm) nécessitent une confirmation ou infirmation formelle par une analyse moléculaire. En effet, la biologie moléculaire est une nouvelle technique de pointe qui peut apporter des arguments décisifs en faveur de la bénignité ou de la malignité de la tumeur. La recherche d'une amplification des gènes MDM2 et/ou CDK4 par hybridation in situ par fluorescence « FISH » ou par PCR permet d'éliminer le diagnostic différentiel (zhang H 2010 , Marino Enriquez A 2016). La pose d'un bon diagnostic des liposarcomes permet de mieux évaluer le pronostic de la tumeur et de guider le clinicien dans la décision thérapeutique (S. Le Guellec 2018).

La technique FISH est actuellement considérée le gold standard pour la mise en évidence d'amplification du gène *MDM2* dans les liposarcomes, tout en utilisant la sonde MDM2 spécifique LSI et une autre centromérique. Plusieurs études réalisées sur les tumeurs bien différenciées ont montré que la technique FISH est plus sensible que la technique PCR (Sirvent N 2007). En effet, l'étude menée par Khin Thway (2015) à l'unité des sarcomes en Angleterre et qui a porté sur 142 cas de liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés diagnostiqués histologiquement, l'analyse par FISH sur les 142 liposarcomes a montré que 96.5 % des cas présentent une amplification du gène *MDM2* et 3.5 % des cas ne présentent qu'une double copie du gène *MDM2* et donc il ne s'agit pas de liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés

Une autre étude menée par Patrick L.Ware (2014) et qui a porté sur 36 cas des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés. L'analyse du profil génétique réalisé par la technique FISH a montré que 94.5 % (soit 34 cas) présentent une amplification du gène *MDM2* et 5.5% (soit 2 cas) ne présentent pas d'amplification du gène *MDM2*.

L'étude précise que 91% des liposarcomes bien différenciés et 100 % des liposarcomes dédifférenciés montrent une amplification du gène *MDM2*. Dans le même sens, une autre étude Japonaise menée, par Shimada S (2016), sur 19 liposarcomes a montré un taux d'amplification des deux gènes *MDM2* et *CDK4* dans 100% des cas de vrais liposarcomes avec un taux pareil pour le gène *CDK4*. La technique FISH est devenue donc d'une utilité incontournable pour différencier entre liposarcomes et d'autres sarcomes des tissus mous

Notre étude a montré que 42 sur 47 cas étudiés et analysés par FISH, 32% d'entre eux (soit 15 patients) présentent une vraie amplification du gène *MDM2* alors que 57 % ne présentent qu'une double copie du gène, donc on ne note pas d'amplification dans plus de la moitié des cas. Suite à l'ensemble des études réalisées, il est judicieux de compléter l'analyse histologique des liposarcomes par la mise en évidence d'amplification des gènes *MDM2* et *CDK4*. L'indication de la technique FISH est soumise à des critères cliniques et radiologiques (S. le Guellec 2018).

Un autre moyen moléculaire peut être réalisé à la détection d'amplification du gène *MDM2* dans les tumeurs, notamment les liposarcomes, c'est la PCR en temps réel qui est connue par sa sensibilité, sa spécificité et sa rapidité. En effet, avec la PCR en temps réel, on arrive à détecter l'amplification même si elle n'est présente que dans 1% des cellules tumorales ; toutefois une extrême rigueur de travail de laboratoire et d'hygiène s'imposent afin d'éviter les faux positifs par contamination du matériel.

Hostein I (2004) a mené une étude à l'institut Bergonié sur 48 liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés pour évaluer l'amplification du *MDM2* et *CDK 4* par PCR en temps réel . Les résultats de l'étude ont révélé que le gène *MDM2* est amplifié dans 98.2% des cas et non amplifié dans 1.8 % , l'amplification du gène *CDK4* était positive dans 82.4% des cas et négative dans 17.6% .

Shimada S(2006) a fait le même travail sur 19 cas de liposarcomes (la technique utilisée est la PCR en temps réel ) , il a trouvé que les gènes *MDM2* et *CDK4* sont amplifiés dans 100% des cas . Notre étude a montré que l'amplification du gène *MDM2* par QPCR a été retrouvée dans 30% des cas (soit 14 patients) et non amplifiée dans 60% des cas sachant que l'étude n'a pas été faite chez 10% des patients. On remarque dans cette étude qu'avec la technique FISH on détecte plus d'amplification qu'avec la technique QPCR, nos résultats confirment donc que la FISH est probablement le test le plus sensible pour poser exactement le diagnostic des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés, tout en mettant en évidence l'anomalie génétique clé de ces tumeurs.

Patrick L.Ware (2014) a montré que la sensibilité et la spécificité de la FISH, pour la détection d'amplification du gène *MDM2* dans les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés, est de 86% et 96% respectivement. Une autre équipe japonaise a également montré que la sensibilité et la spécificité de la technique FISH sont respectivement de 100% et 95% Kimura .H (2013)

Par ailleurs, ,Khin Thway et Sugita.S (2015) ont trouvé un taux de concordance de 97.3% entre l'immunohistochimie et FISH dans les liposarcomes bien différenciés et de 95.7% dans les liposarcomes dédifférenciés. Sur 157 cas des liposarcomes ayant une surexpression de la protéine MDM2 en immunohistochimie , 15 ne présentent pas d 'amplification par FISH , ils ont montré que la technique FISH est plus sensible et spécifique que l'immunohistochimie et QPCR dans le diagnostic des liposarcomes, et qu'elle fait la différence entre liposarcome et les autres sarcomes des tissus mous avec une précision et une sensibilité élevée.

Sirvent.N (2007) a mené une étude à Nice pour comparer entre les deux techniques de diagnostic des liposarcomes « FISH et QPCR » , il a trouvé que la technique FISH est plus sensible et plus spécifique que la technique QPCR ; par contre

le nombre de cas non interprétables est plus élevé avec la FISH par rapport au QPCR . En outre, il a montré que lorsque le pourcentage de cellules tumorales est minime dans certains liposarcomes c'est la technique FISH qui est plus performante pour le diagnostic que la technique QPCR.

Les résultats de notre étude sont concordants avec ceux de la littérature, en effet les deux techniques moléculaires « FISH et QPCR» sont toutes les deux spécifiques à 100%. Cependant, la technique FISH est plus sensible avec 42,1% en diagnostic des liposarcomes par rapport à la technique QPCR qui a une sensibilité de 36.8%. Les pourcentages de sensibilité ne sont pas très élevés parce que probablement qu'il faut élargir l'échantillonnage d'étude, et cela en travaillant en collaboration avec d'autres équipes des autres CHU de notre pays, pour approcher les 50% et peut être aussi penser à avoir des spécialistes d'anatomopathologie pour faire la relecture de tous les cas pour approcher le plus du diagnostic des liposarcomes qu'on les confirme avec la technique FISH.

# CONCLUSION

Les liposarcomes sont des tumeurs rares dont la classification histologique est complexe avec des discordances diagnostiques fréquentes. Leur diagnostic est considéré comme un défi.

La connaissance des anomalies moléculaires des liposarcomes a réellement révolutionné l'approche de ces tumeurs que ce soit sur le plan du diagnostic, du pronostic ou de la prise en charge thérapeutique grâce à la meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques. Elle permet actuellement en complément de l'imagerie médicale et l'immunohistochimie une meilleure définition des liposarcomes avec une classification plus reproductible.

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

# RESUME

## Résumé

**Titre :** L'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés.

**Objectif :** Le but de ce travail est de montrer l'intérêt de la biologie moléculaire dans le diagnostic des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés par une comparaison des deux techniques moléculaires FISH et QPCR par rapport à l'histologie et l'immunohistochimie qui sont considérées comme techniques de base pour le diagnostic de ces tumeurs.

**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 de liposarcomes diagnostiqués au service d'anatomopathologie entre 2010 et 2018 pour un total de 47 patients

**Mots clés :** liposarcome, immunohistochimie, FISH, MDM2, CDK4.

**Introduction :** Les liposarcomes sont des tumeurs rares des tissus mous qui se développent à partir du tissu adipeux. Ils représentent 1% de tous les cancers et 15-25% des sarcomes des tissus mous. C'est un cancer qui touche généralement les adultes, dont l'incidence atteint un pic entre 40 et 60 ans avec une légère prédominance masculine. Le diagnostic des liposarcomes peut être posé par IRM, mais seule l'anatomopathologie associée à la biologie moléculaire peuvent le confirmer. Le traitement des liposarcomes est basé sur la chirurgie et le pronostic dépend du grade histologique.

### **Résultats :**

L'âge des patients varient entre 10 et 85 ans avec un âge moyen de 52 ans, 51% sont des femmes, 38% hommes et 11% non précisé. Les cas se répartissent en 32% des liposarcomes des membres inférieurs, 21% du membre supérieure, 15% de l'abdomen, 9% de la tête et du cou, 6% du thorax, 6% du péritoine et 11% non précisée.

Les tumeurs sont gradées selon le système de grading de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) en 38% des liposarcomes Grade I ,34% Grade II, 17% Grade III et 11% non précisé.

La détection de la protéine CDk4 en immunohistochimie avec l'anticorps anti CDK4 montre une immunoréactivité positive chez 38% des cas, négative chez 11% des cas et non précisée dans 51% des cas. L'étude de la détection de la protéine MDM2 en immunohistochimie montre une immunoréactivité positive chez 40% des cas, négative chez 9% des cas et non précisée chez 51% des cas.

La répartition selon la technique FISH montre une MDM2 amplifiée dans 32% des cas, non amplifiée dans 57% des cas et non précisée chez 11% des patients. La répartition selon la PCR en temps réel montre une MDM2 amplifiée dans 30% des cas, non amplifiée dans 60% des cas et non précisée chez 10% des patients.

L'étude de la sensibilité et la spécificité des techniques FISH et QPCR dans le diagnostic des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés montre une sensibilité de 42,1% de la technique FISH et 36,8% de la QPCR, et une spécificité de 100% pour les deux.

### **Conclusion**

Les liposarcomes constituent un groupe hétérogène de sarcomes des tissus mous dont le diagnostic est essentiellement histologique et moléculaire, leur prise en charge est multidisciplinaire.

## Abstract

**Title:** The contribution of molecular biology in the diagnosis of well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas.

**Objective:** The aim of this work is to show the interest of molecular biology in the diagnosis of well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas by a comparison of the two molecular techniques FISH and QPCR 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 liposarcomas diagnosed at the pathology department between 2010 and 2018 for a total of 47 patients.

Key words: liposarcoma, immunohistochemistry, FISH, MDM2, CDK4.

**Introduction :** Liposarcomas are rare tumors of the soft tissues that develop from adipose tissue. They represent 1% of all cancers and 15–25% of soft tissue sarcomas. It is a cancer that usually affects adults, whose incidence peaks between 40 and 60 years with a slight male predominance.

The diagnosis of liposarcomas can be made by MRI, but only the pathology associated with molecular biology can confirm it.

The treatment of liposarcomas is based on surgery and the prognosis depends on the histological grade.

### **Results:**

The age of the patients varies between 10 and 85 years with an average age of 52 years, 51% are women, 38% men and 11% unspecified. The cases are divided into 32% of liposarcomas of the lower limbs, 21% of the upper limb, 15% of the abdomen, 9% of the head and neck, 6% of the thorax, 6% of the peritoneum and 11% unspecified.

Tumors are graded according to the National Federation of Cancer Centers (FNCLCC) grading system in 38% Grade I Liposarcoma, 34% Grade II, 17% Grade III and 11% unspecified.

The detection of the CDk4 protein in immunohistochemistry with the anti-CDK4 antibody shows a positive immunoreactivity in 38% of cases, negative in 11% of cases and not specified in 51% of cases. The study of the detection of MDM2 protein in immunohistochemistry shows a positive immunoreactivity in 40% of cases, negative in 9% of cases and not specified in 51% of cases.

The distribution according to the FISH technique shows an MDM2 amplified in 32% of the cases, not amplified in 57% of the cases and not specified in 11% of the patients. The distribution according to the real-time PCR shows a MDM2 amplified in 30% of cases, not amplified in 60% of cases and not specified in 10% of patients.

The study of the sensitivity and specificity of the FISH and QPCR techniques in the diagnosis of well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas shows a sensitivity of 42.1% of the FISH technique and 36.8% of the QPCR, and a specificity of 100% for both.

### **Conclusion**

Liposarcomas constitute a heterogeneous group of soft tissue sarcomas whose diagnosis is essentially histological and molecular, their management is multidisciplinary.

## خلاصة

العنوان: مساهمة البيولوجيا الجزيئية في تشخيص الشحميات الشحمية الشديدة التمييز والمختلفة.

الهدف: الهدف من هذا العمل هو إظهار اهتمام البيولوجيا الجزيئية بتشخيص ساركومة دهنية متباينة بشكل جيد ومختلفة من خلال مقارنة بين التقنيتين الجزيئيتين FISH و QPCR 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 ساركومة الدهون التي تم تشخيصها في قسم الأمراض بين عامي 2010 و 2018 لما مجموعه 47 مريضاً.

الكلمات المفتاحية: الساركومة الدهنية ، الكيمياء المناعية ، FISH ، MDM2 ، CDK4.

مقدمة:

ساركومة الدهون هي أورام نادرة للأنسجة الرخوة التي تنشأ من الأنسجة الدهنية. أنها تمثل 1 ٪ من جميع أنواع السرطان و 15-25 ٪ من الأورام اللحمية الأنسجة الرخوة. إنه سرطان يصيب عادة البالغين ، حيث تبلغ حالات الإصابة ما بين 40 و 60 عاماً مع غلبة طفيفة للذكور.

يمكن أن يتم تشخيص ساركومة الدهون بواسطة التصوير بالرنين المغناطيسي ، ولكن فقط علم الأمراض المرتبط بالبيولوجيا الجزيئية يمكنه تأكيد ذلك.

يعتمد علاج الساركومة الدهنية على الجراحة والتكهن يعتمد على الدرجة النسيجية.

النتائج:

يتراوح عمر المرضى بين 10 و 85 عاماً بمتوسط عمر 52 عاماً ، 51 ٪ منهم نساء و 38 ٪ رجال و 11 ٪ غير محدد. تنقسم الحالات إلى 32 ٪ من شحميات الدهون في الأطراف السفلية ، و 21 ٪ من الطرف العلوي ، و 15 ٪ من البطن ، و 9 ٪ من الرأس والعنق ، و 6 ٪ من الصدر ، و 6 ٪ من الصفاق و 11 ٪ غير محددة.

يتم تصنيف الأورام وفقاً لنظام تصنيف الاتحاد الوطني لمراكز السرطان (FNCLCC) في 38 ٪ من الدرجة الأولى من الدهون ، و 34 ٪ من الدرجة الثانية ، و 17 ٪ من الدرجة الثالثة ، و 11 ٪ غير محدد.

إن اكتشاف بروتين CDK4 في الكيمياء المناعية مع الجسم المضاد لـ CDK4 يظهر فعالية مناعية إيجابية في 38 ٪ من الحالات ، سلبية في 11 ٪ من الحالات وغير محددة في 51 ٪ من الحالات. أظهرت دراسة الكشف عن بروتين MDM2 في

الكيمياء المناعية وجود فاعلية مناعية إيجابية في 40 ٪ من الحالات ، سلبية في 9 ٪ من الحالات وغير محددة في 51 ٪ من الحالات.

يوضح التوزيع وفقاً لتقنية FISH تضخيم MDM2 في 32٪ من الحالات ، وليس تضخيمًا في 57٪ من الحالات وغير محدد في 11٪ من المرضى. يُظهر التوزيع وفقاً لتقرير PCR في الوقت الفعلي أن MDM2 يتضخم في 30٪ من الحالات ، ولا يتضخم في 60٪ من الحالات وغير محدد في 10٪ من المرضى.

تبين دراسة حساسية وخصوصية تقنيات FISH و QPCR في تشخيص ساركومة الدهون المتميزة والمختلفة عن حساسية 42.1 ٪ من تقنية FISH و 36.8 ٪ من QPCR ، وخصوصية 100 ٪ لكليهما.

#### استنتاج

تشكل ساركومة الدهون مجموعة غير متجانسة من الأورام اللحمية في الأنسجة الرخوة التي يكون تشخيصها هو نسيجياً وجزئياً بشكل أساسي ، وتكون إدارتها متعددة التخصصات.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Honoré C, Méeus P, Stoeckle E, Bonvalot S. Soft tissue sarcoma in France in 2015: Epidemiology, classification and organization of clinical care. *J ViscSurg.* 2015;152:223–30
2. Matthew A. Clark, F.R.A.C.S., Cyril Fisher, F.R.C.Path., Ian Judson, F.R.C.P., and J. Meirion Thomas, F.R.C.S., Soft-Tissue Sarcomas in Adults, *The new England Journal of medicine* 2005
3. 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
4. J.M.Coindre Intérêt et limites du grade histo–pronostique dans les sarcomes des tissus mous *Springer /Oncologie* (2006) 8 :259–260
- 5.. L.Zelek La chimiothérapie des sarcomes des tissus mous *Cancer/Radiothérapie* (2006) 68–71
6. Société canadienne de cancer Vue d'ensemble du sarcome des tissus mous *Encyclopédie canadienne du cancer* (2019)
7. J.Fayette, J.Y.Blay, I.Ray–Coquard Les sarcomes des tissus mous: bonnes pratiques médicales pour une prise en charge optimal *Cancer/Radiothérapie* (2006):3–6
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*,:44–099.(2004)
9. Arkun R, Memis A, Akalin T et al. Liposarcoma of soft tissue: MRI findings with pathologic correlation. *Skeletal Radiology*; 26: pp 167–172. 1997
10. Coffin CM. Adipose and myxoid tumors. In *Pediatric Soft Tissue Tumors: A Clinical, Pathological, and Therapeutic Approach*, Coffin CM, Dehner LP and O'Shea PA eds. Baltimore, Williams and Wilkins, pp 254–276. (1997),

11. Christopher DM, Unni KK, Mertens F. WHO classification of tumors. Pathology and genetics: tumors of soft tissue and bone. Lyon, France, 2002, IARC Press, pp 35–46
- Arlen M, Higinbotham NL, Huvos AG et al. Radiation-induced sarcoma of bone. *Cancer* (1971); 28: 1087
12. Mark A. Dickson, William D. Tap, Mary Louise Keohan, Sandra P. D'Angelo, Mrinal M. Gounder, Cristina R. Antonescu, Jonathan Landa, Li-Xuan Qin, Dustin D. Rathbone, Mercedes M. Condy, Yelena Ustoyev, Aimee M. Crago, Samuel Singer, and Gary K. Schwartz ,Phase II Trial of the CDK4 Inhibitor PD0332991 in Patients With Advanced CDK4-Amplified Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma 2013
13. *Virchow R. Ein Fall von bösartigen, zum Theil in der Form des Neuroms auftretenden Fettgeschwülsten, 1857.*
14. *Liposarcoma—the malignant tumor of lipoblasts", Arthur Purdy Stout, Annals of Surgery, 1944; pp 86–107.*
15. Brennan MF and Lewis JJ eds. Adjuvant Management. In *Diagnosis and Management of Soft Tissue Sarcoma*. London, 2002, Martin Dunitz, pp 153–183.
16. Brennan MF and Lewis JJ eds. Clinical and pathologic correlates. In *Diagnosis and Management of Soft Tissue Sarcoma*. London, 2002, Martin Dunitz, pp 91–140
17. Johnson CJ1, Pynsent PB, Grimer RJ Clinical features of soft tissue sarcomas. 2001
18. ESMO , European Society for Medical Oncology 2014
19. Johnson GD1, Smith G, Dramis A, Grimer RJ. Delays in referral of soft tissue sarcomas. 2008
20. P.G. Casali L. Jost S. Sleijfer J. Verweij J.–Y. Blay On behalf of the ESMO Guidelines Working Group Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up ,2009.
22. Réseau de cancérologie de midi pyrénées 2008

- 22-PEARLSTONE DB,PISTERS PWT,BOLD RJ et COLL Patterns of recurrence in extremity liposarcoma : Implications for staging and follow-up Cancer;85-92.(1999)
- 23-B.-N. Bui, J.-Y. Blay Standars ,et recommandations 2005 pour la prise en charge des patients adulte atteints de sarcome es tissus mous.mars 2006
- 24-NIJHUS PH et COLL. Clinico-pathological data and prognostic factors in completely resected.AJCC stage I II liposarcoma. Surgical oncology 2000.17,535-43.
- 25-KILPATRICK E,DOYON j,CHOONG P,M et COLL. The clinicopathologic spectrum of myxoid and round cell liposarcoma. Cancer 1996,77;1450-58
- 26-COINDRE JM,LE TREUT A,BOBIN JY,BOSSET JF er SPIELMAN. Liposarcome poplité :concertation pluridisciplinaire. Bull cancer 1990 ;77 :1251-59
- 27-COINDRE JM,TERRIER P et COLL. Predictive value of grade metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas. Cancer 2001;91:1914-24
- 28.Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, et al. World HealthOrganization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon, France: IARC Press 2013.
29. LADANYI M. Fusions of the SYT and SSX genes in synovial sarcoma. Oncogene 2001, 20, 5755-62
- 30.ElysePoitras et Alain Houde, « La PCR en temps réel: principes et applications » , *Reviews in Biology and Biotechnology*, vol. 2, n° 2, 2002, p. 2-11.
31. Atlas du corps humain , TLC-Edusoft- Mattel Interactive 2000
- 32 Jaai Kim Juntaek Lim <sup>b</sup>Changsoo Lee-, Quantitative real-time PCR approaches for microbial communitystudies in waste watert reatmentsystems: Applications and considerations (2013)

33. CLINISCIENSES ,Réactifs et instruments pour l'immunologie, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire.2019
- 34.Liu, J., Feldman, P. and Chung, T. D. Y. Real-time monitoring in vitro transcription usingmolecularbeacons.AnalyticalBiochemistry # 300: 40–45. 2002.
35. Pr GERARD ABADJIAN , Université Saint Joseph paris , epathologies, EPU tumeurs de tissus mous, 2004
36. Centre de biologie moléculaire CHU HASSAN II FES ,2019
- 37.M. Taylor, M. Guillon, V. Champion, M. Marcu, J.B. Arnoux, O. Hartmann \* Service d'oncologie pédiatrique, institut Gustave–Roussy, 39, rue Camille–Desmoulins, 94805 Villejuif, France, 2005
- 38 . CHIBON F, MARIANI O, DERRE J, MALINGE S, COINDRE JM, GUILLOU L, LAGACE R, AURIAS A. A subgroup of malignant fibroushistiocytom asisassociated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. Cancer GeneticsCytogenetics 139, 24.( 2002,)
39. COINDRE JM, HOSTEIN I, BENHATTAR J, LUSSAN C, RIVEL J, GUILLOU L. Malignant peripheral nerve sheathtumors are t(X;18)–negative sarcomas. Molecular analysis of 25 cases occurring in neurofibromatosis type 1 patients using two different RT–PCR–based methods of detection. ModPathol,15:589–92.( 2002)
40. COINDRE JM, MARIANI O, CHIBON F, MAIRAL A, de SAINT AUBIN SOMERHAUSEN N, FAVRE–GUILLEVIN E, BUI NB, STOECKLE E, HOSTEIN I, AURIAS A. Most malignant fibroushistiocytomas developed in the retroperitoneum are dedifferentiated liposarcomas: 2003
41. ANTONESCU CR, ELAHI A, HUMPHREY M, LUI Y M, HEALY JH, BRENNAN MF, WOODRUFF JM, JHANWAR SC, LADANYI M : Specific of TLS–CHOP rearrangement for classicmyxoid/round cellliposarcoma. Absence in predominantlymyxoidwell-differentiatedliposarcomas. J MolDiag 2, 132–8. 2000,

42. ANTONESCU CR, TSCHERNYAVSKY SJ, DECUSEARA R, LEUNG DH, WOODDRUFF JM, BRENNAN MF, BRIDGE JA, NEFF JR, GOLDBLUM JR, LADANYI M : Prognostic impact of p53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma 2001
43. HISAOKA M, TSUJI S, MORIMITSU Y, HASHIMOTO H, SHIMAJIRI S, KOMIYA S, USHIJIMA M. Detection of TLS/FUS-CHOP fusion transcripts in myxoid and round cell liposarcomas by nested reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction using archival paraffin-embedded tissues : *Diag Mol Pathol* 7, 96-101. 1998.
44. Haas et al. Radiotherapy for management of extremity soft tissue sarcomas : why, when, and where ? *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 2012 ;84(3) :572-580
45. BONVALOT S., MISSENAARD G., ROSSET P., TERRIER P., LE PECHOUX C., LE CESNE A. Principes du traitement chirurgical des sarcomes des tissus mous des membres et du tronc de l'adulte EMC 2013 BONVALOT S. Sarcomes des tissus mous de l'adulte - Etat des lieux Edition Convergence, 2013
46. Hélène ANTOINE-POIREL., Institut Roi Albert II. Groupe multidisciplinaire des tumeurs de l'appareil locomoteur/sarcomes. Centre de Génétique Humaine. Cliniques universitaires Saint-Luc 2015
47. Matsumoto K, Hukuda S, Ishizawa M, Chano T, Okabe T. MRI finding in intramuscular lipomas. *Skeletal Radiol* 1999;28:145-52.
- 48 Rydholm H, Berg NO. Size and clinical incidence of Lipoma and Sarcoma. *Acta Orthop Scand* 1983;54:929-34.
49. Zhang H, Erickson-Johnson M, Wang X, Oliveira JL, Nascimento AG, Sim FH, 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*. sept 2010;34(9):1304-11.

50. Mariño-Enríquez A, Bovée JVMG. Molecular Pathogenesis and Diagnostic, Prognostic and Predictive Molecular Markers in Sarcoma. *Surg Pathol Clin.* sept 2016;9(3):457-73.
- 51 Sophie LeGuellec , HISTOSEMINAIRE CARREFOUR PATHOLOGIE , MASSE DU TISSU ADIPEUX : INFLAMMATION, PSEUDO-TUMEURS ET TUMEURS : L'EVENTAIL « CORNELIEN » 2018
52. Hostein I, Pelmus M, Aurias A, Pedeutour F, Mathoulin-Pélissier S, Coindre JM. Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France , Evaluation of MDM2 and CDK4 amplification by real-time PCR on paraffin wax-embedded material: a potential tool for the diagnosis of atypical lipomatous tumours/well-differentiated liposarcomas. 2004
53. Shimada S<sup>1</sup>, Ishizawa T, Ishizawa K, Matsumura T, Hasegawa T, Hirose T The value of MDM2 and CDK4 amplification levels using real-time polymerase chain reaction for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. Department of Pathology, Saitama Medical University School of Medicine, Saitama 350-0495, Japan. 2006
54. Sirvent, Nicolas, MD, PhD\* †; Coindre, Jean-Michel, MD‡; Maire, Georges, PhD\*; Hostein, Isabelle, PhD‡; Keslair, Frédérique, BSc\*; Guillou, Louis, MD§; Ranchere-Vince, Dominique, MD||; Terrier, Philippe, MD¶; Pedeutour, Florence, PharmD, PhD\* Detection of MDM2-CDK4 Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization in 200 Paraffin-embedded Tumor Samples: Utility in Diagnosing Adipocytic Lesions and Comparison With Immunohistochemistry and Real-time PCR, laboratoire de génétique des tumeurs solides , faculté de médecine , hospital universitaire de nice 2007
55. Sugita S, Asanuma H, Hasegawa T. Diagnostic use of fluorescence in situ hybridization in expert review in a phase 2 study of trabectedin monotherapy in

- patients with advanced, translocation-related sarcoma. *Diagnostic Pathology*. 2016;11(1):1.
56. Khin Thway, Wang J, Swansbury J, Min T, Fisher C. Fluorescence in situ hybridization for MDM2 amplification as a routine ancillary diagnostic tool for suspected well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas: experience at a tertiary center. *Sarcoma*. 2015:2015.
57. Patrick L. Ware, MD Anthony N. Snow, MD Maya Gvalani Mark J. Pettenati, PhD Shadi A. Qasem, MD *MDM2* Copy Numbers in Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma: Characterizing Progression to High-Grade Tumors 2014
58. Kossivi Dantey, Karen Schoedel, Oleksandr Yergiyev, David Bartlett, Uma N M Rao Correlation of histological grade of dedifferentiation with clinical outcome in 55 patients with dedifferentiated liposarcomas ,2017
59. F. Hammedi A. Trabelsi S. Ben Abdelkrim C. Ouni Essalhi O. Ben Abdallah A. Ben Abdelkader M. Mokni Les liposarcomes : particularités anatomocliniques et évolutives,2011
60. J. Fayette J.-Y. Blay. Les sarcomes des tissus mous : prise en charge multidisciplinaire et nouveaux concepts ,*Rev Med Suisse*; volume 1. 1827,2005
61. Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Franke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 1987 ; 13 : 235-44.
62. Haines DS. The mdm2 proto-oncogene. *Leuk Lymphoma* 1997 ; 26 : 227-38.
63. Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991 ; 10 : 1565-9.
64. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998 ; 26 : 3453-9

65. Landers JE, Cassel SL, George DL. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 3562–8.
66. Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, et al. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998 ; 16 : 1603–10.
67. Olson DC, Marechal V, Momand J, Chen J, Romocki C, Levine AJ. Identification and characterization of multiple mdm2 proteins and mdm2-p53 protein complexes. *Oncogene* 1993 ; 8 : 2353–60.
68. May P, Soussi T. Le suppresseur de tumeur p53. *Path Biol* 1997 ; 45 : 781–4.
69. Grossman SR, Perez M, Kung AL, et al. P300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998 ; 2 : 405–15.
70. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* 1993 ; 12 : 461–8.
71. Kimura H1, Dobashi Y, Nojima T, Nakamura H, Yamamoto N, Tsuchiya H, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Oyama T,.Utility of fluorescence in situ hybridization to detect MDM2 amplification in liposarcomas and their morphological mimics.2013
72. Jour G, Gullet A, Liu M, Hoch BL. Prognostic relevance of Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer grade and MDM2 amplification levels in dedifferentiated liposarcoma: a study of 50 cases. *Mod Pathol*. 2015;28:37-47.
73. Binh MB1, Sastre-Garau X, Guillou L, de Pinieux G, Terrier P, Lagacé R, Aurias A, Hostein I, Coindre JM. MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data.2005

74. Naofumi Asano, Akihiko Yoshida, Sachiyo Mitani, Eisuke Kobayashi, Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/dedifferentiated liposarcoma, Keio University, Japan 2017.
75. Louati Sara, Senhaji Nadia, Sekal Mohamed, Chbani Leïla, Hind elfatemi, Boujraf said, Ouldime Karim, Bennis Sanae, Molecular pathology platform in a university hospital Hassan 2 university hospital Fez experience. 2018
76. Sirvent N, Coindre J-M, Maire G, Hostein I, Keslair F, Guillou L, et al. Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. *Am J Surg Pathol*. Oct 2007;31(10):1476-89.
77. EDWARDS RH, CHATTEN J, XIONG QB, BARR FG. Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of archival samples. *Diagn Mol Pathol* 1997, 6 : 91-7.
78. Kurtz JE, Blay JY1,2, Soibinet P3, Penel N4, Bompas E5, Duffaud F6, Stoeckle E7, Mir O8, Adam J8, Chevreau C9, Bonvalot S8,10, Rios M11, Kerbrat P12, Cupissol D13, Anract P14, Gouin F15, , Lebbe C17, Isambert N18, Bertucci F19, Toumonde M7, Thyss A20, Piperno-Neumann S10, Dubray-Longeras P21, Meeus P1,2, Ducimetière F1,2, Giraud A7, Coindre JM7, Ray-Coquard I1,2, Italiano A7, Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients. Le Cesne A8; NETSARC/RREPS and French Sarcoma Group-Groupe d'Etude des Tumeurs Osseuses (GSF-GETO) networks. 2017



أطروحة رقم 19/144

سنة 2019

# مساهمة البيولوجيا الجزيئية في تشخيص السرcoma الشحمية المتمايزة و المتباينة (بصدد 47 حالة)

## الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2019/07/11

## من طرف

السيدة بن معاشو هاجر

المزداة في 1994/09/13 بسيدي قاسم

## لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

## الكلمات الأساسية

السرcoma الشحمية - الكيمياء الهيستولوجية المناعية - FISH - MDM2 - CDK4

## اللجنة

الرئيس	..... السيد المرزوقي الزروالي امين أستاذ مبرز في علم الجروح والتجبير
المشرف	..... السيدة سناء بنيس أستاذة مبرزة في بيولوجيا الخلية
عضو	..... السيدة سميرة الفقير أستاذة في علم الأوبئة السريري
عضو مشارك	..... السيد محمد سقال أستاذ مساعد في علم الأنسجة والأجنة وعلم مولدات الخلايا