



Étude génomique et fonctionnelle de la dérégulation du gène HMGA2 dans les tumeurs adipocytaires

Esma Saada Saada-Bouزيد

► To cite this version:

Esma Saada Saada-Bouزيد. Étude génomique et fonctionnelle de la dérégulation du gène HMGA2 dans les tumeurs adipocytaires. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4000 . tel-01146865

HAL Id: tel-01146865

<https://theses.hal.science/tel-01146865>

Submitted on 29 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA-ANTIPOLIS

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Par

Mme Esma SAADA-BOUZID

Le 05/02/2015

Titre :

Etude génomique et fonctionnelle de la dérégulation

du gène *HMG2*

dans les tumeurs adipocytaires.

JURY :

Pr Antoine THYSS

Président

Pr Anne GOMEZ-BROUCHET

Rapporteur

Dr Edith CHEVRET

Rapporteur

Pr Nicolas SIRVENT

Examineur

Dr Laurence BIANCHINI

Directeur

Pr Florence PEDEUTOUR

Directeur

REMERCIEMENTS

Je voudrais avant tout commencer par remercier **mes directrices de thèse**.

A Laurence Bianchini qui m'aura accompagné dès mes débuts trébuchants dans le laboratoire. Tu auras su m'initier aux finesses de la rigueur scientifique, tant dans l'expérimentation pratique que l'écriture scientifique. Merci pour ta disponibilité, ton accueil et ton encadrement chaleureux.

A Florence Pedetour auprès de qui j'aurai commencé à mesurer les mystères de la génétique des tumeurs. Je tenais à vous remercier pour votre rigueur et vos conseils dans l'orientation de ces travaux.

Un très grand merci à toute l'équipe du **Laboratoire de génétique des Tumeurs solides de Nice**.

A Annie qui aura été une grande sœur pendant ces années et qui restera une amie précieuse.

A Fred pour ton honnêteté et ta bonne humeur contagieuse.

A Valérie pour ton écoute et tes conseils.

A Audrey pour sa relecture de tant de lames.

A Thibault pour son impressionnante efficacité.

A Julie pour son aide bienveillante.

A Roger pour son aide si bienvenue en informatique.

A Annabelle pour sa patience et sa disponibilité.

Un merci également à **mes collègues médecins** qui auront su me laisser la place et le temps pour mener à bien ces travaux.

A Monsieur le Pr Thyss. Merci pour votre confiance et votre soutien toujours renouvelés.

Merci à l'ensemble des membres du Groupe Sarcome Français et aux anatomopathologistes du Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères Sarcomes pour leur disponibilité et leur enthousiasme.

Merci à Emmanuel Chamorey et Jocelyn Gal pour leur aide bienvenue en statistiques.

Enfin, merci à toutes les personnes qui ont cru en moi et m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Aux miens.

LISTE DES ABREVIATIONS

3'UTR	3'UnTranslated Region
5'UTR	5'UnTranslated Region
18FDG	18-FluoroDeoxyGlucose
aa	acide aminé
ACOT11	Acyl-coenzyme A thioesterase 11
AIP	Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein
AP1	complexe adaptateur pour la clathrine AP1
C11orf95	Chromosome 11 open reading frame 95
CDK4	Cyclin D Kinase 4
CDKN2A	Cyclin Dependent kinase inhibitor 2A
CGH	Hybridation Génomique Comparative
CMS	Chromosome Marqueur Surnuméraire
COL1A2	Collagen type I alpha 2
CXCR7	C-X-C chemokine Receptor type 7
DDIT3	DNA Damage Inducible Transcript 3
E2F1	E2F transcription factor 1
EBF	Early B-cell Factor
EWSR1	EWing Sarcoma breakpoint Region 1
18-FDG	18-FluoroDeoxyGlucose
FHIT	Fragile Histidine Triad protein
FISH	Hybridation In Situ en Fluorescence
FLI1	Friend Leukemia virus Integration 1
FRS2	Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2
FUS	FUsed in Sarcoma gene
GIST	Tumeur Stromale GastroIntestinale
HAS2	Hyaluronan Synthase 2
HEI10	Human Enhancer of Invasion-10
HES	Haematoxylin Eosine Safran
HMG	High Mobility Group
HMGA1	High Mobility Group A1
HMGA1a	High Mobility Group A1a
HMGA1b	High Mobility Group A1b
HMGA1c	High Mobility Group A1c
HMGA2	High Mobility Group A2
HMGB	High Mobility Group B
HMGI-C	High Mobility Group I-C
HMGI-Y	High Mobility Group I-Y
HMGN	High Mobility Group N
IHC	Immunohistochimie
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LBD	Liposarcome Bien Différencié
LDD	Liposarcome Dédifférencié
LEMD3	LEM Domain containing 3
LHFP	Lipoma HMGIC Fusion Partner
LINE-1	Long Interspersed Elements-1
LPP	Lipoma Preferred Partner
LPS	Liposarcome
LSMB	Lipomatose Symétrique Multiple Bénigne
MAP3K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5

MDM2	Mouse Double Minute 2 homologue
MEN1	Multiple Endocrine Neoplasia 1
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
miARN	microARN
MKL2	Myocardin-Like 2
NEM1	Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1
NFIB	Nuclear Factor I/B
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-Rhino-Laryngé
PDGFRA	Platelet Derived Growth factor Receptor A
PIT1	Pituitary specific Transcription factor 1
PLAG1	Pleiomorphic Adenoma Gene 1
PPAP2BA	Phosphatidic Acid Phosphatase type 2A
PPAP2B	Phosphatidic Acid Phosphatase type 2B
PPAP2BC	Phosphatidic Acid Phosphatase type 2C
PPAR α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor α
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PPARGC1A	Peroxisome Proliferator Activated Receptor GC1A
RAD51B	RAD51 paralog B
RRePS-TMV	Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des Tissus Mous et des Viscères
RT-PCR	Réaction par la polymérase en chaîne après transcription inversée
SAHFs	Senescence Associated Heterochromatic Foci
TA	Tumeur Adipocytaire
TDM	TomoDensitoMétrie
TLA	Tumeur Lipomateuse Atypique
TM	Tumeur Mésenchymateuse
UCP1	UnCoupling protein 1
YEATS 4	YEATS domain containing protein 4

TABLE DES MATIERES

1-INTRODUCTION	p.8
1-1. Les tumeurs adipocytaires	p.8
1-1-1. Les tumeurs adipocytaires bénignes	p.11
a) Les lipomes	p.11
b) L'hibernome	p.15
c) Le lipoblastome	p.16
1-1-2. Les lipomatoses	p.18
1-1-3. Les tumeurs adipocytaires malignes	p.20
a) Les tumeurs lipomateuses atypiques- les liposarcomes bien différenciés	p.20
b) Les liposarcomes dédifférenciés	p.23
c) Les liposarcomes myxoïdes	p.27
d) Les liposarcomes pléomorphes	p.28
1-2. HMGA2	p.32
1-2-1. Structure des HMGA	p.32
1-2-2. Interactions des protéines HMGA avec la chromatine	p.36
1-2-3. HMGA, développement embryonnaire et croissance des mammifères	p.36
1-2-4. HMGA et tumorigénèse	p.38
1-2-5. HMGA : des supresseurs de tumeurs	p.41
1-2-6. HMGA et adipogénèse	p.41
1-2-7. Remaniements structurels et numériques de <i>HMGA2</i>	p.44
2-TRAVAUX DE RECHERCHE	p.48
2-1. Etat du sujet de recherche à mon arrivée dans le laboratoire	p.48
2-2. Rôle de <i>HMGA2</i> et de ses partenaires de fusion dans la tumorigénèse des lipomes	p.51

Article 1

A. Pierron, C. Fernandez, **E. Saâda**, F. Keslair, G. Hery, H. Zattara, F. Pedetour. *HMGA2-NFIB* fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of *NFIB* alteration in a large deep-seated adipocytic tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Nov;195(1):66-70.

Article 2

L. Bianchini, L. Birtwisle, **E. Saâda**, A. Bazin, E. Long, J-F. Roussel, J-F. Michiels, F. Forest, C. Dani, O. Myklebost, I. Birtwisle-Peyrottes, F. Pedetour. Identification of *PPAP2B* as a Novel Recurrent Translocation Partner Gene of *HMGA2* in Lipomas. *Genes Chromosomes and Cancer*, 2013. Jun;52(6):580-90.

2-3. Place des microARN *let-7* dans la régulation de *HMGA2* dans les tumeurs adipocytaires **p.55**

Article 3

L. Bianchini, E. Saâda, E. Gjernes, M. Marty, J. Haudebourg, I. Birtwisle-Peyrottes, F. Keslair, B. Chignon-Sicard, E. Chamorey, F. Pedeutour. *Let-7* MicroRNA and *HMGA2* levels of expression are not inversely linked in adipocytic tumors: Analysis of 56 lipomas and liposarcomas with molecular cytogenetic data. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Jun;50(6):442-55.

Article 4

E. Saâda, L. Bianchini, J. Mouroux, B. Padovani, M. Yver, F. Pedeutour. *HMGA2* not rearranged but overexpressed and associated with inhibition of *let-7* expression in a first description of genetic analysis in diffuse lipomatosis. *Histopathology*. 2012 Sep;61(3):519-22.

2-4. Place de l'amplification de *HMGA2* dans la biologie des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés **p.62**

Article 5

E. Saâda, F. Burel-Vandenbos, D. Ranchère-Vince, I. Birtwisle-Peyrottes, B. Chetaille, C. Bouvier, M-C. Château, M. Peoc'h, M. Battistella, J-M. Coindre, A. Bazin, J. Gal¹³, J-F. Michiels, F. Pedeutour, L. Bianchini. Prognostic value of *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. Soumis à *Modern Pathology*.

3-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **p.66**

4-RESUME **p.71**

5-REFERENCES **p.73**

1-INTRODUCTION

1-1.Les tumeurs adipocytaires

Les tumeurs mésenchymateuses

Les tumeurs mésenchymateuses (TM), dont font partie les tumeurs adipocytaires, constituent un groupe très hétérogène de néoplasies des tissus dérivés du mésoderme. Les TM malignes, ou sarcomes, sont beaucoup plus rares que les carcinomes puisqu'elles représentent moins de 1% des cancers de l'adulte. Elles comprennent plus de 50 sous types histologiques recensés, de localisations anatomiques très variées. Ainsi, le diagnostic et la prise en charge des TM nécessitent-ils une expertise particulière. Malgré les avancées thérapeutiques qui ont été réalisées ces dernières années, le diagnostic de sarcome des tissus mous est souvent synonyme de survie engagée. Alors que la majorité des sarcomes diagnostiqués à un stade précoce sont curables, on estime qu'actuellement 40% des adultes chez lesquels un sarcome des tissus mous est diagnostiqué mourront de leur sarcome (DeSantis, Lin et al. 2014). Le diagnostic histologique des sarcomes est si particulier qu'il fait l'objet de recommandations spécifiques. En France il est indiqué depuis le 1^{er} janvier 2010 que tous les cas de sarcomes des tissus mous doivent faire l'objet d'une double lecture dont une sera effectuée par un anatomopathologiste référent du Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes des Tissus Mous et des Viscères (RRePS-TMV) (action 20.3 Plan Cancer 2009-2013). Cependant, l'analyse microscopique, même complétée par de l'immunohistochimie (IHC), ne suffit pas toujours à distinguer certaines entités entre elles. Ceci concerne d'une part les tumeurs très bien différenciées qui sont parfois difficilement distinguées des tumeurs bénignes dérivées du même tissu et d'autre part les tumeurs indifférenciées pour lesquelles le diagnostic différentiel s'étend des sarcomes de haut grade à certains carcinomes, dysembryomes ou lymphomes très peu différenciés. La connaissance de la biologie et des dérégulations génétiques des TM, bénignes et malignes, a permis d'affiner leur diagnostic et d'apporter dans certains cas une information pronostique et/ou prédictive de l'efficacité d'un traitement. Les TM ont été les premières parmi les tumeurs solides à bénéficier de l'apport des études cytogénétiques et moléculaires. Celles-ci ont permis de définir trois groupes de TM selon leurs caractéristiques cytogénétiques : -i) les tumeurs mésenchymateuses à caryotype simple, le plus souvent un caryotype de mode diploïde associé une anomalie de structure chromosomique, souvent une translocation ; -ii) les TM définies par un caryotype un peu plus complexe mais caractérisées par des amplifications géniques spécifiques ; -iii) un troisième groupe de tumeurs aux anomalies de nombre et de structure très complexes. L'analyse du caryotype de ces tumeurs a permis d'identifier des anomalies chromosomiques de nombre

(aneuploïdies : chromosomes surnuméraires normaux ou anormaux, perte d'un ou plusieurs chromosomes et aussi anomalies de la ploïdie) et des anomalies de structure (translocation, inversion...) caractéristiques. Au cours des années 1990, les techniques de cytogénétique moléculaire et de biologie moléculaire, comme l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) et la réaction par la polymérase en chaîne après transcription inversée (RT-PCR) ont permis d'identifier les gènes de fusion résultant de translocations ou d'inversions puis de les rechercher directement en routine, sans nécessiter la pratique toujours aléatoire de la réalisation d'un caryotype tumoral. Le modèle du sarcome d'Ewing illustre bien cette évolution. Alors que les premières anomalies caryotypiques ont été caractérisées en 1984 avec la découverte de la t(11 ;22)(q24 ;q12)(Aurias, Rimbaut et al. 1984, Turc-Carel, Philip et al. 1984), le gène de fusion *EWSR1-FLI1* a pu être mis en évidence grâce aux avancées des techniques de biologie moléculaire en 1992(Delattre, Zucman et al. 1992) pour aboutir à une caractérisation de ces anomalies en routine par FISH ou RT-PCR sur bloc de paraffine dans le début des années 2000 (Hisaoka, Tsuji et al. 1999, Kumar, Pack et al. 1999). Ces gènes de fusion ont été identifiés aussi bien dans des TM bénignes (lipomes, lipoblastomes, tumeurs myofibroblastiques inflammatoires...) que dans certains sarcomes (rhabdomyosarcomes alvéolaires, liposarcomes myxoïdes, dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand...). Les anomalies génomiques quantitatives (gain, amplification, délétion) ont été également plus facilement identifiées grâce aux techniques de FISH et PCR lorsque l'anomalie ciblée concernait une partie limitée du génome ou plus tard par la technique d'hybridation génomique comparative (CGH) qui permet une analyse quantitative pan-génomique. Le troisième groupe de sarcomes (fibrosarcomes, ostéosarcomes, angiosarcomes...) est pour l'heure moins bien connu moléculairement mais a bénéficié récemment de l'apport des techniques d'analyse du génome plus modernes telles que l'étude des profils d'expression (transcriptome) ou de séquençage à haut débit de nouvelle génération (next generation sequencing, NGS).

Les tumeurs adipocytaires, ou tumeurs adipeuses : une grande diversité

Les tumeurs adipocytaires (TA) sont des TM dérivées du tissu adipeux et sont très majoritairement des tumeurs bénignes. Les TA bénignes sont principalement représentées par les lipomes. Elles comprennent aussi des tumeurs plus rares, les hibernomes et les lipoblastomes. Les TA malignes appelées liposarcomes (LPS) sont composées de 4 sous-groupes : -1) les Tumeurs Lipomateuses Atypiques (TLA) et les LPS bien différenciés (LBD) ; -2) les LPS dédifférenciés (LDD) ; -3) Les LPS myxoïdes et à cellules rondes ; -4) les LPS pléomorphes.

Les lipomes étant les tumeurs bénignes les plus fréquentes chez l'homme, les TA occupent une place majoritaire parmi les TM. De plus, les LPS constituent le sous groupe de sarcomes des tissus mous (non tumeur stromale gastrointestinale ou GIST) le plus fréquent. Les TA bénignes ne sont qu'exceptionnellement une menace pour la survie. Leurs caractéristiques de taille ou de

localisation engageant parfois un pronostic fonctionnel. Leur prise en charge consiste donc le plus souvent en une simple surveillance et parfois en une résection chirurgicale pour des raisons esthétiques pour les lipomes ordinaires et une résection chirurgicale systématique pour les lipomes dits « atypiques », les hibernomes et les lipoblastomes. *A contrario*, les LPS, s'ils ne sont pas pris en charge précocement, engageant très souvent le pronostic vital. Le plus souvent diagnostiqués à un stade localisé ou localement avancé, leur traitement consiste en une résection chirurgicale en bloc parfois suivie de radiothérapie pour les tumeurs de haut grade et/ou en résection non carcinologiquement saine. La chimiothérapie cytotoxique (essentiellement la doxorubicine) n'a que peu d'effets sur les LPS non accessibles à un traitement chirurgical (non opérables ou métastatiques)(Italiano, Toulmonde et al. 2012).

Génétique des tumeurs adipocytaires

Les TA, bénignes et malignes, sont caractérisées par des anomalies cytogénétiques récurrentes qui sont aujourd'hui utiles au diagnostic. De manière fortuite ou au contraire en raison d'un déterminisme fonctionnel non encore élucidé, plusieurs anomalies de différents types de TA, lipomes ordinaires, TLA/LBD, LDD et LPS myxoïdes, sont concentrées sur une région du bras long du chromosome 12 comprise entre les bandes q13 et q15.

En effet, une majorité de lipomes sont porteurs d'une translocation impliquant la région 12q14 avec point de cassure dans la région du gène *HMGA2* (*High Mobility Group A2*)(12q14.3)(Bartuma, Hallor et al. 2007, Bartuma, Panagopoulos et al. 2009). Les TLA/LBD et LDD sont eux caractérisés par une amplification de la région 12q14-15(Pedeutour, Forus et al. 1999, Barretina, Taylor et al. 2010) impliquant de manière constante le gène *MDM2* (*Mouse Double Minute 2 homologue*)(12q15) et fréquemment le gène *CDK4* (Cyclin D Kinase 4) (12q14.1)(Italiano, Bianchini et al. 2009), alors que les LPS myxoïdes présentent des translocations avec point de cassure dans le gène *DDIT3* (*DNA damage inducible transcript 3*) (12q13.3)(Goransson, Elias et al. 2005). Alors que la détection de ces anomalies est d'une aide précieuse au diagnostic et indirectement à une prise en charge adaptée, aucune anomalie cytogénétique des LPS n'est actuellement prédictive de l'efficacité d'un traitement.

L'un des principaux axes de recherche de notre laboratoire est la caractérisation cytogénétique et moléculaire de ces TA bénignes et malignes afin d'identifier de nouveaux marqueurs diagnostiques, pronostiques mais également de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Peu avant de débiter ce travail de thèse, notre équipe venait de montrer que le gène *HMGA2* était remanié non seulement dans les lipomes ordinaires, mais également remanié et amplifié dans les TLA/LBD et LDD (Italiano, Bianchini et al. 2008, Italiano, Bianchini et al. 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que *HMGA2* pouvait être un gène clé dans la biologie des TA. Nous avons par conséquent poursuivi nos efforts de caractérisation cytogénétique et moléculaire des TA

en ciblant notre attention sur le rôle des dérégulations de *HMGA2* dans la tumorigenèse adipocytaire.

1-1-1. Les tumeurs adipocytaires bénignes

a) Les lipomes

Présentation clinique

Les lipomes sont les tumeurs bénignes les plus fréquentes chez l'homme (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013). Il s'agit de tumeurs composées d'adipocytes matures qui peuvent être diagnostiquées à tout âge (Salam 2002, Kidambi, Been et al. 2012), mais qui le sont le plus souvent entre 40 et 60 ans, et dans les deux sexes, avec une discrète prédominance féminine pour les lipomes isolés et une prédominance masculine pour les lipomes multiples. Le diagnostic est uniquement clinique pour les formes les plus fréquentes, c'est-à-dire une tuméfaction sous cutanée souple, asymptomatique et de croissance nulle ou lente. Ces tumeurs sont le plus souvent uniques. Toutefois, environ 5% des patients présentent de multiples lipomes, généralement idiopathiques. Plus rarement les lipomes multiples s'intègrent dans des syndrome génétiques (Salam 2002), tels que la lipomatose mésosomatique de Roch-Léri, lipomatose familiale de transmission autosomique dominante (nombreux petits lipomes superficiels présents sur le tiers moyen du corps, les avant-bras, la périphérie du tronc, les racines des cuisses (Ronan and Broderick 2000)), les néoplasies endocriniennes multiples de type 1 (Thakker, Newey et al. 2012), le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (Lynch, Lynch et al. 2009), ou le syndrome de Protée (Nguyen, Turner et al. 2004). Des lipomes multiples peuvent également être observés dans le syndrome de Gardner (ou polypose adénomateuse familiale, maladie de transmission autosomique dominante résultant d'une mutation du gène APC (Gomez Garcia and Knoers 2009). L'apparition de lipomes multiples peut également être associée à des rétinoblastomes (Woo and Harbour 2010) ou à des mutations somatiques de *PDGFRA* (*Platelet Derived Growth factor Receptor A*)(Pasini, Matyakhina et al. 2007). Enfin, certains traitements tels que les antirétroviraux (Balestreire, Haught et al. 2007) utilisés pour le traitement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine ou encore la chimiothérapie cytotoxique (Cronin, Myers et al. 2010, Bracaglia, D'Ettorre et al. 2014) peuvent induire l'apparition de lipomes.

Les lipomes sont majoritairement superficiels, bien limités et asymptomatiques. Les lipomes profonds (Billing, Mertens et al. 2008, Italiano, Ebran et al. 2008), intra-musculaires ou localisés au niveau des tendons, qui sont souvent de plus grande taille que les lipomes superficiels, peuvent causer des gênes fonctionnelles et cosmétiques.

La physiopathologie des lipomes est peu connue. Il a été évoqué des mécanismes pro-inflammatoires en réponse à des traumatismes contondants (Galea, Penington et al. 2009) aigus ou

chroniques. Des données pré-cliniques tendent à valider cette hypothèse (Djian, Roncari et al. 1983, Kirkland, Hollenberg et al. 1996, Thomas, Hemmrich et al. 2008) pour une entité appelée «pseudo-lipomes».

Anatomopathologie

L'aspect macroscopique est celui d'une tumeur jaune bien délimitée (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013). L'analyse microscopique des lipomes dits « ordinaires » retrouve des lobules d'adipocytes matures (figure 1A). Ces lipomes ordinaires représentent la grande majorité des lipomes et ne sont généralement pas sources de difficultés diagnostiques. Moins fréquemment, mais de manière non exceptionnelle, le pathologiste peut être confronté à divers lipomes variants ou « remaniés », dont l'examen doit être attentif afin de ne pas ignorer une tumeur maligne et notamment un LPS. En effet, il peut être observé des contingents osseux (ostéolipomes), cartilagineux (chondrolipomes) ou fibreux (fibrolipomes). Les lipomes intra-musculaires peuvent être bien délimités ou au contraire enchâssés au sein des fibres musculaires striées. Les lipomes des tendons ou « *lipoma arborescens* » montrent une infiltration diffuse de l'espace sous-synovial des tissus conjonctifs. Les angiolipomes sont des tumeurs superficielles qui associent des adipocytes matures à des petits capillaires à paroi fine, dont certains contiennent des thrombi de fibrine (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013). Les myolipomes sont des tumeurs souvent volumineuses et de localisation plutôt profonde et sont composés de tissu adipeux mature et de muscle lisse. Les lipomes à cellules fusiformes associent tissu adipeux mature et des cellules fusiformes. Le diagnostic différentiel avec un LPS à composante fusocellulaire est parfois difficile. Contrairement aux tumeurs malignes, les lipomes à cellules fusiformes se présentent sous la forme de lésions circonscrites parfois encapsulées, d'évolution lente, indolore, situées en région sous-cutanée, le plus souvent au niveau des régions postérieures du cou et des épaules. L'analyse immunohistochimique montre un marquage positif de CD34 au niveau des cellules fusiformes qui sont par ailleurs négatives pour le marquage de S100. Le lipome pléomorphe est une variante du lipome à cellules fusiformes. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont similaires à l'exception de cellules géantes plurinucléées (« *floret cells* »), et parfois de pseudo-lipoblastes. A noter qu'il existe un continuum morphologique entre les lipomes à cellules fusiformes et les lipomes pléomorphes. La classification histologique des sous-groupes de lipomes n'a pas de conséquence pronostique, la récurrence des lipomes étant exceptionnelle (1 cas sur les 215 lipomes profonds de la série de Billing et al. 2008 (Billing, Mertens et al. 2008)).

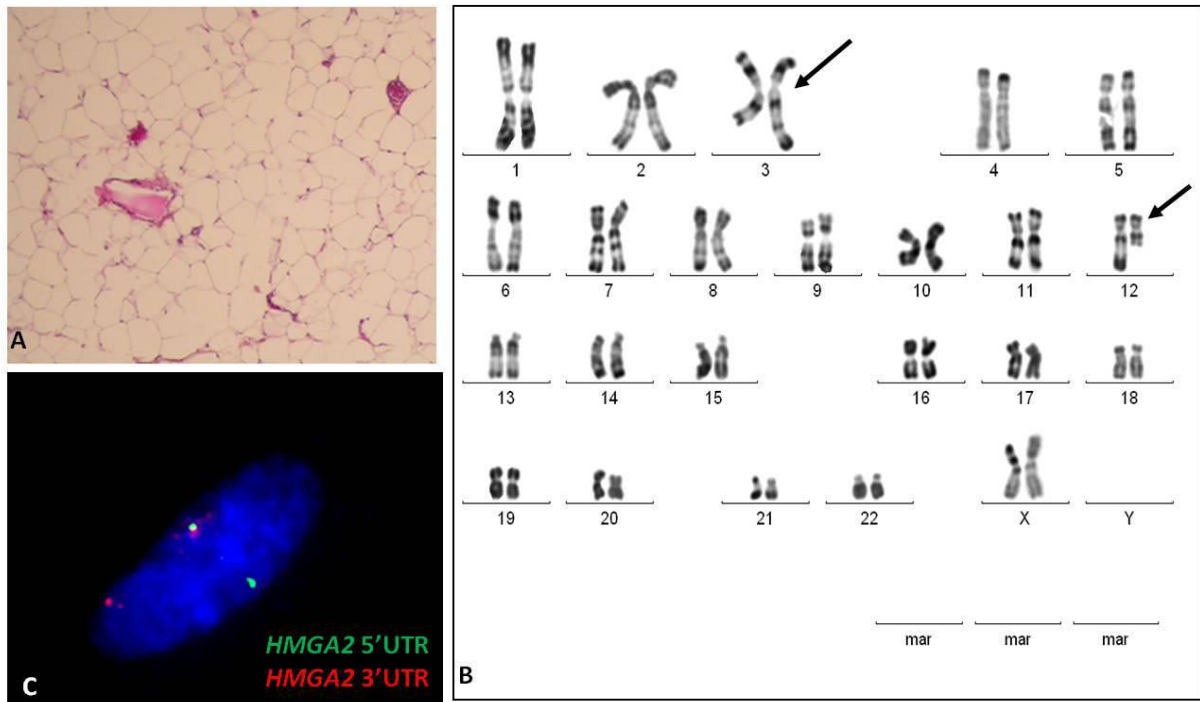
Cytogénétique et génomique des lipomes

L'analyse systématique des caryotypes des lipomes a permis de mettre en évidence de nombreuses anomalies (Bartuma, Hallor et al. 2007). Bien que cette analyse ait concerné en majorité des lipomes profonds et/ou volumineux, il a été possible de définir quatre sous-groupes

cytogénétiques i) les lipomes avec altérations génomiques du bras long du chromosome 12 (12q13-15) qui correspondent à environ deux tiers des lipomes (figure 1B) ; ii) les lipomes avec perte partielle ou totale du bras long du chromosome 13 (13q) qui représentent environ 10% des lipomes ; iii) les lipomes avec altérations du bras court du chromosome 6 (6p21-23) qui représentent environ 5% des lipomes ; iv) les lipomes avec d'autres altérations génomiques ou avec un caryotype normal.

L'analyse par FISH a permis de mettre en évidence des anomalies qui étaient non détectables par les techniques de cytogénétique conventionnelle. Ainsi, près de deux tiers des lipomes à caryotype apparemment anormal contiennent en réalité une anomalie, le plus souvent une translocation, de la région 12q13-15 et plus précisément au niveau du gène *HMGA2* (12q14.3) (figure 1C). Les lipomes avec délétion 13q sont soit des lipomes à cellules fusiformes (Bartuma, Nord et al. 2011) soit des lipomes ordinaires localisés au niveau des épaules et de la nuque. Pour les lipomes avec remaniements de la région 6p21-23, les points de cassure se situent au niveau du gène *HMGA1* (6p21) (Bartuma, Hallor et al. 2007, Wang, Zamolyi et al. 2010). On rappelle ici que l'amplification d'un gène est définie en FISH par la présence d'au moins 8 à 10 copies de ce gène, avec un nombre de centromère du chromosome sur lequel est situé le gène amplifié ne dépassant pas 2 ou 3, ou par CGH par un log ratio supérieur à 1,8. Le gain modéré est lui défini par la présence en FISH de 4 à 6 copies du gène, ou un log ratio compris entre 0,7 et 1,5 en CGH. Si un gain quantitativement important du gène *MDM2* a pu être décrit dans certaines tumeurs adipeuses bien différenciées étiquetées lipomes (Italiano, Cardot et al. 2007, Mandahl, Bartuma et al. 2011), il est vraisemblable que ces tumeurs soient des LBD depuis renommés TLA (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013). Notre équipe a décrit des lipomes avec gain modéré de gènes situés dans la région 12q13-15, en émettant l'hypothèse d'un possible continuum entre lipomes ordinaires et LBD (Italiano, Cardot et al. 2007). Les chondrolipomes sont caractérisés par une translocation récurrente particulière, t(11;16)(q13;p13) qui fait fusionner les gènes *C11orf95* (*chromosome 11 open reading frame 95*, 11q13) et *MKL2* (*myocardin-like 2*, 16p13.3). Il est à noter que *MKL2* code pour une protéine de liaison à l'ADN impliquée dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription alors que la fonction de la protéine codée par *C11orf95* n'est pas précisément connue (Huang, Sumegi et al. 2010). Le gène de fusion *C11orf95-MKL2* conserve les domaines de liaison à l'ADN de *MKL2*. Les lipomes à cellules fusiformes/pléomorphes ont des caryotypes souvent hypodiploïdes, associés à des pertes partielles multiples (Dahlen, Debiec-Rychter et al. 2003, Bartuma, Nord et al. 2011) et/ou une perte récurrente du chromosome 13 ou d'une partie du bras long de ce chromosome souvent associé à des délétions du chromosome 16.

Figure 1. Caractérisation morphologique et cytogénétique d'un lipome avec remaniement de *HMGA2*.



A-Aspect microscopique d'un lipome ordinaire (HES x100), composé d'adipocytes matures avec une faible variation de taille entre les cellules, absence d'atypies cyto-nucléaires, absence de lipoblastes. **B-** Caryotype féminin (Bande RHG) montrant une translocation entre le bras long d'un chromosome 3 (grande flèche) avec le bras long d'un chromosome 12 (petite flèche): 46,XX,t(3;12)(q28;q14.3). **C-** FISH interphasique sur une cellule de lipome ordinaire montrant un remaniement du gène *HMGA2* avec séparation des extrémités 5' et 3' du gène (sondes RP11-30I11 colorée en vert située en 5' et RP11-118B13 colorée en rouge située en 3'). La superposition des deux signaux rouge et vert correspond à l'allèle normal.

b) L'hibernome

Présentation clinique

Le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc constituent les deux sous-types de tissu adipeux chez les mammifères. Chez l'Homme, le tissu adipeux brun est présent chez les nouveau-nés et tend à disparaître ensuite. La fonction du tissu adipeux brun est d'assurer, grâce à la lipolyse de ses adipocytes, la thermogénèse chez les nouveau-nés qui ne sont pas encore capables de frissonner. Contrairement aux adipocytes blancs qui ont une vacuole lipidique unique, les adipocytes bruns contiennent de nombreuses vacuoles plus petites et un nombre beaucoup plus élevé de mitochondries riches en fer, ce qui donne au tissu sa couleur brune. Le tissu adipeux brun est également beaucoup plus richement vascularisé que le tissu adipeux blanc.

L'hibernome est une tumeur bénigne du tissu adipeux brun. A ce jour, il n'a jamais été décrit de tumeur maligne du tissu adipeux brun. L'hibernome se présente comme une tumeur bien encapsulée et richement vascularisée, composée de tissu adipeux brun et de tissu adipeux blanc dans des proportions variables selon les tumeurs. Il s'agit d'une tumeur très rare, qui représente 1% de l'ensemble des tumeurs du tissu adipeux. L'hibernome est diagnostiqué chez des adultes jeunes entre la 3^e et la 4^e décennie, et plus souvent chez l'homme que chez la femme (Furlong, Fanburg-Smith et al. 2001). L'hibernome se développe dans certaines parties du corps où persisteraient des ilots de graisse brune (dans l'ordre décroissant d'incidence, le membre inférieur et notamment la cuisse, le tronc, le membre supérieur, la sphère ORL, le rétropéritoine)(Furlong, Fanburg-Smith et al. 2001). Il se présente sous la forme d'une tumeur lentement évolutive, mobile, indolore, souvent sous-cutanée parfois intra-musculaire. Rarement, une taille plus volumineuse ou un effet de compression sur des organes avoisinants peut faire hésiter avec une TM maligne d'autant plus que l'imagerie conventionnelle (tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM)) mettent en évidence des septa non adipeux et une vascularisation serpiginieuse. En particulier, la TDM objective une atténuation intermédiaire entre celle du tissu adipeux et celle du tissu musculaire strié. Le caractère richement vascularisé de ces tumeurs se traduit par un fort rehaussement par l'injection de produit de contraste (Craig, Fanburg-Smith et al. 2009) ainsi que par une fixation intense du 18-Fluoro DeoxyGlucose (FDG) en imagerie métabolique (Smith, Teruya-Feldstein et al. 2008).

Anatomopathologie

L'aspect macroscopique est celui d'une tumeur lobulée, bien démarquée, d'une couleur qui varie du jaune foncé au brun-rouge, avec un aspect graisseux, souple et spongieux visible sur la tranche de section (Furlong, Fanburg-Smith et al. 2001). L'aspect microscopique est celui de cellules adipeuses du tissu adipeux brun avec des vacuoles multiples, un cytoplasme granuleux, un petit

noyau central. Les mitoses ou atypies cytologiques sont inhabituelles mais ne doivent pas faire revenir sur le caractère bénin de ces tumeurs.

Cytogénétique et génomique des hibernomes

La quasi-totalité des hibernomes ont un caryotype avec un point de cassure en 11q13 (Mertens, Rydholm et al. 1994, Gisselsson, Hoglund et al. 1999, Maire, Forus et al. 2003). Ces anomalies correspondent à des délétions interstitielles sur le bras long du chromosome 11 et couvrent des régions qui contiennent des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *MEN1* (Multiple Endocrine Neoplasia 1) à ou *AIP* (Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein)(Nord, Magnusson et al. 2010). Le gène *MEN1* est un gène suppresseur de tumeur qui code pour la menine, une protéine qui intervient dans la régulation transcriptionnelle et le maintien de la stabilité du génome. *MEN1* est muté et inactivé dans le syndrome de néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1) qui est un syndrome héréditaire, transmis sur un mode autosomique dominant et qui prédispose à la survenue de tumeurs endocriniennes bénignes de l'anté-hypophyse (adénomes hypophysaires, prolactinomes), des glandes parathyroïdes (adénome parathyroïdien) et du pancréas (gastrinomes, insulinomes). D'autres tumeurs ont été décrites dans ce syndrome, incluant d'autres tumeurs endocriniennes (corticosurrénalomes, tumeurs carcinoïdes des bronches, du tube gastro-intestinal ou du thymus) mais également des tumeurs bénignes du tissu mésenchymateux(Thakker, Newey et al. 2012, Vashi, Hunt et al. 2012) tels des angiofibromes et des collagénomes ainsi que des tumeurs bénignes du tissu adipeux, lipomes(Rusconi, Valtorta et al. 2011, Li, Zeng et al. 2012) et hibernomes(Hedayati, Thway et al. 2014). Le gène *AIP* est impliqué dans le syndrome familial d'adénome hypophysaire(Tichomirowa, Daly et al. 2009). Nord et al(Nord, Magnusson et al. 2010) décrivent ainsi sur une série de 15 hibernomes une perte d'expression très fréquente des deux gènes *MEN1* et *AIP* associée à une surexpression de gènes habituellement surexprimés dans le tissu adipeux brun : *PPARα* (peroxysome proliferator activated receptor α), *PPARγ*, *PPARGC1A*, et *UCP1* (UnCoupling Protein 1) pouvant expliquer le phénotype de ces tumeurs. Par ailleurs, les potentielles dérégulations de *HMGA2* dans les hibernomes on été très peu étudiées. Bartuma et al; rapportent la surexpression de *HMGA2* dans un seul cas sur les 5 hibernomes de leur série de TA publiée en 2009(Bartuma, Panagopoulos et al. 2009).

c) Le lipoblastome

Présentation clinique

Le lipoblastome est une tumeur bénigne du tissu adipeux composée de tissu embryonnaire. La grande majorité des cas est diagnostiquée avant l'âge de 3 ans, mais certains cas ont été rapportés chez le grand enfant ou l'adolescent (Coffin, Lowichik et al. 2009). Tumeur ubiquitaire, le lipoblastome est plus souvent localisé au niveau du tronc et des extrémités. Il se présente sous la

forme d'une tumeur superficielle bien délimitée, pouvant mimer un lipome, ou comme une tumeur plus profonde et infiltrante. De croissance lente, les lipoblastomes peuvent être à l'origine de compression d'organes et interférer avec leur fonction. Le lipoblastome ne s'accompagne jamais de localisation secondaire mais peut récidiver après exérèse.

Anatomopathologie

L'aspect macroscopique est celui d'une tumeur de taille moyenne, généralement comprise entre 2 et 5 cm. Des cas plus volumineux ont également été décrits et ne doivent pas faire remettre en cause le diagnostic (Lath, Familua et al. 2011, Jaroszewski and Petris 2013). Le lipoblastome se présente comme une masse souple, lobulée, jaune ou blanche parfois associée à des nodules myxoïdes, des parties kystisées ou sous forme de nodules adipeux séparés par une fine travée fibreuse apparente sur la tranche de section. L'aspect microscopique est celui d'un tissu à l'architecture lobulaire, avec des plages d'adipocytes séparées par des septa de tissu fibreux contenant des capillaires plexiformes; la composante adipocytaire peut couvrir un spectre large de maturation depuis la cellule mésenchymateuse primitive à l'adipocyte mature.

Cytogénétique et génomique des lipoblastomes

Le caryotype des lipoblastomes est pseudo- ou hyperdiploïde avec quelques remaniements de structure (Bartuma, Domanski et al. 2008) notamment au niveau du gène *PLAG1* (*Pleiomorphic Adenoma Gene 1*) localisé en 8q12.1 (Hibbard, Kozakewich et al. 2000). La fusion de *PLAG1* avec un gène partenaire (*HAS2-hyaluronan synthase 2*, *COL1A2-collagen type I alpha 2*, *RAD51L1*-gène qui code pour une protéine de réparation de l'ADN (Deen, Ebrahim et al. 2013), *RAB2A*-membre de la famille de l'oncogène *RAS* (Yoshida, Miyachi et al. 2014)) a pour conséquence une augmentation de la transcription de *PLAG1* et la synthèse de sa protéine. *PLAG1* est un facteur de transcription à doigt de zinc. L'augmentation du nombre de copies du gène serait un mécanisme annexe permettant la surexpression de cette protéine dans les lipoblastomes. Le remaniement structural de *PLAG1* a été mis en évidence dans des cellules adipocytaires de lipoblastomes de maturation variable, suggérant le caractère fondateur de cette anomalie au niveau d'une cellule progénitrice (Gisselsson, Hibbard et al. 2001). De manière intéressante, des remaniements de *PLAG1* ont également été décrits dans des tumeurs bénignes d'origine épithéliale telles que les adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Kandasamy, Smith et al. 2007, Bahrami, Dalton et al. 2012) ainsi que les myoépithéliomes de la peau et des tissus mous (Antonescu, Zhang et al. 2013). Les adénomes pléomorphes de la parotide sont également connus pour présenter des remaniements du gène *HMGA2* (Persson, Andren et al. 2009), les remaniements des gènes *HMGA2* et *PLAG1* étant le plus souvent exclusifs (Bahrami, Perez-Ordóñez et al. 2013). Notre équipe a également décrit un cas de lipoblastome avec remaniement de *HMGA2* sans remaniement de *PLAG1* (Pedeutour, Deville et al. 2012) apportant ainsi un argument supplémentaire pour un possible rôle interchangeable de ces deux gènes dans la genèse tumorale.

Ainsi, les deux gènes *HMGA2* et *PLAG1* sont la cible de remaniements non seulement dans les deux tumeurs adipocytaires bénignes, lipomes et lipoblastomes, mais également dans une autre entité, l'adénome pléomorphe des glandes salivaires. L'implication commune de ces deux gènes, de structure et fonction assez différentes n'est pas expliquée à ce jour.

1-1-2. Les lipomatoses

Présentation clinique

Le terme de lipomatose est utilisé dans la littérature pour deux entités distinctes :

- les lipomes multiples dont nous avons parlé plus haut,
- les lipomatoses non encapsulées qui correspondent à une hypertrophie diffuse du tissu adipeux. Cette pathologie fait partie du groupe complexe et hétérogène des lipodystrophies et est caractérisée par l'accumulation anormale de tissu adipeux non encapsulé sans association à une lipoatrophie (Vantyghem, Balavoine et al. 2012). Ici nous retiendrons le terme de lipomatose pour cette dernière entité. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une tumeur mais le caractère infiltrant de cette pathologie du tissu adipeux ainsi que sa propension à récidiver sont source d'inconfort voire de handicap pour les patients concernés. De plus, certains patients souffrent des séquelles de leurs chirurgies itératives. Les lipomatoses peuvent être localisées dans différentes régions de l'organisme telles que le tronc, l'extrémité d'un membre, le cou, l'abdomen, le pelvis ou encore l'intestin (McCarthy, Dorr et al. 1969, Grimmer, Hall et al. 1973, Klein, Smith et al. 1988, Greiss and Williams 1991).

On distingue la forme associée à des douleurs ou maladie de Dercum (*adiposis dolorosa*) de la lipomatose symétrique multiple bénigne (LSMB) aussi connue sous le nom de syndrome de Launois-Bensaude ou maladie de Madelung. La maladie de Dercum ou *adiposis dolorosa* est un syndrome décrit pour la première fois en 1888. Cette forme de lipomatose concerne aussi bien les patients obèses que non obèses et est caractérisée par une lipomatose sous-cutanée douloureuse. Elle atteint surtout les femmes et s'accompagne souvent de fatigue, parfois de troubles métaboliques selon l'extension de la lipomatose. La physiopathologie est ici encore mal connue (Yee, Phillips et al. 2012).

La LSMB est associée dans certains cas à des délétions de l'ADN mitochondrial (Klopstock, Naumann et al. 1994, Klopstock, Naumann et al. 1997). Des mutations somatiques de l'ADN mitochondrial ont également été identifiées chez des patients atteints du syndrome familial MERRF (Kobayashi, Nagao et al. 2010) qui associe épilepsie, myoclonie, ataxie et myopathie (myoclonic epilepsy with ragged red fibers ou maladie de Fukuharaou) (Berkovic, Andermann et al. 1991, Holme, Larsson et al. 1993, Larsson, Tulinius et al. 1995, Naumann, Kiefer et al. 1997, Austin, Vriesendorp et al. 1998) à d'autres syndromes métaboliques plus inconstants tels que l'hypertension

artérielle ou la LSMB. Le plus souvent elle est en lien avec une consommation excessive d'alcool. Les lipomatoses pourraient également être associées à un dysfonctionnement des vaisseaux du tissu adipeux (Vantighem, Balavoine et al. 2012).

La LSMB de type 1, dite forme classique ou pseudo-athlétique, est caractérisée par de multiples dépôts de graisse non encapsulée distribués symétriquement sur le visage, le cou, la nuque, le tiers supérieur du médiastin, les épaules et les membres supérieurs. Dans la LSMB de type 2, plus rare, dite forme de « type obésité généralisée », les dépôts graisseux concernent également les membres inférieurs. Ce syndrome est le plus souvent, mais non systématiquement, diagnostiqué chez des hommes adultes qui consomment de l'alcool en excès. Les conséquences cliniques sont le plus souvent esthétiques et psychologiques parfois liées à un phénomène de compression vasculaire ou des voies aéro-digestives supérieures. Plusieurs hypothèses concernant la physiopathologie de ce syndrome ont été émises : -i) un dysfonctionnement ou une hypertrophie du tissu adipeux brun ; -ii : un dysfonctionnement mitochondrial dû à des mutations de l'ADN mitochondrial (Kobayashi, Nagao et al. 2010) ; -iii) la consommation d'alcool, qui serait un co-facteur favorisant l'adipogenèse, diminuant la lipolyse et altérant le fonctionnement des mitochondries. Des complications métaboliques telles que le diabète, les dyslipidémies, la stéatose hépatique sont fréquemment associés à la LSMB. Une grande majorité des patients présentent également une neuropathie sensitivo-motrice et/ou une dysautonomie dues à une atrophie axonale progressive. L'évolution est initialement rapidement progressive puis se ralentit au fur et à mesure sans qu'une régression spontanée soit possible.

Anatomopathologie

L'aspect macroscopique et microscopique des lipomatoses est strictement superposable à celui du tissu adipeux normal. La seule distinction réside dans la localisation et la distribution de ce tissu capable d'infiltrer les tissus avoisinants tels que les muscles striés. Le traitement des lipomatoses consiste en des chirurgies itératives, palliatives car ne pouvant empêcher la récurrence quasi-obligatoire des lipomatoses.

Biologie et Génomique des lipomatoses

La biologie et la génétique des lipomatoses sont extrêmement peu connues. Une étude rapporte un possible lien avec certaines mutations de gènes mitochondriaux et la biologie des lipomatoses symétriques (Klopstock, Naumann et al. 1997). Lorsque nous avons débuté nos travaux, aucune étude cytogénétique des lipomatoses n'avait été publiée.

1-1-3. Les tumeurs adipocytaires malignes

Les LPS sont les tumeurs malignes primitives du tissu adipeux. Elles correspondent au sous groupe le plus fréquent des sarcomes des tissus mous « non-GIST » et, selon la dernière classification de l'OMS (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013), comprennent quatre sous-types :

- Les tumeurs lipomateuses atypiques- les LPS bien différenciés
- Les LPS dédifférenciés
- Les LPS myxoïdes
- Les LPS pléomorphes

a) Les tumeurs lipomateuses atypiques- les liposarcomes bien différenciés

Anciennement regroupées sans distinction avec les LPS bien différenciés (LBD) de type *lipoma-like*, les tumeurs lipomateuses atypiques (TLA) sont des néoplasies primitives malignes du tissu adipeux d'agressivité loco-régionale, composées d'une prolifération d'adipocytes matures, présentant des variations en taille et des atypies nucléaires au moins focales au niveau des adipocytes et des cellules du stroma. Ce terme de tumeur lipomateuse atypique a été proposé pour la première fois par l'équipe de Evans et al (Evans, Soule et al. 1979) et a finalement été retenu par la communauté scientifique internationale pour apparaître pour la première fois officiellement dans la classification OMS 2013. Parce que ces tumeurs ne métastasent à distance qu'à la condition d'une dédifférenciation, le terme de LPS bien différencié (LBD) autrefois utilisé a été remplacé par celui de TLA pour les tumeurs le plus souvent situées au niveau du tronc ou des membres, accessibles de par leur localisation à une résection chirurgicale carcinologique (Evans, Soule et al. 1979, Weiss and Rao 1992). Ce terme a été préféré à celui de LBD pour éviter des « surtraitements » (radiothérapies, amputations ...). Bien que certaines équipes aient préféré le terme de lipome atypique (Evans, Soule et al. 1979), celui-ci n'a pas été retenu car il pouvait être source de confusion comme désignation de tumeurs malignes. En ce qui concerne les localisations profondes telles que le médiastin, le cordon spermatique ou le rétropéritoine, pour lesquelles la résection carcinologiquement complète est très rarement possible, le terme de LBD a été retenu.

Présentation clinique

Les TLA/LBD représentent 40 à 45% des LPS et en constituent le sous-groupe le plus fréquent. Elles sont diagnostiquées chez l'adulte, le pic d'incidence se trouvant dans la 6^e décennie. D'exceptionnels cas pédiatriques ont été décrits (Huh, Yuen et al. 2011), ils étaient le plus souvent associés à un syndrome de Li-Fraumeni (Debelenko, Perez-Atayde et al. 2010). Le sex-ratio est de 1/1 (Weiss, Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013).

Les TLA sont le plus souvent localisées au niveau des tissus mous profonds des membres, notamment au niveau de la cuisse et des tissus sous-cutanés, alors que les LBD sont de localisation plutôt axiale et profonde notamment au niveau du rétropéritoine, dans la région para-testiculaire ou du médiastin. Des localisations beaucoup plus rares telles que la sphère oto-rhino-laryngée ont également été décrites pour les LBD (Nascimento, McMenamin et al. 2002) (ORL). Les LBD se présentent comme des tumeurs de localisation profonde, indolores, de croissance progressive, qui peuvent devenir particulièrement volumineuses notamment dans la cuisse ou le rétropéritoine.

Si les récidives locales après exérèse sont possibles pour les TLA et les LBD, les TLA semblent ne pas métastaser à distance alors que les LBD métastasent à la condition d'une dédifférenciation tumorale. Le facteur pronostique le plus important est la localisation tumorale dans la mesure où elle influence la qualité de l'exérèse et permet la distinction entre TLA et LBD. Ainsi l'on considère que les TLA réséqués de manière carcinologiquement complète (en bloc, marges saines) ne récidivent pas. Les localisations profondes des LBD (rétropéritoine, cordon spermatique, médiastin) sont par conséquent associées à un moins bon pronostic et tendent à récidiver localement et se dédifférencier (Bonvalot, Rivoire et al. 2009, Toulmonde, Bonvalot et al. 2014). Le taux de survie globale spécifique des TLA à 10 ans est de 100 %, alors que la survie globale médiane des LBD du rétropéritoine varie entre 6 et 11 ans selon les séries (Weiss and Rao 1992, Lucas, Nascimento et al. 1994)

Anatomopathologie

L'aspect macroscopique est celui d'une grosse masse bien circonscrite et lobulée. Dans le rétropéritoine, il peut coexister des masses non contiguës. La couleur est variable, du jaune au blanc, selon les proportions respectives des adipocytes, du tissu fibreux ou des zones myxoïdes. Les grosses tumeurs peuvent contenir des zones de nécrose.

Les TLA peuvent être séparées en deux sous-groupes, qui sont, dans l'ordre de fréquence décroissant, le sous-type : i) adipocytaire (*lipoma-like*) et ii) sclérosant. Ces sous-types sont également décrits dans les LBD avec un troisième sous-groupe beaucoup plus rare, les LBD à stroma inflammatoire essentiellement localisés au niveau du rétropéritoine (Fletcher D.M., Bridge J.A. et al. 2013). Les LBD sclérosants sont également plus souvent diagnostiqués au niveau du rétropéritoine ou de la région para-testiculaire. Ces sous-types histologiques peuvent coexister au sein d'une même tumeur. Les TLA tout comme les LBD sont composés d'une prolifération d'adipocytes relativement matures avec une variabilité de taille de ces cellules qui est la différence microscopique essentielle qui permet de distinguer ces tumeurs des lipomes ordinaires. De même la présence d'atypies cytonucléaires ou de lipoblastes permet d'orienter le diagnostic anatomopathologique. Celui-ci est d'autant plus difficile que les foyers de lipoblastes sont particulièrement rares ce qui nécessite l'analyse de nombreux blocs tumoraux qui ne sont eux-mêmes que des échantillons parfois

difficilement représentatifs de ces très volumineuses tumeurs. L'IHC et notamment le marquage nucléaire de MDM2 est une aide souvent précieuse pour le diagnostic différentiel avec des tumeurs adipocytaires bénignes tels que les lipomes.

Cytogénétique et génomique des tumeurs lipomateuses atypiques/liposarcomes bien différenciés

Il est connu depuis les années 1990 que les TLAs/LBD sont caractérisés par des chromosomes dits « marqueurs » surnuméraires (CMS). Ce sont des chromosomes linéaires géants, deux à trois fois la taille du chromosome 1 qui est le plus grand chromosome du génome humain, ou des chromosomes circulaires « en anneau » (« *ring chromosomes* »). Les CMS peuvent être la seule anomalie ou être associés à quelques autres anomalies de structure ou de nombre (Sandberg 2004, Hameed 2007). Les caryotypes de TLAs/LBD sont souvent de mode diploïde, mais des polyploïdies peuvent occasionnellement s'observer. Les associations télomériques sont fréquentes (Mandahl, Mertens et al. 1998).

Ces CMS ont une structure très complexe. Ils contiennent invariablement des séquences du bras long du chromosome 12 et plus particulièrement de la région 12q13-21. Ces séquences sont sous une forme amplifiée et sont toujours associées à l'amplification d'au moins une autre région du génome (Pedeutour, Forus et al. 1999) dont l'origine est variable. Une caractéristique originale est la présence constante d'un « néocentromère » (Italiano, Maire et al. 2009). Un néocentromère est un centromère fonctionnel dépourvu de séquences répétées alpha-satellites (Marshall, Chueh et al. 2008, Garsed, Holloway et al. 2009).

Notre équipe avait précédemment démontré dans des LBD primitifs et des lignées cellulaires de LBD que les CMS de ces tumeurs ne contenaient pas de centromère ordinaire, repérable par des techniques de marquage des bandes C ou de FISH avec des sondes alpha-satellites. Ils contiennent néanmoins un centromère fonctionnel, qui assure la liaison aux protéines du kinétochore et ainsi la transmission stable de ces chromosomes particuliers durant la mitose. Le rôle exact des séquences alpha-satellite n'est pas connu mais l'existence de néocentromères, que ce soit dans des pathologies chromosomiques constitutionnelles ou acquises a démontré qu'elles n'étaient pas strictement indispensables à la fonction centromérique. Dans le cas de la lignée de LBD 94T778, notre équipe avait observé que le néocentromère situé sur un CMS était constitué d'une région riche en AT et de séquences de type LINE-1 (Long INterspersed Elements) issus de la région 4p16. L'analyse par combinaison de l'immunoprécipitation de la chromatine avec la méthode des puces à ADN a permis à l'équipe de C. Storlazzi (Macchia, Nord et al. 2014) de montrer que les néocentromères étaient composés d'une juxtaposition de multiples petits segments issus de différents chromosomes survenue au cours du processus d'amplification.

Plus récemment, une analyse par séquençage nucléotidique de cas de LBD et LDD a permis de proposer une reconstitution du processus dynamique mutationnel qui sous-tend la formation de ces CMS particuliers (Garsed, Marshall et al. 2014). Les auteurs montrent que le chromosome 12 est l'objet d'un phénomène de *chromotripsis* (milliers de cassures et réarrangements chromosomiques aléatoires à l'occasion d'un seul événement génétique) qui donne naissance à un néochromosome circulaire. Le cœur de ce néochromosome est amplifié, réarrangé et érodé au fur et à mesure de cycles successifs de cassures-fusion-ponts. Alors que du nouveau matériel génétique peut être capturé au fur et à mesure de ces cycles, la pression de sélection favorise la surexpression des oncogènes et inhiberait épigénétiquement l'expression des gènes « passagers » de ces amplicons. La formation d'un néocentromère interviendrait dans un contexte de crise cellulaire liée à l'érosion du centromère initial. L'amplification se termine lorsque le chromosome se stabilise sous forme linéaire après la capture de séquences télomériques.

Une caractéristique constante des CMS est de contenir l'amplification du gène *MDM2* (figure 2C). *MDM2* est aussi systématiquement surexprimé dans les TLAs/LBD. *MDM2* code pour une protéine nucléaire qui inhibe l'action du gène suppresseur de tumeur TP53. Le gène TP53 est rarement muté dans les TLAs/LBD (Pilotti, Della Torre et al. 1997, Schneider-Stock, Walter et al. 1998, Ito, Barys et al. 2011, Touqan, Diggle et al. 2013). D'autres gènes de la région 12q14-15 tels que *CDK4* (12q14.1) (Italiano, Bianchini et al. 2009), *HMGA2* (12q14.3) (figure 2D) (Italiano, Bianchini et al. 2008), *YEATS 4* (*YEATS domain containing protein 4*) (Barretina, Taylor et al. 2010), *FRS2* (*Fibroblast growth factor receptor substrate 2*, 12q15) (Wang, Asmann et al. 2011) sont également fréquemment amplifiés dans les TLAs/LBD. Les amplicons sont discontinus et souvent de taille variable (Italiano, Bianchini et al. 2008, Barretina, Taylor et al. 2010).

b) Les liposarcomes dédifférenciés

Les LPS dédifférenciés (LDD) sont des LBD qui évoluent, soit d'emblée soit après récurrence, sous forme d'un sarcome qui perd partiellement ou entièrement sa différenciation adipocytaire.

Présentation clinique

La dédifférenciation survient dans près de 10% des cas de LBD, notamment lorsqu'ils sont profonds (rétropéritone). Il s'agirait d'un risque lié au temps plus qu'au site de la tumeur lui-même. Les LDD se présentent sous la forme d'une volumineuse masse indolore. Le diagnostic peut être fortuit, à l'occasion d'un examen d'imagerie réalisé pour une autre indication (notamment au niveau du rétropéritone) mais peut également être fait à l'occasion de l'augmentation récente et rapide de la taille d'une tuméfaction ancienne qui était asymptomatique. Cette présentation clinique signe souvent la dédifférenciation tumorale. L'imagerie (TDM, IRM) est très évocatrice du diagnostic

lorsqu'elle met en évidence la coexistence au sein du tissu tumoral de tissu adipeux avec un tissu de densité ou d'intensité différente.

Les récurrences locales concernent 40% des patients. Celles-ci sont fortement corrélées à la localisation initiale (rétropéritoneale notamment) ainsi qu'à la qualité de l'exérèse (Bonvalot, Miceli et al. 2010). Les métastases à distance sont observées dans environ 20% des cas avec une survie à 5 ans estimée à 30% (Weiss and Rao 1992, McCormick, Mentzel et al. 1994, Henricks, Chu et al. 1997). Curieusement, l'étendue de la composante dédifférenciée ne semble pas être liée au pronostic. Les LDD ont en général un meilleur pronostic que les autres sous-types de sarcomes des tissus mous de haut grade. Très peu de données ont été publiées pour expliquer cette différence (Weiss and Rao 1992, McCormick, Mentzel et al. 1994, Henricks, Chu et al. 1997), l'hypothèse la plus souvent retenue étant celle d'une instabilité génomique moindre des LDD lorsqu'on les compare à d'autres sarcomes des tissus mous de haut grade. Comme cela sera détaillé plus bas, les LDD ont en effet des caryotypes très peu complexes, avec peu ou pas d'anomalies de p53 (Cordon-Cardo, Latres et al. 1994, Dei Tos, Doglioni et al. 1997).

Anatomopathologie

Les LDD se présentent le plus souvent comme de volumineuses masses tumorales jaunes caractérisées par la présence de parties grisâtres et plus denses. La nécrose peut être retrouvée au sein de ces zones de dédifférenciation. La transition entre les zones bien différenciées et dédifférenciées est le plus souvent brutale (figure 2A) mais peut également être progressive.

La caractéristique pathognomonique des LDD est le passage d'un LBD à un sarcome de haut grade peu différencié. L'étendue de la zone de dédifférenciation varie et est généralement visible macroscopiquement. L'aspect microscopique des zones de dédifférenciation est variable mais ressemble le plus souvent à du sarcome pléomorphe indifférencié ou à du myxofibrosarcome de grade intermédiaire ou élevé (Weiss and Rao 1992, McCormick, Mentzel et al. 1994). Bien que la dédifférenciation des LPS ait été initialement définie par l'apparition d'un contingent de haut grade, des cas de dédifférenciation de bas grade ont été décrits (Elgar and Goldblum 1997, Henricks, Chu et al. 1997). En effet, le grade histologique est défini par le degré de différenciation (1,2,3) comparativement au tissu adipeux mature, au nombre de mitoses (1,2,3) ainsi qu'à la présence de nécrose (0,1,2)(Coindre 1998). Ainsi, au sein de quelques rares LDD on peut n'identifier que très peu ou pas de mitoses et pas de nécrose et les classer en tumeurs de bas grade. De même, le contingent dédifférencié peut se présenter sous plusieurs sous-types histologiques différents (pléomorphe, rhabdoïde, différenciation ostéogénique, neuronale etc.) sans que cela n'influe sur l'évolution de la maladie (Henricks, Chu et al. 1997, Fanburg-Smith and Miettinen 1998, Nascimento, Kurtin et al. 1998, Boland, Weiss et al. 2010, Marino-Enriquez, Fletcher et al. 2010). L'IHC et plus précisément le marquage positif, diffus et nucléaire, de MDM2 est une aide précieuse (Sirvent, Coindre et al. 2007)

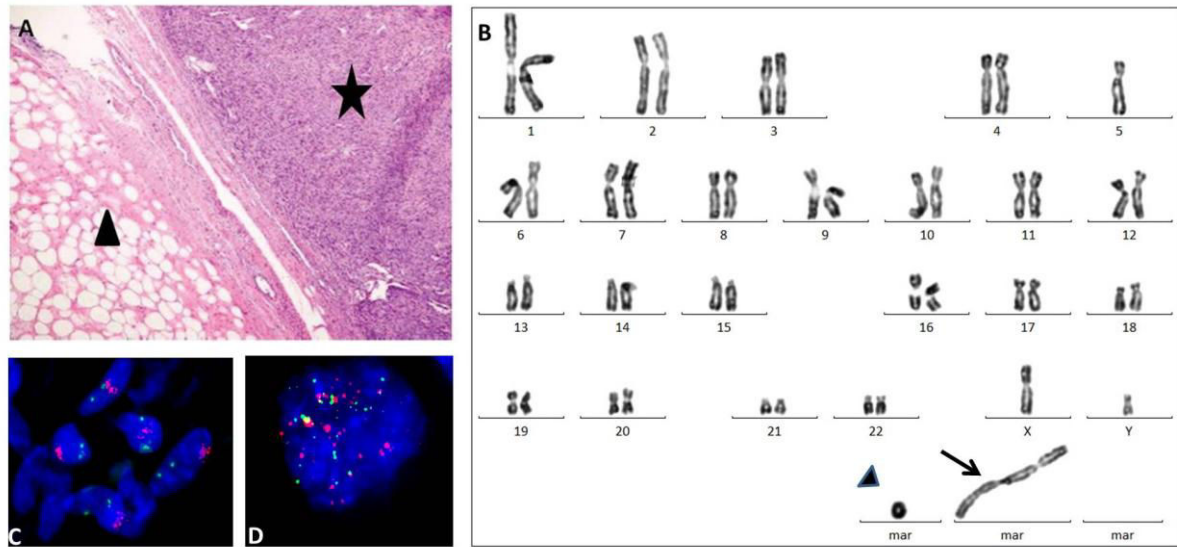
pour distinguer les formes très peu différenciés d'avec d'autres tumeurs malignes (LPS pléomorphes notamment dont le pronostic est plus péjoratif)(Marino-Enriquez, Fletcher et al. 2010).

Cytogénétique et génomique des liposarcomes dédifférenciés

Comme les TLAs/LBD, les LDD sont caractérisés par la présence de CMS (figure 2B) d'une amplification systématique de *MDM2* (figure 2C) (Fletcher, Akerman et al. 1996, Dei Tos, Doglioni et al. 1997, Pilotti, Della Torre et al. 1997, Mertens, Fletcher et al. 1998, Gisselsson, Hoglund et al. 1999, Sirvent, Forus et al. 2000, Meis-Kindblom, Sjogren et al. 2001, Boland, Weiss et al. 2010). Les LDD peuvent présenter plusieurs clones anormaux, avec un ou plusieurs CMS (Mertens, Fletcher et al. 1998, Meis-Kindblom, Sjogren et al. 2001, Sandberg 2004). Les techniques d'hybridation de l'ADN, CGH et FISH notamment, ont permis d'identifier la région 12q13-21 comme siège de l'amplification génomique dans cette pathologie; l'amplicon 12q est lui-même associé à des régions amplifiées variables du génome (Szymanska, Tarkkanen et al. 1996, Pilotti, Della Torre et al. 1997, Sirvent, Forus et al. 2000, Meis-Kindblom, Sjogren et al. 2001). L'amplification des régions 1p32 et 6q23 a été décrite comme plus spécifique des LDD par rapport aux TLA/LBD. Ces régions contiennent notamment l'oncogène *JUN* (1p32) et *MAP3K5* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5*, 6q23), kinase située en aval de JUN dans une même voie de signalisation. Cependant, cette association stricte de l'amplification *JUN* ou *MAP3K5* au phénotype peu différencié semble discutable. Cette voie de signalisation intervient probablement dans l'oncogenèse de certains LBD/LDD mais vraisemblablement pas dans le processus de dédifférenciation (Chibon, Mariani et al. 2002, Chibon, Mariani et al. 2004, Mariani, Brennetot et al. 2007, Snyder, Sandstrom et al. 2009) de ces tumeurs.

A propos de la composition de ces chromosomes en anneau, les travaux récents de Nord et al. (Nord, Macchia et al. 2014) apportent un éclairage nouveau. L'analyse génomique systématique de sarcomes avec chromosomes en anneau dont des LDD leur a permis de démontrer l'existence de deux groupes distincts : ceux associés à une amplification de *MDM2* et ceux qui ne l'étaient pas. Alors que les chromosomes en anneau *MDM2*⁺ tels que ceux caractéristiques des TLA/LBD et LDD semblent survenir dans un contexte chromosomique proche de la normale, les chromosomes en anneau *MDM2*⁻ surviennent dans un contexte d'instabilité génomique majeure et semblent moins essentiels à la genèse de ces tumeurs. Ces travaux soulignent ainsi le caractère fondateur de ces chromosomes en anneau dans la genèse des TLA/LBD et LDD. Ici encore, les sarcomes avec amplification de *MDM2* dont les TLA/LBD et LDD présentaient une co-amplification d'une centaine de gènes dont certains potentiellement impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'inhibition de l'apoptose.

Figure 2. Caractéristiques anatomopathologiques et cytogénétiques d'un LBD.



A- Liposarcome avec composante bien différenciée (pointe de flèche) et dédifférenciée (étoile) (HES x100). **B-** Caryotype (Bandes RHG) d'un LBD avec présence d'un chromosome marqueur géant (flèche) et d'un chromosome en anneau (pointe de flèche) caractéristiques. **C-** FISH interphasique sur noyau de LBD montrant une amplification du gène *MDM2* (sonde RP11-797C20 colorée en rouge) et du centromère du chromosome 12 en vert. **D-** FISH interphasique sur noyau de LBD montrant une amplification et une troncation du gène *HMGA2* (sondes RP11-30I11 en 5'UTR de *HMGA2*, colorée en rouge et RP11-118B13, en 3'UTR de *HMGA2*, colorée en vert).

c) Les liposarcomes myxoïdes

Les LPS myxoïdes constituent le troisième sous-type le plus fréquent des LPS. Ils se présentent sous la forme d'une tumeur maligne composée de cellules rondes ou ovales non-adipocytaires associées de manière variable à des petits lipoblastes en bague à chaton, l'ensemble baignant dans un stroma myxoïde prédominant avec un réseau de ramifications vasculaires caractéristique.

Présentation clinique

Les LPS myxoïdes représentent 15 à 20 % des LPS et environ 5% des sarcomes des tissus mous. S'il peut être diagnostiqué à tout âge, le pic d'incidence est noté dans la quatrième et la cinquième décade. Il s'agit d'une tumeur de l'adulte jeune qui peut exceptionnellement concerner des enfants ou des adolescents (Huh, Yuen et al. 2011). Le *sex ratio* est de 1/1.

Les LPS myxoïdes se présentent également sous la forme d'une volumineuse tuméfaction indolore des tissus mous profonds des membres. Le plus souvent développés au niveau des extrémités, et notamment au niveau des tissus profonds de la cuisse. Rarement, ces tumeurs peuvent être diagnostiquées au niveau du rétropéritoine au niveau de tissus sous-cutanés. Un tiers des patients développent des métastases à distance. Contrairement aux autres liposarcomes et sarcomes myxoïdes des extrémités, les LPS myxoïdes tendent à métastaser dans des sites moins habituels tels que le rétropéritoine, le membre opposé, le creux axillaire ou le rachis vertébral (Antonescu, Elahi et al. 2000).

Anatomopathologie

Les LPS myxoïdes sont des tumeurs bien circonscrites, multi-nodulaires, intramusculaires. La tranche de section fait apparaître une surface brillante, le plus souvent gélatineuse dans les LPS myxoïdes de bas grade. Au contraire, les zones tumorales de haut grade ont un aspect charnu et plus sombre. La nécrose est exceptionnellement visible macroscopiquement dans ces tumeurs.

Les LPS myxoïdes ont une structure microscopique nodulaire avec une cellularité augmentée en périphérie des lobules. L'ensemble est constitué d'un mélange uniforme de cellules rondes et ovoïdes non adipocytaires avec peu de cellules en bagues à chatons le tout baignant dans un stroma myxoïde prédominant. L'ensemble est accompagné d'un fin réseau capillaire à l'architecture caractéristique. Certaines tumeurs sont hypercellulaires ou plus riche en cellules rondes, ce qui est associé à un moins bon pronostic. Les facteurs de mauvais pronostic reconnus sont le grade histologique élevé (ici défini par la présence de plus 5% de cellules rondes) et la présence de nécrose. L'IHC n'est le plus souvent pas très utile au diagnostic de LPS myxoïde.

Cytogénétique et génomique des liposarcomes myxoïdes

Les LPS myxoïdes sont caractérisés par la présence d'une translocation t(12;16)(q13;p11) qui induit la formation d'un gène de fusion entre les gènes *FUS* (*fused in sarcoma gene*, 16p11) et *DDIT3*

(*DNA damage-inducible transcript 3*, 12q13) dans plus de 95% des cas (Turc-Carel, Limon et al. 1986, Sreekantaiah, Karakousis et al. 1992, Crozat, Aman et al. 1993, Rabbitts, Forster et al. 1993, Perez-Losada, Pintado et al. 2000). La présence du gène de fusion *FUS-DDIT3* est ainsi très sensible et très spécifique du diagnostic de LPS myxoïde (Antonescu, Elahi et al. 2000). Un variant moins fréquent est la t(12;22)(q13;q12) qui fait fusionner *DDIT3* à *EWSR1* (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*, 22q12) (Panagopoulos, Hoglund et al. 1996). Au moins 11 différents transcrits de fusion de *FUS-DDIT3* et au moins 4 de *EWSR1-DDIT3* ont été décrits (Panagopoulos, Mandahl et al. 1994, Knight, Renwick et al. 1995, Antonescu, Tschernyavsky et al. 2001). Les facteurs de mauvais pronostic reconnus sont les altérations de *TP53* et de *CDKN2A* (*Cyclin Dependent kinase inhibitor 2A*) (Antonescu, Tschernyavsky et al. 2001, Oda, Yamamoto et al. 2005, Haniball, Sumathi et al. 2011, Moreau, Turcotte et al. 2012). Les différentes formes des transcrits de fusion de *FUS-DDIT3* ne semblent pas avoir de valeur pronostique ou de lien avec le grade tumoral (Antonescu, Tschernyavsky et al. 2001, Bode-Lesniewska, Frigerio et al. 2007).

d) Les liposarcomes pléomorphes

Les LPS pléomorphes sont des sarcomes de haut grade, pléomorphes, qui contiennent un nombre variable de lipoblastes pléomorphes et un profil génomique complexe. Il n'y a pas de zone de LBD ou autre lignée de différenciation identifiable.

Présentation clinique

Les LPS pléomorphes sont le sous-type le plus rare au sein des LPS, et représentent environ 5 % de ceux-ci (Azumi, Curtis et al. 1987). La majorité des cas sont diagnostiqués à l'âge adulte, avec un pic d'incidence durant la septième décennie et surviennent plus souvent chez les hommes que les femmes (Miettinen and Enzinger 1999, Downes, Goldblum et al. 2001, Oliveira and Nascimento 2001, Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004).

Le signe clinique d'appel le plus souvent rapporté est celui d'une tumeur indolore rapidement progressive. Plus rarement, il s'y associe de la douleur ou des symptômes rattachés à la compression tumorale (Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004). Les LPS pléomorphes sont des tumeurs malignes agressives avec des récives locales et des évolutions métastatiques à distance qui concernent 30 à 50 % des patients, et ont un taux de survie à 5 ans de 60% tous stades confondus. Les sites métastatiques privilégiés sont, comme pour la grande majorité des sarcomes des tissus mous, les poumons et la plèvre. Les facteurs de mauvais pronostic cliniques sont habituels, la localisation centrale ou profonde, la résécabilité et la présence de métastases à distance.

Anatomopathologie

La taille médiane des tumeurs est au diagnostic de l'ordre de 10 cm (Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004). Il s'agit le plus souvent de tumeurs bien délimitées mais non encapsulées. Plus rarement, la tumeur est mal délimitée et infiltrante voire pluri-nodulaire. La tranche de section laisse voir une tumeur blanche à jaune. Des zones myxoïdes et de la nécrose peuvent être vues macroscopiquement.

Le diagnostic est permis par la présence, en proportion variable, de lipoblastes pléomorphes sur un fond de cellules sarcomateuses pléomorphes de haut grade. Dans les cas où le contingent lipoblastique est pauvre, l'aspect peut faire évoquer d'autres tumeurs très peu différenciées (carcinomes rénaux, sarcomes ou mélanomes (Miettinen and Enzinger 1999, Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004)). L'analyse immunohistochimique peut être une aide. Les LPS pléomorphes peuvent être positifs pour la protéine S100 (marquage des lipoblastes), tout comme les marqueurs pan-kératine, l'EMA, la desmine et plus rarement HMGA2 (Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004, Dreux, Marty et al. 2010). Les LPS pléomorphes ne marquent classiquement ni MDM2 ni CDK4 (Binh, Sastre-Garau et al. 2005). Un index mitotique élevé est un facteur de mauvais pronostic (Gebhard, Coindre et al. 2002, Hornick, Bosenberg et al. 2004).

Cytogénétique et génomique des liposarcomes pléomorphes

Le profil génétique des LPS pléomorphes est beaucoup plus proche de celui des sarcomes pléomorphes non adipocytaires que des autres LPS (Mertens, Fletcher et al. 1998). Les caryotypes sont complexes et contiennent de nombreuses anomalies de nombre et de structure des chromosomes. Plus particulièrement, on n'identifie pas de chromosomes marqueurs ou d'anomalies clonales, et on constate une polyploïdie et une hétérogénéité intercellulaire. A ce jour, aucune translocation récurrente n'a été identifiée dans ces tumeurs. L'analyse par puces d'hybridation génomique comparative (aCGH) montre des profils complexes, avec de nombreux gains et pertes de régions chromosomiques (Fritz, Schubert et al. 2002, Rieker, Joos et al. 2002, Idbaih, Coindre et al. 2005, Schmidt, Bartel et al. 2005, Taylor, Barretina et al. 2008). Les LPS pléomorphes n'ont pas d'amplification de la région 12q14-15 ni de *HMGA2/MDM2/CDK4* (Fritz, Schubert et al. 2002, Singer, Socci et al. 2007). L'amplification du bras long du chromosome 13 (Schmidt, Bartel et al. 2005) pourrait être un facteur de mauvais pronostic dans les LPS non TLA/LBD.

Tableau de synthèse des principales anomalies génétiques et cytogénétiques des tumeurs adipocytaires.

Histologie	Sous-types histologiques	Anomalies cytogénétiques récurrentes
TA bénignes		
Lipomes	-Lipomes ordinaires et autres	-translocations, inversions, délétions avec cassure dans le gène <i>HMGA2</i> (12q14.3) (60%) -translocations, inversions, délétions avec cassure dans le gène <i>HMGA1</i> (6p21) (5%) -perte du chromosome 13 ou del 13q (lipomes de la nuque et des épaules) -autre anomalie -caryotype apparemment normal
	-Lipomes à cellules fusiformes	-perte du chromosome 13 ou del 13q
	-Chondrolipomes	- t(11 ;16)(q13;p13), gène de fusion <i>C11orf95-MKL2</i>
Hibernomes		-délétions interstitielles en 11q13, perte d'expression de <i>MEN1</i> et <i>AIP</i>
Lipoblastomes		-remaniements de <i>PLAG1</i> (8q12.1) (remaniement de <i>HMGA2</i> : un cas décrit)
TA malignes		
TLA-LBD		-chromosomes surnuméraires géants ou en anneau, associés ou non à des anomalies de structure ou de nombre -amplification de <i>MDM2</i> (12q15) constante -amplification d'autres gènes de la région 12q13-15 fréquente
LDD		-chromosomes surnuméraires géants ou en

	anneau, généralement associés à des anomalies de structure ou de nombre
	-amplification de <i>MDM2</i> (12q15) constante
	-amplification d'autres gènes de la région 12q13-15 fréquente
	-amplification d'autres régions fréquente (1p32, 6q23)
LPS myxoïdes	-t(12;16)(q13;p11), gène de fusion <i>FUS-DDIT3</i> (95%)
	- t(12;22)(q13;q12), gène de fusion <i>EWSR1-DDIT3</i>
LPS pléomorphes	-caryotypes avec nombreuses anomalies de nombre et de structure complexes

1-2. HMGA2

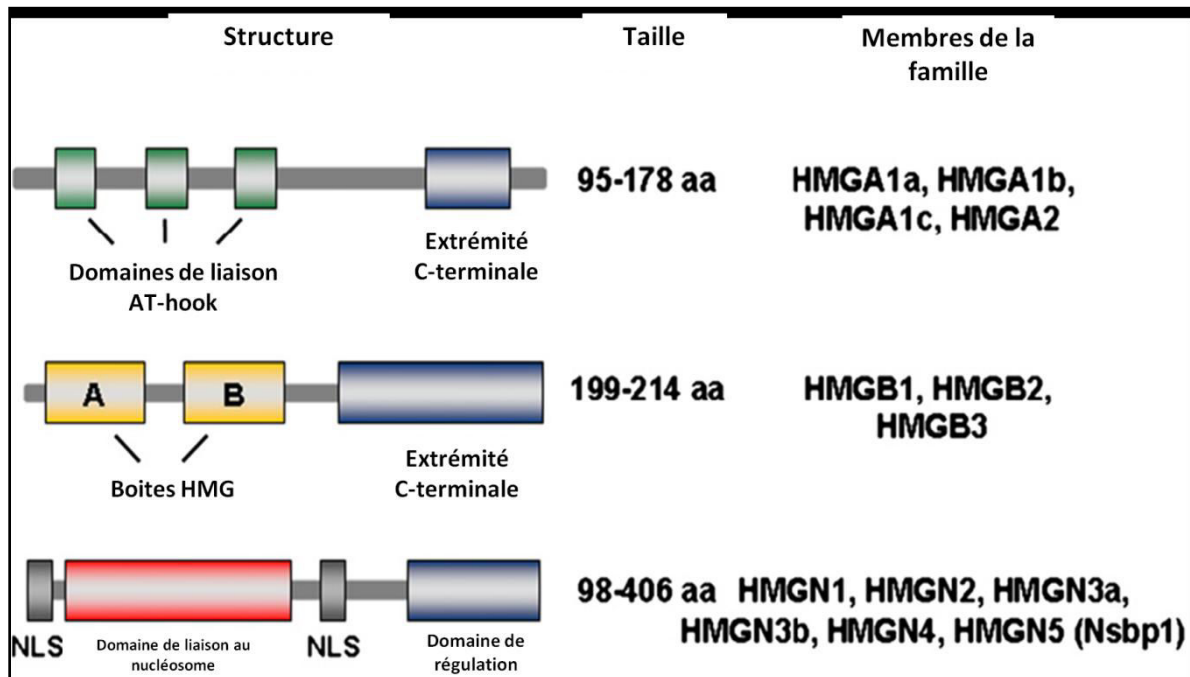
Les observations montrant des remaniements de *HMGA2* (et plus rarement de *HMGA1*) dans la majorité des lipomes ainsi que les travaux plus récents établissant l'amplification de *HMGA2* dans les TLA/LBD et LDD nous ont amenés à émettre l'hypothèse d'un rôle majeur de *HMGA2* dans la genèse de ces TA.

Le gène *HMGA2*, anciennement nommé *HMGIC* code pour une protéine du groupe « High Mobility » (HMG) et son implication dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques a fait l'objet de travaux récents.

1-2-1. Structure des HMGA

Les protéines du groupe de haute mobilité (*High Mobility Group* : HMG) sont des protéines de liaison à l'ADN qui ont été isolées dans des cellules de mammifères et nommées ainsi en référence à leur vitesse de migration électrophorétique (Bustin 2001). Initialement, les protéines HMGs ont été identifiées pour leur action dans la modulation de l'architecture de la chromatine, ce qui a un effet sur l'expression génique. L'expression et la localisation aberrante des protéines HMG ont des conséquences pathologiques (Hock, Furusawa et al. 2007). Ce groupe de protéines est constitué de trois sous groupes : HMGA, HMGB et HMGN. Chaque groupe est caractérisé par un motif fonctionnel spécifique : « *AT-hook* » pour les HMGAs, « *HMG-box* » pour les HMGB et « le domaine de liaison au nucléosome » (*nucleosomal binding domain*) pour les HMGN (Bustin 2001) (figure 3). La famille des protéines HMGA comprend 4 membres respectivement codés par deux gènes: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c et HMGA2. L'épissage alternatif du gène *HMGA1* (anciennement nommé *HMG1-Y*, situé en 6p21) donne naissance aux variants les plus abondants, HMGA1a (107 acides aminés (aa), 11,9 kDa) et HMGA1b (96 aa, 10,6 kDa) et un variant plus rare HMGA1c (179 aa, 19,7 kDa) (Bustin and Reeves 1996).

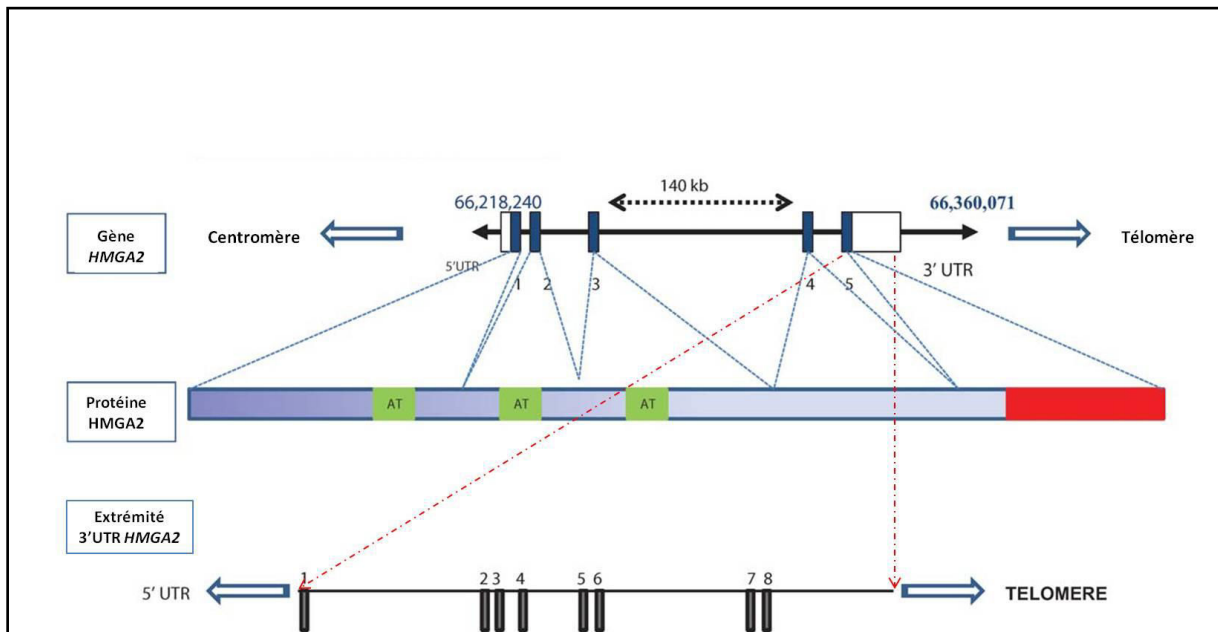
Figure 3. Structure des protéines HMG.



Tous les membres des trois familles de protéines HMG possèdent une structure analogue avec un module de liaison composé de motifs conservés phylogénétiquement (représentés en vert pour les HMGA, en jaune pour les HMGB et en rouge pour les HMGN) et d'une extrémité C-terminale acide. Pour chaque famille, de gauche à droite, est schématisée la structure des protéines, suivie de la taille (nombre d'acides aminés)(aa=acides aminés) ainsi que les différents membres de chaque famille (de haut en bas, HMGA, HMGB puis HMGN). NLS: Nuclear Localization Domain (d'après Catez et al. 2010(Catez and Hock 2010)).

HMGA2 (109 aa, 12kDa), anciennement nommé HMGI-C, est codé par un gène situé en 12q14.3 (<http://www.genome.ucsc.edu>). Le gène *HMGA2* est constitué de 160 kb et comporte 5 exons. Un grand intron de plus de 140 kb sépare l'exon 3 de l'exon 4 (figure 4). Au moins deux différents sites d'initiation de la transcription ont été identifiés dans la région 5' de *HMGA2* (Ayoubi, Jansen et al. 1999, Borrmann, Schwanbeck et al. 2003). Toujours dans la région 5'UTR (*5'UnTranslated Region*) de *HMGA2*, on retrouve une séquence répétée de type (TCTCT(TC)_n), 500 paires de bases en amont du codon *start* ATG. La longueur de cette séquence répétée est variable et influence la manière dont le promoteur de *HMGA2* peut être activé. L'ARNm principal, constitué de 4,2 kb, comporte une large région non traduite en 3'UTR qui comporte des régions régulatrices négatives (Borrmann, Wilkening et al. 2001) dont des sites de fixation aux micro-ARN *let-7* (Lee and Dutta 2007, Mayr, Hemann et al. 2007) (figure 4). A l'exception de HMGA1c, les protéines HMGA, et notamment HMGA2, sont composées de trois boîtes appelées « *AT hooks* » contenant une séquence cœur invariable Arg-Gly-Pro qui se fixe au niveau du sillon mineur de l'ADN sur des séquences riches en bases AT. La protéine HMGA2 contient également un domaine C-terminal acide dont la fonction est encore mal connue. Celle-ci serait impliquée dans la régulation du niveau d'affinité des interactions des HMGA avec d'autres protéines du noyau (Nissen and Reeves 1995, Sgarra, Maurizio et al. 2009). Les trois boîtes « *AT hooks* » sont codées par les 3 premiers exons de *HMGA2* et la région C-terminale par l'exon 5. L'exon 4 de *HMGA2* code pour un domaine de 12 aa situé entre la troisième boîte AT et la région C-terminale acide. Les protéines HMGA subissent des modifications post-traductionnelles, telles que acétylation, méthylation, phosphorylation, susceptibles de moduler leurs interactions avec l'ADN et d'autres protéines (Zhang and Wang 2008).

Figure 4. Représentation schématique du gène *HMGA2* (12q14.3).



La partie supérieure du schéma représente le gène *HMGA2*, l'extrémité 5' UTR, les trois premiers exons (rectangles bleus) suivis d'un intron 3 de 140 kb, lui-même suivi des exons 4 et 5 et de l'extrémité 3'UTR. De part et d'autre du gène sont représentées les coordonnées nucléotidiques (<http://genome.ucsc.edu>). La partie médiane schématise la protéine *HMGA2* avec les trois domaines « AT hooks » de liaison à l'ADN (représentés en vert) ainsi que l'extrémité acide C-terminale (rectangle rouge). La partie inférieure schématise l'extrémité 3'UTR de *HMGA2* ainsi que la localisation des régions qui codent pour les 8 sites de fixation potentiels pour les microARN *let-7* (rectangles gris) selon Lee et Dutta, 2007 (Lee and Dutta 2007).

1-2-2. Interactions des protéines HMGA avec la chromatine

La fonction première des protéines HMGA est de se lier au brin d'ADN et ainsi moduler positivement ou négativement des processus liés à l'ADN tels que la réplication, la réparation ou encore la transcription génique (Reeves 2001). Cette action est permise par la liaison à d'autres protéines nucléaires qui constituent le transcriptome ou enhanceosome de plusieurs gènes. La liaison des protéines HMGA à leur cible ne dépend pas spécifiquement de la séquence d'ADN concernée mais est guidée par la reconnaissance de particularités locales de la chromatine plutôt que celles de la séquence d'ADN sous-jacente. Des sites de liaison privilégiés ont été identifiés pour chaque groupe de protéine HMG. Les protéines HMGA se fixent au niveau de domaines distincts de la chromatine (euchromatine, hétérochromatine mais également chromosomes mitotiques) (Disney, Johnson et al. 1989, Amirand, Viari et al. 1998, Harrer, Luhrs et al. 2004). Cependant les protéines HMGA sont aussi capables de se fixer en dehors de leur zone de prédilection et ainsi, pour HMGA1, se fixer à de l'euchromatine ou quitter le noyau pendant la phase S/G2 et entrer dans la mitochondrie pour moduler sa fonction (Dement, Maloney et al. 2007, Mao, Wertzler et al. 2009).

Les protéines HMGs font partie des protéines de liaison à la chromatine les plus abondantes dans les cellules indifférenciées, sont exprimées de manière différentielle au sein des tissus pendant la différenciation et sont absentes dans les stades différenciés terminaux (Rogalla, Drechsler et al. 1996, Hirning-Folz, Wilda et al. 1998, Muller, Ronfani et al. 2004, Hock, Furusawa et al. 2007). En dépit d'un mode d'action commun, les différentes familles de protéines HMG, de même que les différents membres au sein de chaque famille de protéines HMG possèdent des effets spécifiques et sont impliqués de manière différentielle dans la régulation du code des histones et la régulation spécifique de certains gènes. De même leur rôle dans le développement, le sepsis ou le cancer sont différents.

Les fonctions des protéines HMGA sont très diverses : elles sont impliquées aussi bien dans des phénomènes physiologiques que dans des pathologies tumorales, infectieuses ou métaboliques (Cleyen et Van de Ven 2008).

Dans la suite de cet exposé, nous ne développerons que les aspects qui peuvent faire discuter le rôle des protéines HMGA et notamment de HMGA2 dans la genèse des TA.

1-2-3. HMGA, développement embryonnaire et croissance des mammifères

L'expression des protéines HMGA est très élevée pendant l'embryogenèse. Dans les tissus différenciés adultes sains, l'expression de HMGA1 est restreinte à certains tissus et celle de HMGA2 est quasiment indétectable (Zhou, Benson et al. 1995, Chiappetta, Avantaggiato et al. 1996, Gattas, Quade et al. 1999). Ce profil d'expression suggère un rôle essentiel de ces protéines dans les étapes précoces du développement. En particulier, les gènes *hmga1* et *hmga2* sont fortement exprimés au

cours des premières étapes de l'embryogénèse de la souris (Hirning-Folz, Wilda et al. 1998), *hmga1* intervient notamment dans les étapes clés de la cardiogénèse (Monzen, Ito et al. 2008). Alors que *hmga1* reste exprimé de façon ubiquitaire à un faible niveau lors des stades ultérieurs du développement embryonnaire et chez l'adulte, l'expression de *hmga2* se restreint rapidement à certaines structures tissulaires dérivées du mésoderme puis devient indétectable chez l'adulte (Rogalla, Drechsler et al. 1996). Cette décroissance se fait en miroir de l'augmentation de la synthèse des microARN *let-7* dont les interactions avec *HMGA2* régulent le développement et probablement les phénotypes de dégénérescence liée à l'âge (Keane and de Magalhaes 2013). Le phénotype des souris *knock-out* pour *hmga1*, qui comprend notamment une taille discrètement inférieure à la moyenne, une hypertrophie cardiaque et un diabète de type 2, suggère que des quantités minimales de *hmga1* sont requises pour la croissance des cardiomyocytes et la régulation du métabolisme de l'insuline (Foti, Chiefari et al. 2005, Fedele, Fidanza et al. 2006). *Hmga2* n'est pas détecté dans les tissus adultes humains ou murins hormis quelques exceptions : cellules souches hématopoïétiques CD34+ (Rommel, Rogalla et al. 1997, Nishino, Kim et al. 2008, Copley, Babovic et al. 2013), préadipocytes murins (Anand and Chada 2000), spermatocytes et spermatides (Chieffi, Battista et al. 2002), les cellules de la cochlée (Smeti, Watabe et al. 2014).

Les protéines HMGA interviennent dans le développement embryonnaire mais également dans la croissance et la détermination de la taille des mammifères. Chez la souris, l'invalidation (*knock-out*) de *hmga2* est à l'origine du phénotype « *pygmy* » qui correspond à une réduction de la taille de ces animaux de 60% (Zhou, Benson et al. 1995). Le double *knock-out* *hmga1*^{-/-}, *hmga2*^{-/-} est à l'origine d'un phénotype « *super-pygmy* » détaillé plus bas. *A contrario* les souris qui surexpriment la forme tronquée de *hmga2* ont un phénotype géant, en miroir du phénotype *pygmy* (Battista, Fidanza et al. 1999, Baldassarre, Fedele et al. 2001). Le rôle de *HMGA2* dans la détermination de la taille a par ailleurs été démontré dans d'autres espèces telles que les chiens ou les chevaux (Makvandi-Nejad, Hoffman et al. 2012). Chez l'être humain, les polymorphismes de *HMGA2* déterminent de manière importante la taille des individus (Weedon, Lettre et al. 2007, Sanna, Jackson et al. 2008, Weedon, Lango et al. 2008, Hodge, K et al. 2009, Yang, Guo et al. 2010, Hendriks, Brown et al. 2011, Carty, Johnson et al. 2012). Le syndrome de microdélétion 12q14, qui est caractérisé par un déficit intellectuel modéré, un retard de croissance staturo-pondérale, une petite taille ainsi qu'une ostéopoecilie (ou ostéopathie striée), est associé à une délétion hétérozygote de la région 12q14, qui comprend notamment les gènes *LEMD3* (LEM domain containing 3, aussi impliqué dans l'ostéopoecilie) mais également *HMGA2* (Buysse, Reardon et al. 2009) dont le déficit explique le retard staturo-pondéral de ces patients. De même, la description du cas d'un garçon âgé de 8 ans porteur d'une forme constitutionnellement tronquée de *HMGA2* (inversion péricentrique du chromosome 12) (Ligon, Moore et al. 2005) rappelle le phénotype des souris transgéniques (Battista,

Fidanza et al. 1999), avec un gigantisme, de multiples lipomes mais également une tumeur cérébelleuse ainsi qu'une dérégulation du développement enchondral et dentaire. La délétion de *HMGA2* a également été associée à un syndrome de type déficit en hormone de croissance (GH)(Gorbenko del Blanco, de Graaff et al. 2011).

1-2-4. HMGA et tumorigenèse

Données *in vitro* sur l'implication des HMGA dans le processus de tumorigenèse

Alors que dans les tissus adultes, l'expression de HMGA1 est restreinte à certains tissus et que HMGA2 est quasiment indétectable, les deux protéines sont très souvent abondamment surexprimées dans les tissus tumoraux malins (Giancotti, Buratti et al. 1989, Wood, Maher et al. 2000, Fusco and Fedele 2007). La première démonstration *in vitro* d'un lien entre la surexpression des protéines HMGA et la tumorigenèse a été faite par l'équipe de Giancotti en 1985 (Giancotti, Berlingieri et al. 1985) qui a mis en évidence l'apparition et la surexpression des protéines HMGA1 phosphorylées après transformation de thyrocytes par le virus Kirsten murin (Giancotti, Pani et al. 1987). D'autres travaux montrent que la surexpression des protéines HMGA1 et/ou HMGA2 induit la transformation de différents modèles cellulaires sains (fibroblastes de rat(Fedele, Berlingieri et al. 1998),lymphoblastes humains (Wood, Maher et al. 2000), cellules épithéliales mammaires humaines (Reeves, Edberg et al. 2001)). Le blocage de l'expression de HMGA1 inhibe *a contrario* la transformation des cellules thyroïdiennes (Berlingieri, Pierantoni et al. 2002) et entraîne la mort des cellules malignes (Scala, Portella et al. 2000).

Données *in vivo* chez l'animal sur l'implication des HMGA dans le processus de tumorigenèse

In vivo, les souris transgéniques qui surexpriment *hmga1* ou *hmga2* développent des hémopathies malignes et des adénomes hypophysaires (Fedele, Battista et al. 2002, Fedele, Pentimalli et al. 2005, Zaidi, Okada et al. 2006). Zaidi et al (Zaidi, Okada et al. 2006) ont montré que la surexpression de *hmga2* chez des souris transgéniques aboutissait à la formation de tumeurs bénignes (fibroadénomes mammaires, adénomes des glandes salivaires) alors que l'inactivation de *hmga2* dans un modèle murin prédisposé aux tumeurs (Morishita, Zaidi et al. 2013) diminue l'incidence de ces tumeurs chez ces souris.

HMGA et tumorigenèse : Données chez l'Homme.

Chez l'Homme, la surexpression des protéines HMGA est constatée dans de nombreuses tumeurs bénignes, notamment celles dérivées du tissu mésenchymateux. Dans une série de 1052 tumeurs, Dreux et al (Dreux, Marty et al. 2010) ont montré que HMGA2 était surexprimé dans 84% des lipomes ordinaires, 100% des lipomes intramusculaires, 18% des lipomes à cellules fusiformes et aucun des deux cas d'hibernomes. HMGA2 est également surexprimé dans des histiocytomes fibreux bénins (88%), fasciites nodulaires (90%), tumeurs desmoïdes (16%), léiomyomes (31%), schwannomes (20%), angiomyxomes vulvo-vaginaux agressifs (90%) et angiomes (40%)(Dreux, Marty et al. 2010). On retrouve la surexpression de HMGA2 dans des tumeurs épithéliales bénignes telles que les adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Geurts, Schoenmakers et al. 1998) et de la thyroïde(Klemke, Muller et al. 2014). HMGA1 est surexprimée dans certains adénomes hypophysaires(Wang, Qian et al. 2010), leiomyomes utérins, les lipomes, les hamartomes chondroïdes pulmonaires et les polypes endométriaux(Hennig, Wanschura et al. 1996, Tallini, Vanni et al. 2000).

Les protéines HMGA sont également surexprimées dans de nombreuses tumeurs malignes solides et hématologiques (Pierantoni, Agosti et al. 2003, Otero, Grand et al. 2005). Chez l'Homme, HMGA1 est notamment surexprimée dans les carcinomes pancréatiques (Abe, Watanabe et al. 2000), thyroïdiens (Chiappetta, Tallini et al. 1998, Kim, Ryu et al. 2000), coliques (Fedele, Bandiera et al. 1996, Abe, Watanabe et al. 1999, Chiappetta, Manfioletti et al. 2001), mammaires (Flohr, Rogalla et al. 2003), pulmonaires (Sarhadi, Wikman et al. 2006), ovariens (Masciullo, Baldassarre et al. 2003), du col utérin (Bandiera, Bonifacio et al. 1998) et de la sphère ORL (Rho, Lim et al. 2007). La surexpression de la protéine HMGA2 a été rapportée dans des tumeurs malignes épithéliales (pancréatiques (Abe, Watanabe et al. 2003), pulmonaires (Meyer, Loeschke et al. 2007), épidermoïdes de la sphère ORL (Miyazawa, Mitoro et al. 2004), cholangiocarcinomes (Lee, Wu et al. 2014), ovariennes (Mahajan, Liu et al. 2010, Zhang, Ding et al. 2013), carcinomes séreux utérins (McCluggage, Connolly et al. 2012) et ovariens (Califano, Pignata et al. 2014), de vessie (Ding, Wang et al. 2014)), des carcinomes-ex-adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Roijs, Nordkvist et al. 2002) mais également dans des hépatoblastomes (Lee, Zhang et al. 2013) et des mélanomes (Raskin, Fullen et al. 2013). HMGA2 est également surexprimée dans un certain nombre de TA bénignes et malignes. Dans la série de Dreux et al(Dreux, Marty et al. 2010), parmi les LPS, HMGA2 est surexprimée dans 86% des TLA/LBD, 67% des LDD, 11% des LPS pléomorphes et aucun LPS myxoïde. HMGA2 était aussi surexprimée dans certains sarcomes non LPS, comme les leiomyosarcomes (13%), les myxofibrosarcomes (26%), les rhabdomyosarcomes embryonnaires (36%), les tumeurs à cellules rondes desmoplastiques (2 cas sur les 3 publiés) et les sarcomes épithélioïdes (2 cas sur les 6 publiés). De manière générale, la surexpression de HMGA2 est associée à un phénotype tumoral plus agressif et un moins bon pronostic (Balcerczak, Pasz-Walczak et al.

2003, Flohr, Rogalla et al. 2003, Raskin, Fullen et al. 2013, Califano, Pignata et al. 2014, Lee, Wu et al. 2014). De manière paradoxale, des cas de surexpression des protéines HMGA ont également été décrits dans des sous types tumoraux bien différenciés alors que cette expression était perdue ou diminuée dans les sous types peu différenciés de moins bon pronostic (Akai, Ueda et al. 2004, Donato, Martinez Hoyos et al. 2004, Franco, Esposito et al. 2008).

Mécanismes biologiques impliqués dans l'action pro-oncogénique des HMGA.

Plusieurs mécanismes, non exclusifs, ont été décrits pour comprendre le rôle des protéines HMGA dans la transformation cellulaire. Parmi ceux-ci, on peut retenir :

- l'induction de l'activité de facteurs de transcription tels qu'E2F1 (E2F transcription factor 1) (Fedele, Pierantoni et al. 2006) ou PIT1 (Pituitary specific Transcription factor 1) (Palmieri, Valentino et al. 2012)

- l'induction de l'expression des cyclines (Fedele, Pierantoni et al. 2001, Tessari, Gostissa et al. 2003, Kolb, Fritsch et al. 2007, De Martino, Visone et al. 2009)

- l'augmentation de l'activité du complexe AP1 (complexe adaptateur pour la clathrine AP1) qui peut inclure trois protéines JUN (JUN, JUNB, JUND) et quatre protéines FOS (FOS, FOSB, FRA1, FRA2) capable d'induire la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'oncogenèse (Vallone, Battista et al. 1997, Cleynen, Huysmans et al. 2007).

- l'inhibition de l'apoptose (Frasca, Rustighi et al. 2006, Esposito, Tornincasa et al. 2012, Natarajan, Hombach-Klonisch et al. 2013)

- la fragilisation de la réparation de l'ADN et la majoration de l'instabilité génomique (Subramanian and Griffith 2002, Baldassarre, Battista et al. 2003, Borrmann, Schwanbeck et al. 2003, Reeves and Adair 2005, Li, Boo et al. 2009)

- la promotion de la synthèse de protéines pro-inflammatoires (Kim, Reeves et al. 1995, Himes, Coles et al. 1996, Ji, Xu et al. 1998, Mantovani, Covaceuszach et al. 1998, Perrella, Pellacani et al. 1999, Kim, Kelly et al. 2001)

- la modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (Thuault, Valcourt et al. 2006, Watanabe, Ueda et al. 2009, Wu, Liu et al. 2011, Tan, Thuault et al. 2012, Guo, Chen et al. 2013, Luo, Li et al. 2013, Morishita, Zaidi et al. 2013, Pegoraro, Ros et al. 2013, Zha, Zhang et al. 2013, Zhu, Li et al. 2013, Ding, Wang et al. 2014, Li, Zhao et al. 2014, Liu, Liu et al. 2014, Ma, Nong et al. 2014, Suh, Yoo et al. 2014)

- la régulation de l'expression des microARN (Mansueto, Forzati et al. 2010, Zhang, Ma et al. 2011, Mussnich, D'Angelo et al. 2013) ou de leur disponibilité pour la régulation d'autres gènes (Kumar, Armenteros-Monterroso et al. 2014)

- la modulation de la méthylation du génome (Sun, Song et al. 2013).

1-2-5. HMGA : des suppresseurs de tumeurs

Paradoxalement les protéines HMGA peuvent également agir comme des suppresseurs de tumeurs dans certains contextes cellulaires. En effet les souris *hmga1*^{-/-} et *hmga1*^{+/-} développent des lymphomes B par perte de mécanismes de régulation spécifique dépendantes des cytokines sécrétées par les lymphocytes T (Fedele, Fidanza et al. 2006). Les protéines HMGA s'accumulent dans la chromatine des fibroblastes sénescents et sont essentielles à la formation des foyers hétérochromatiques associés à la sénescence (*senescence associated heterochromatic foci* : SAHFs)(Narita, Krizhanovsky et al. 2006). Les protéines HMGA coopèrent avec le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (*p16*), pour favoriser la formation des SAHFs et arrêter la prolifération, stabilisent la sénescence en contribuant à la répression des gènes associés à la prolifération cellulaire. De manière notable, ces propriétés antiprolifératives de HMGA sont perdues si les protéines MDM2 et CDK4 sont surexprimées, ce qui est souvent le cas dans les tumeurs malignes et particulièrement celui des TLA/LBD-LDD (Narita, Krizhanovsky et al. 2006). Ainsi le rôle de ces protéines dans la régulation de la prolifération cellulaire est-il fortement dépendant des interactions avec les autres protéines nucléaires et fortement corrélé au contexte cellulaire (Li, Lu et al. 2007). La protéine RB1 jouerait également un rôle essentiel dans la formation de ces SAHFs induite par HMGA2 (Shi, Tian et al. 2013). HMGA2 est également capable d'induire l'apoptose dans des lignées dérivées de cellules embryonnaires pulmonaires humaines (Shi, Tian et al. 2014). Dans cette étude, les cellules qui surexprimaient HMGA2 étaient arrêtées en phase G2/M avec un phénotype nucléaire compatible avec un état pré-apoptotique. De plus, la surexpression de HMGA2 était associée à la surexpression de protéines pro-apoptotiques (p53, bax, caspase 9 clivée) et à l'inhibition de protéines anti-apoptotiques (Bcl2)(Shi, Tian et al. 2014).

1-2-6. HMGA et adipogenèse

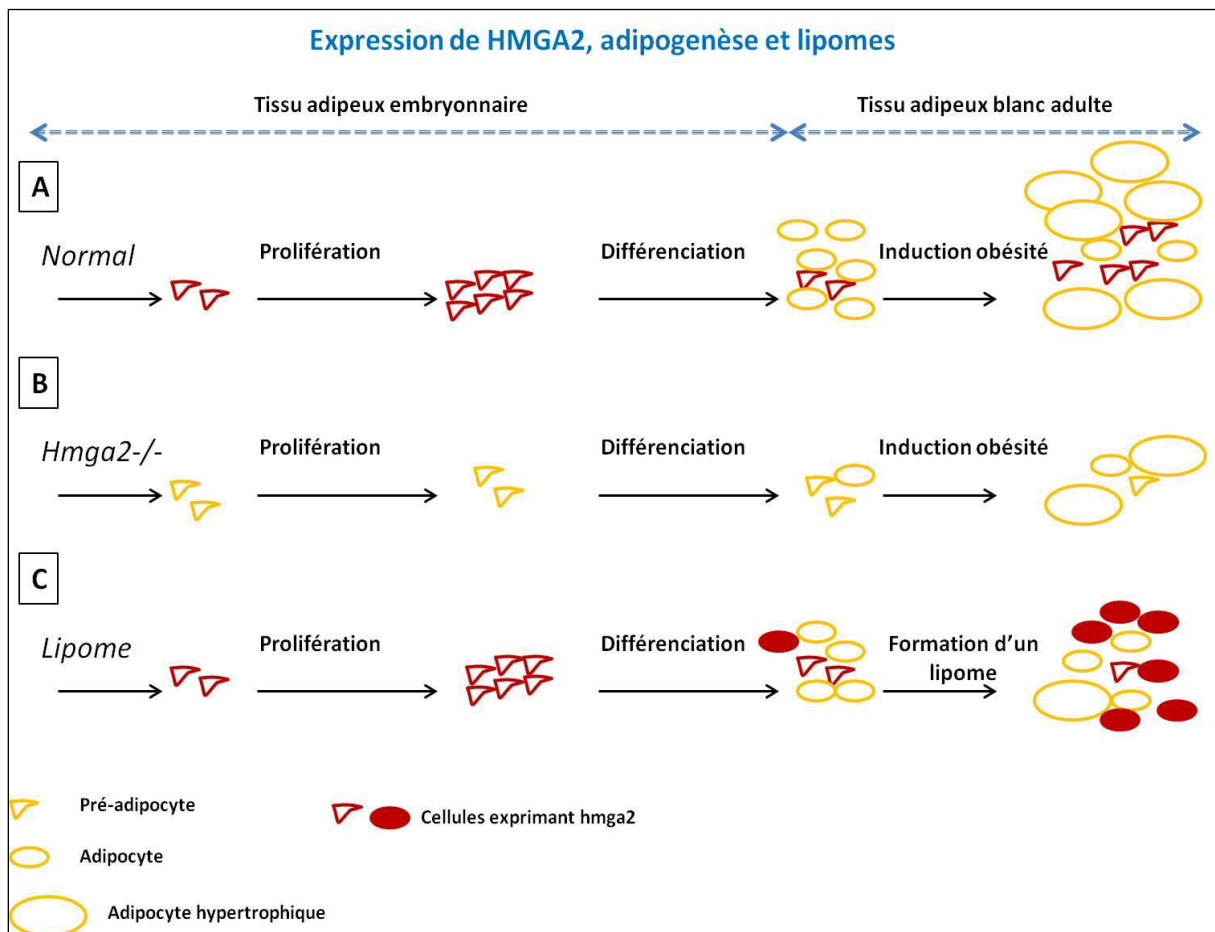
Une autre fonction qui semble antinomique avec les propriétés pro-oncogéniques de HMGA2 est l'induction de la différenciation adipocytaire. En effet, HMGA2 joue un rôle essentiel dans la formation du tissu adipeux. Alors que l'inactivation du gène *hmga1* donne naissance à des souris avec des hypertrophies cardiaques et un diabète de type 2 (Fedele, Fidanza et al. 2006), les souris *knock-out hmga2*^{-/-} ont un phénotype particulier dit *pygmy* correspondant à une diminution de la taille et du poids des souris essentiellement aux dépens du tissu adipeux (Zhou, Benson et al. 1995) ce qui suggère que HMGA2 joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et la différenciation adipocytaires (figure 5B). Le double *knock-out hmga1* et *hmga2* donne naissance à des souris au phénotype dit *super-pygmy* (Federico, Forzati et al. 2014) caractérisé par une létalité plus importante (majorité de décès *in utero*), une réduction de l'ordre de 75% de la taille des

animaux suggérant une compensation possible de *hmga1* dans les fonctions de *hmga2*, et réciproquement.

Anand et Chada (Anand and Chada 2000) ont étudié l'effet de la modulation *in vivo* de l'expression de *hmga2* dans le tissu adipeux de souris adultes obèses. Les souris qui avaient un déficit au moins partiel de *hmga2* ne grossissaient pas malgré un régime hypercalorique, et ceci de manière dose-dépendante selon le niveau d'inhibition de l'expression du gène. Ces données ont conforté le rôle de HMGA2 dans la prolifération pré-adipocytaire et fait proposer son ciblage spécifique pour la prévention et le traitement du diabète. De plus, les modèles murins transgéniques qui surexprimaient *hmga2* dans sa forme tronquée (Battista, Fidanza et al. 1999, Arlotta, Tai et al. 2000) ou entière (Fedele, Battista et al. 2002) avaient un phénotype particulier récurrent qui associe gigantisme et lipomatose. Sun et al (Sun, Fu et al. 2009) ont par ailleurs montré que l'invalidation de *hmga2* dans une lignée de préadipocytes murins inhibait sa différenciation en adipocytes. Ils démontrent également sur ce même modèle une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de *hmga2* et ceux de plusieurs membres de la famille *let-7* et suggèrent l'implication de ces miARN dans la régulation de la différenciation adipocytaire. Sur ce même modèle, la différenciation adipocytaire est associée à une surexpression de *hmga1*, alors que l'inhibition de la synthèse de *hmga1* augmente le taux de croissance et supprime la différenciation adipocytaire (Melillo, Pierantoni et al. 2001). L'expression d'une forme tronquée de *hmga1* augmente la croissance cellulaire sans bloquer la différenciation adipocytaire ni induire de phénotype malin (Pierantoni, Battista et al. 2003).

La même équipe a montré que la régulation de la différenciation adipocytaire par les protéines *hmga* faisait intervenir la protéine Rb (Esposito, Pierantoni et al. 2009). Plus récemment, Wei et al (Wei, Li et al. 2014) ont montré que la surexpression des *let-7* dans des lignées de cellules souches mésenchymateuses (cette fois-ci humaines) favorisait l'ostéogenèse et inhibait l'adipogenèse en inhibant la synthèse de HMGA2. Zhang et al montrent pour leur part une possible inhibition de la différenciation adipocytaire dans des cellules souches mésenchymateuses par l'inhibition de la synthèse de HMGA1 régulée par la surexpression des microARN mir-26a et mir-26b (Zhang, Wang et al. 2014).

Figure 5. Expression de HMGA2, adipogenèse et formation des lipomes.



Pour les souris normales (A) la prolifération pré-adipocytaire puis la différenciation adipocytaire se succèdent. Dans des conditions favorisant l'obésité, la population pré-adipocytaire se multiplie, augmentant ainsi la capacité de stockage de graisses associée à une augmentation du nombre et de la taille des adipocytes. (B) Pour les souris avec inactivation de *hmga2*, la prolifération des pré-adipocytes ne se fait pas normalement et les souris naissent avec un phénotype *pygmy* caractérisé par une petite taille et une perte drastique de la masse du tissu adipeux mature ; dans des conditions favorisant l'obésité, il n'y a pas d'expansion clonale des pré-adipocytes, l'augmentation de taille est seulement liée à l'hypertrophie des adipocytes.(C) Dans les adipocytes de lipomes, *hmga2* est anormalement surexprimé dans les adipocytes matures différenciés ce qui induit une dérégulation de la prolifération. D'après Ashar et al 2010 (Ashar, Chouinard et al. 2010).

1-2-7. Remaniements structuraux et numériques de *HMGA2*

Remaniements de la structure du gène *HMGA2*

La surexpression de *HMGA2* qui est décrite dans de nombreux types de tumeurs mésenchymateuses (TM) bénignes, mais également dans certaines tumeurs épithéliales bénignes, est associée à des remaniements chromosomiques, le plus souvent des translocations, ou parfois des insertions, inversions, délétions, dont un des points de cassure est le plus souvent dans le troisième intron de *HMGA2* (Kazmierczak, Wanschura et al. 1995), induisant l'expression d'une protéine tronquée ou d'une protéine chimérique issue de la fusion de *HMGA2* avec un gène partenaire variable. Dans les deux cas, la protéine conserve les sites fonctionnels de fixation à l'ADN de *HMGA2* qui sont codés par les trois premiers exons et perd la partie régulatrice négative située en 3'UTR de l'ARNm de *HMGA2* de même que la partie C-terminale de la protéine *HMGA2*. Des remaniements de la région 12q13-15 impliquant *HMGA2* sont décrits dans des lipomes (Sreekantaiah, Leong et al. 1991, Ashar, Fejzo et al. 1995, Schoenmakers, Wanschura et al. 1995, Wanschura, Dal Cin et al. 1997, Bartuma, Hallor et al. 2007), des léiomyomes utérins (Heim, Nilbert et al. 1988, Hennig, Rogalla et al. 1997), des hamartomes chondroïdes pulmonaires (Kazmierczak, Rosigkeit et al. 1996), des fibroadénomes mammaires (Staats, Bonk et al. 1996), des polypes endométriaux (Walter, Fan et al. 1989, Dal Cin, Wanschura et al. 1998), des adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Geurts, Schoenmakers et al. 1997, Geurts, Schoenmakers et al. 1997, Geurts, Schoenmakers et al. 1998) et des angiomyxomes vulvaires agressifs (Rabban, Dal Cin et al. 2006). *HMGA2* est également surexprimé, remanié et amplifié dans certaines tumeurs épithéliales bénignes telles que les adénomes hypophysaires (Finelli, Pierantoni et al. 2002, Pierantoni, Finelli et al. 2005).

Gènes partenaires de fusion de *HMGA2* dans les tumeurs bénignes.

Lorsque nous avons débuté nos travaux, très peu de gènes partenaires de fusion de *HMGA2* avaient été décrits dans les TM bénignes autres que les lipomes : *FHIT* (*fragile histidine triad protein*) dans les carcinomes-ex adénome pléomorphes des glandes salivaires (Geurts, Schoenmakers et al. 1997) localisé en 3p14.2, *RAD51B* localisé en 14q23 dans certains léiomyomes utérins (*RAD51 paralog B*) (Schoenmakers, Huysmans et al. 1999), *HEI10* (*Human enhancer of invasion-10*) localisé en 14q11 dans certains léiomyomes utérins (Mine, Kurose et al. 2001, Mine, Kurose et al. 2001), *LPP* (*Lipoma Preferred Partner*) localisé en 3q28 dans certains chordomes et hamartomes chondroïdes pulmonaires (Rogalla, Kazmierczak et al. 1998, Dahlen, Mertens et al. 2003). Si la détection du gène de fusion *HMGA2*-gène *X* est établie dans ces publications (Geurts, Schoenmakers et al. 1997, Rogalla, Kazmierczak et al. 1998, Schoenmakers, Huysmans et al. 1999, Mine, Kurose et al. 2001, Dahlen, Mertens et al. 2003), la détection du transcrit réciproque *X-HMGA2* est moins systématique et a plus précisément été publiée pour le gène de fusion *FHIT-HMGA2* et *RAD51B-HMGA2* (Geurts, Schoenmakers et al. 1997, Schoenmakers, Huysmans et al. 1999). Dans le cas particulier des lipomes,

alors que plus de 40 bandes chromosomiques ont été décrites comme fusionnant avec la région 12q13-15 (Bartuma, Hallor et al. 2007), seuls 5 gènes partenaires de fusion avaient été identifiés : *LPP* (Petit, Mols et al. 1996, Hatano, Morita et al. 2008)), *CXCR7* (*C-X-C chemokine receptor type 7*) localisé en 2q37 (Broberg, Zhang et al. 2002, Hatano, Morita et al. 2008)), *EBF* (Early B-cell factors) localisé en 5q33 (Nilsson, Mertens et al. 2006)), *LHFP* (*Lipoma HMGIC Fusion Partner*) localisé en 13q12 (Petit, Schoenmakers et al. 1999)) et *NFIB* (*Nuclear Factor I/B*) localisé en 9p22 (Nilsson, Panagopoulos et al. 2005, Italiano, Ebran et al. 2008). Le gène de fusion le mieux connu et le plus fréquent, *HMGA2-LPP*, issu de la translocation t(3;12)(q28;q14), représente environ 20% des cas de lipomes avec altération en 12q. *HMGA2* fusionne avec les domaines LIM de *LPP*. *LPP* est une protéine riche en proline qui se localise au niveau des zones de jonction focales ainsi qu'au niveau des zones de jonctions cellules-cellules. La protéine *LPP* est composée d'un motif *leucine-zipper* dans sa partie N-terminale et de trois régions LIM dans sa partie C terminale. La fusion avec *HMGA2* donne naissance à deux transcrits de fusion *HMGA2-LPP* et *LPP-HMGA2* (Petit, Mols et al. 1996).

Une première hypothèse suggère que la cassure du gène partenaire ou son activation intervient dans la pathogénie de ces tumeurs. Dans un certain nombre de cas, la troncation de *HMGA2* seule, et notamment la perte de son extrémité 3'UTR, est l'événement oncogénique principal. Les gènes de fusion potentiels sont très variés (une quarantaine de *loci* chromosomiques différents impliqués pour les lipomes (Bartuma, Hallor et al. 2007)) alors que le phénotype tumoral est le plus souvent identique d'un cas à l'autre de lipome « ordinaire ». Le gène partenaire ne semble pas avoir d'effet spécifique (Kazmierczak, Wanschura et al. 1995), à l'exception peut-être du gène *NFIB*, selon nos travaux (Italiano, Ebran et al. 2008), article 1 (Pierron, Fernandez et al. 2009)). Fedele et al (Fedele, Berlingieri et al. 1998) ont montré dans un modèle de fibroblastes murins que l'expression de la forme tronquée de *hmga2* qui conservait uniquement les domaines de fixation à l'ADN avait un potentiel de transformation équivalent à celui de la protéine chimérique issue du gène de fusion *hmga2-lpp* alors que la forme sauvage, non tronquée, de *hmga2* n'avait aucun pouvoir de transformation cellulaire. Il est à noter que le pouvoir oncogénique de *hmga2* tronquée est beaucoup plus faible (jusqu'à 30 fois moins de foyers induits) que celui d'oncogènes tels que *ras* ou *ret* ce qui est concordant avec la faible agressivité des tumeurs qui n'ont qu'un remaniement structural isolé de *HMGA2* (Fedele, Berlingieri et al. 1998).

Conséquences des remaniements structuraux de *HMGA2* sur la régulation de son expression par son extrémité 3'UTR.

Des premières données suggéraient la présence d'éléments de régulation négative en 3'UTR de *HMGA2* (Borrmann, Wilkening et al. 2001). Plus récemment, l'identification de plusieurs sites de fixation aux microARNs dans la partie 3'UTR de l'ARNm de *HMGA2* est venue renforcer cette

hypothèse (Hebert, Norris et al. 2007, Lee and Dutta 2007, Mayr, Hemann et al. 2007, Wang, Zhang et al. 2007). Les microARN sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides capables de réguler négativement l'expression post-transcriptionnelle de certains gènes (Zhang, Pan et al. 2006). Ils s'apparient avec des ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation réprime la traduction de la protéine correspondante ou clive l'ARNm cible au milieu du site de fixation du miARN, mécanisme similaire au phénomène d'interférence. Les microARN sont impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques (développement, différenciation, croissance cellulaire, apoptose, métabolisme) et interviennent dans les mécanismes de carcinogenèse en tant qu'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs (Zhang, Pan et al. 2006). Plus particulièrement, 8 sites de fixation aux microARN *let-7* ont été identifiés dans la région 3'UTR de *HMGA2*. Les microARN *let-7* sont caractérisés par des niveaux d'expression à peine détectables chez l'embryon et une expression maximale dans les tissus différenciés de l'adulte (Miska, Alvarez-Saavedra et al. 2004), soit un profil d'expression en miroir de celle de *HMGA2*. Il a été démontré pour la première fois en 2007 que des mutations inactivatrices de ces sites, de même que l'inactivation fonctionnelle des *let-7*, entraînaient la surexpression de l'ARNm de *HMGA2* en réduisant sa dégradation dans des lignées de carcinomes pulmonaires humains et une lignée de carcinome indifférencié humaine (Lee and Dutta 2007, Mayr, Hemann et al. 2007). Ainsi les remaniements structurels de *HMGA2* observés dans de nombreuses TM bénignes pourraient expliquer l'activation de l'expression de *HMGA2* par la délétion de la partie 3'UTR du gène.

Anomalies du nombre de copies de *HMGA2* et tumorigenèse.

Un autre mécanisme de surexpression tumorale de *HMGA2* est l'amplification de tout ou d'une partie du gène. Parfois un gain de copies du gène remanié est constaté (prolactinomes (Finelli, Pierantoni et al. 2002)). L'amplification a été décrite dans des tumeurs de malignité intermédiaire (chordomes (Shadan, Mascarello et al. 2000)) mais surtout dans des tumeurs malignes (carcinomes-ex adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Roijer, Nordkvist et al. 2002, Persson, Andren et al. 2009), ostéosarcomes (Kools and Van de Ven 1996, Gisselsson, Hoglund et al. 1998, Wei, Lonardo et al. 1999), fibrosarcomes (Gisselsson, Hoglund et al. 1998), TLA/LBD (Dei Tos, Doglioni et al. 2000, Forus, Larramendy et al. 2001)). *HMGA2* est remanié avec conservation des trois premiers exons au moins et amplifié dans les TLA/LBD-LDD (Meza-Zepeda, Berner et al. 2001, Storlazzi, Mertens et al. 2003), les ostéosarcomes (Kools and Van de Ven 1996) et les rhabdomyosarcomes (Bouron-Dal Soglio, Rougemont et al. 2009).

En utilisant la méthode de FISH avec des sondes de fission (sondes « *break-apart* ») flanquant le gène *HMGA2*, notre équipe a observé en 2008, peu avant le début de mes travaux de thèse, le remaniement et l'amplification de *HMGA2* dans tous les cas d'une série de 38 LBD/LDD (Italiano,

Bianchini et al. 2008). D'une part ces résultats démontraient l'intérêt d'utiliser la méthode de FISH dans cette approche. En effet il est possible que les « puces » à ADN utilisées par d'autres équipes dans des séries de LBD/LDD n'aient pas couvert de manière assez exhaustive les différentes parties du gène HMGA2 et aient ainsi occulté le caractère quasi-systématique de ses altérations dans ces tumeurs. D'autre part, ces résultats, corrélés aux données de la littérature, ont conforté la nécessité d'étudier plus avant les mécanismes de dérégulation du gène *HMGA2* dans les TA bénignes et malignes.

2-TRAVAUX DE RECHERCHE

2-1. Etat du sujet de recherche lors du début de mes travaux de thèse

Le laboratoire de génétique des tumeurs solides du CHU de Nice dans lequel j'ai effectué ma thèse mène en parallèle une activité de diagnostic clinique et de recherche fondamentale. Une grande partie de ces deux activités complémentaires est consacrée à l'étude des tumeurs des tissus mous.

Caractérisation cytogénétique et génomique des TA malignes.

L'étude de la génomique des TA est un axe de recherche prioritaire du laboratoire, faisant suite aux travaux dans ce domaine de F. Pedeutour et de L. Bianchini ainsi que de plusieurs étudiants en thèse de Sciences, dont le Pr N. Sirvent et les Drs A. Italiano et G. Maire.

Caractérisation de l'amplicon 12q13-15 dans les TLA/LBD et LDD.

En effet, dès les années 1990, des travaux menés au sein du laboratoire ont montré l'implication constante du chromosome 12 (Pedeutour, Suijkerbuijk et al. 1993, Pedeutour, Merscher et al. 1994), ainsi que l'implication variable d'autres chromosomes (Pedeutour, Suijkerbuijk et al. 1994, Pedeutour, Forus et al. 1999, Forus, Bjerkehagen et al. 2001), dans la composition des chromosomes géants et des chromosomes en anneaux caractéristiques des TLA/LBD. Si la taille et la composition de ces chromosomes marqueurs est variable selon les tumeurs, leur point commun est l'amplification constante de la région 12q13-15. L'évolution des techniques d'analyse de l'ADN depuis le caryotype à la cytogénétique moléculaire (technique de FISH), les techniques de PCR puis la CGH ont permis d'affiner la connaissance de ces chromosomes marqueurs ainsi que la composition de la région 12q14-15. Les travaux du laboratoire ont ainsi contribué à montrer la constante amplification dans les TLA/LBD et LDD du gène *MDM2*, considéré comme le gène « cible » de cette pathologie. Ces travaux ont également mis en évidence la présence d'autres régions chromosomiques amplifiées non contigües dans ces chromosomes marqueurs ainsi qu'une variabilité de l'origine de ces séquences chromosomiques (Pedeutour, Forus et al. 1999). Le rôle diagnostique de la détection de l'amplification des gènes *MDM2* et *CDK4*, dans la distinction des TLA/LBD de certains lipomes ou encore la distinction des LDD d'autres tumeurs indifférenciées malignes ont été mis en évidence (Coindre, Hostein et al. 2004, Hostein, Pelmus et al. 2004, Sirvent, Coindre et al. 2007). Plus particulièrement, notre équipe a montré que si la détection par IHC de *MDM2* et *CDK4* dans les TLA/LBD et LDD était dans la grande majorité des cas fiable, avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité, la détermination de l'amplification des deux gènes par les techniques de qPCR

et le FISH (Sirvent, Coindre et al. 2007) restait la référence notamment pour les cas douteux (par exemple surexpression focale de la protéine ou au contraire expression dans de nombreuses cellules mais de faible intensité).

Caractérisation des néocentromères des TLA/LBD et LDD.

Notre équipe s'est également intéressée aux mécanismes de transmission de ces chromosomes marqueurs durant la mitose et a constaté une transmission stable malgré l'absence de séquences alpha-satellites sur ces chromosomes surnuméraires (Sirvent, Forus et al. 2000). Une fonction centromérique a été démontrée par la détection de kinétochores reflétés par la positivité du marquage anti-CENPC (centromère protéine C) dans les cas de TLA/LBD. La présence de ces séquences stables non alphacentromériques est une caractéristique des TLA/LBD. Notre équipe a montré que ces séquences provenaient d'autres chromosomes que le chromosome 12 et présentaient une origine chromosomique variable sans impliquer de séquence d'ADN spécifique (Italiano, Maire et al. 2009).

Mise en évidence de TA aux anomalies génétiques intermédiaires entre lipomes et TLA/LBD.

Notre équipe a également décrit des lipomes aux anomalies cytogénétiques particulières indiquant l'existence de TA à génomique intermédiaire entre lipome et TLA/LBD. En effet, ces lipomes présentaient des gains et remaniements complexes de la région 12q13-15. A la différence des TLA/LBD, ces gains étaient toujours modérés (<10 copies), en dessous du seuil habituellement considéré comme une amplification, et les gains de *MDM2* et *CDK4* ne se traduisaient pas par la surexpression des protéines respectives de ces gènes. Certains de ces lipomes (5/8) présentaient également des anomalies structurales de *HMGA2* (5/8)(Italiano, Cardot et al. 2007). L'analyse de ces tumeurs particulières a permis de montrer que le gain modéré de la région 12q13-15 ne suffisait pas à l'acquisition d'un phénotype malin et démontrer l'existence de TA aux anomalies génomiques intermédiaires entre les lipomes et les LPS. Ainsi, il semblerait que certains lipomes rassemblent des éléments préliminaires génomiques qui auraient pu les entraîner vers la voie de la malignité, mais que, sans CMS munis de néocentromères et capables de porter les amplicons, ces tumeurs restent des lipomes et ne se transforment jamais en TLA/LBD.

***HMGA2* est un partenaire constant de l'amplification de *MDM2* alors que *CDK4* appartient à un amplicon distinct fréquent mais non constant.**

L'analyse systématique par FISH de 38 cas de LBD et LDD avec 17 sondes FISH qui couvrent la région 12q13-15 a permis de confirmer l'amplification constante de *MDM2*. Cette analyse a démontré pour la première fois la constance de l'amplification de *HMGA2* (au niveau de ses trois premiers exons). Cette observation était surprenante à l'époque car il était alors plus volontiers admis que des gènes tels que *CDK4* ou *YEATS4* étaient les partenaires de co-amplification de *MDM2*.

Cette analyse a permis de préciser la structure génomique complexe de la région 12q13-15 dans les TLA/LBD et LDD de même que le niveau d'amplification élevé des oncogènes identifiés. Cette analyse montrait également le caractère discontinu de l'amplification de cette région qui associe des amplicons distincts de taille variable selon les tumeurs (Italiano, Bianchini et al. 2008).

Dans l'étude d'une autre série de 188 TLA/LBD et LDD (Italiano, Bianchini et al. 2009), notre équipe a complété les observations précédentes et montré que *CDK4* n'était pas co-amplifié avec *MDM2* dans 24% des cas. L'amplification de *CDK4* était de plus significativement associée aux LDD et aux tumeurs de localisation profonde. L'absence d'amplification de *CDK4* n'était pas associée à des anomalies génétiques potentiellement substitutives telles que les délétions de *RB1* ou *CDKN2A* ou encore l'amplification de *CCND1*. Au contraire, en utilisant les techniques de RT-PCR et d'IHC, notre équipe a montré une surexpression fréquente de p16 et *CCND1* et une perte d'expression fréquente de *RB1* indépendamment du statut d'amplification de *CDK4* dans ces tumeurs.

Ainsi, ces travaux confortaient l'hypothèse d'un rôle non négligeable, mais secondaire de *CDK4* dans les TLA/LBD et étayaient l'intérêt d'étudier de manière plus approfondie le rôle de *HMGA2* dans ces tumeurs.

Caractérisation cytogénétique et génomique des TA bénignes.

Les travaux de notre laboratoire avaient également porté sur la caractérisation génétique des TA bénignes. En effet, la compréhension des anomalies à l'origine de la dérégulation de la prolifération cellulaire qui caractérise les tumeurs bénignes permet d'appréhender la complexité des mécanismes qui conduisent à la transformation cellulaire caractéristique des tumeurs malignes. Les travaux de notre laboratoire ont notamment consisté en la description des anomalies structurales récurrentes dans les lipomes (caractérisation des points de cassure en 12q13 (Merscher, Marondel et al. 1997), étude des del 13q caractéristiques des lipomes à cellules fusiformes (Dumollard, Ranchere-Vince et al. 2001), caractérisation de lipomes sans anomalie apparente de la région 12q13-15 (Foa, Mainguene et al. 2002)). Un intérêt particulier a été porté sur les gènes partenaires de fusion du gène *HMGA2*, en identifiant notamment le gène *NFIB* non seulement comme un partenaire récurrent de *HMGA2* mais aussi pouvant être corrélé à des localisations profondes ou des tailles volumineuses (Italiano, Ebran et al. 2008).

2-2. Rôle de *HMGA2* et de ses partenaires de fusion dans la tumorigénèse des lipomes

Article 1

A. Pierron, C. Fernandez, **E. Saâda**, F. Keslair, G. Hery, H. Zattara, F. Pedeutour. *HMGA2-NFIB* fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of NFIB alteration in a large deep-seated adipocytic tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Nov;195(1):66-70.

Article 2

L. Bianchini, L. Birtwisle, **E. Saâda**, A. Bazin, E. Long, J-F. Roussel, J-F. Michiels, F. Forest, C. Dani, O. Myklebost, I. Birtwisle-Peyrottes, F. Pedeutour. Identification of *PPAP2B* as a Novel Recurrent Translocation Partner Gene of *HMGA2* in Lipomas. *Genes Chromosomes and Cancer*, 2013. Jun;52(6):580-90.

Nous avons vu que les anomalies chromosomiques dans les TM bénignes sont très diverses, mais qu'elles sont dominées par les remaniements du gène *HMGA2*.

Dans les lipomes, l'altération la plus fréquente est une t(3;12)(q28;q14.3) entraînant la fusion de *HMGA2* et du gène *LPP*. Outre l'intérêt diagnostique, l'identification et la caractérisation des autres gènes partenaires de fusion de *HMGA2* permettent d'apporter des indices précieux à la compréhension des mécanismes de dérégulation de *HMGA2*.

Une première partie de notre travail a été consacrée à la caractérisation de deux gènes partenaires de fusion de *HMGA2* dans les lipomes, *NFIB* et *PPAP2B*.

Article 1 :

Dans ce premier manuscrit, en utilisant les techniques de FISH et RT-PCR, nous avons mis en évidence la fusion de *HMGA2* avec le gène *NFIB* (9p22) dans un cas de lipome pédiatrique avec translocation (9;12)(p22;q14). Une première particularité est la survenue de ce lipome chez un enfant alors que les lipomes pédiatriques sont particulièrement rares. Ce lipome était de localisation profonde et de taille inhabituellement grande, caractéristiques anatomiques qui étaient également retrouvées dans la série de lipomes de l'adulte précédemment décrite par notre équipe (Italiano, Ebran et al. 2008) pour lesquels la fusion de *HMGA2* et *NFIB* avait également été mise en évidence. Le rôle connu de *NFIB* dans d'autres modèles tumoraux (adénomes pléomorphes des glandes salivaires (Geurts, Schoenmakers et al. 1998), carcinomes adénoïdes kystiques du sein (Miyai, Schwartz et al. 2014) ou des glandes salivaires (Stenman 2013), pathologies myéloprolifératives (Rice, Lin et al. 2011), carcinomes à petites cellules (Dooley, Winslow et al. 2011), cancers du sein triple négatif (Han, Jung et al. 2008)) est un argument supplémentaire pour soutenir un rôle potentiel de *NFIB* dans la biologie particulière de ces tumeurs.

Ce rôle particulier dans les lipomes est d'autant plus probable que *NFIB* est potentiellement impliqué dans l'adipogenèse. En effet, l'inhibition de l'expression de *NFIB* ou de *NFIA* dans des lignées de pré-adipocytes (3T3-L1) supprime l'induction de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire (*PPARγ* et *C/EBPα*) ainsi que l'accumulation de vacuoles lipidiques dans ces cellules (Waki, Nakamura et al. 2011). Cependant, la survenue d'un codon stop à proximité en aval du point de fusion entre les quatre premiers exons de *HMGA2* et l'exon 9 de *NFIB* (Nilsson, Panagopoulos et al. 2005, Italiano, Ebran et al. 2008) laisse également supposer que la troncation de *HMGA2* est en elle-même primordiale pour la genèse de ces tumeurs (Fedele, Berlingieri et al. 1998, Arlotta, Tai et al. 2000).

HMGA2–*NFIB* fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of *NFIB* alteration in a large deep-seated adipocytic tumor

Anne Pierron^{a,b}, Carla Fernandez^c, Esma Saada^{a,b}, Frédérique Keslair^{a,b}, Géraldine Hery^d,
Hélène Zattara^e, Florence Pedetour^{a,b,*}

^aLaboratory of Solid Tumor Genetics, Nice University Hospital, Faculty of Medicine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 2, France

^bCNRS, UMR 6543, Faculty of Medicine, University of Nice Sophia-Antipolis, Nice, France

^cDepartment of Pathology and Neuropathology, CHU Timone, AP-HM, and University of the Mediterranean, Marseille, France

^dDepartment of Pediatric Surgery, CHU Timone, AP-HM and University of the Mediterranean, Marseille, France

^eDepartment of Genetics, CHU Timone, AP-HM, and University of the Mediterranean, Marseille, France

Received 5 May 2009; received in revised form 4 June 2009; accepted 5 June 2009

Abstract

Lipomas are frequently characterized by aberrations of the 12q13~q15 chromosomal region and often by rearrangements of the *HMGA2* gene. These rearrangements include the formation of chimeric genes that fuse the 5' region of *HMGA2* with a variety of partners, such as *LPP* (3q28) or *NFIB* (9p22). We describe here the fourth reported case of lipoma showing a *HMGA2*–*NFIB* fusion, and the first one in a child. We found a translocation t(9;12)(p22;q14) in a deep-seated intramuscular lipoma occurring in the buttock of a 5-year-old boy. By fluorescence in situ hybridization and reverse-transcription polymerase chain reaction, we have shown that the translocation t(9;12) resulted in an in-frame fusion of the first four exons of *HMGA2* with the last exon of *NFIB*. Intramuscular lipomas are very rare in childhood. Our results confirm that lipomas containing *NFIB* rearrangements may be related to peculiar clinicohistologic features, including large size, deep situation, infiltration of surrounding muscles, or precocious occurrence. Both the truncation of *HMGA2* and the nature of its fusion partner gene might be relevant in the adipose tissue tumorigenesis. © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lipomas are the most common benign mesenchymal adipose tissue tumors in adults. They are usually observed in the fifth to seventh decades of life. In contrast, lipomas in children are rare [1]. Approximately 30 cases of pediatric lipomas have been described in the literature. These cases are remarkable because of their unusual characteristics, and they may not faithfully reflect the status of lipomas in children. Some were reported because of their large size [2,3] or the kinetics of their growth [4]. Some other cases displayed atypical topography, such as cerebellopontine angle [5], middle ear [6], omentum [2], medial canthus [7], pericardia [4], tuber cinereum [8], retroperitoneum [9], or nerve [3]. These unusual locations may cause compressions or obstructions [2,3]. Intramuscular [7,10], infiltrating [11], or multiple lipomas have also been described, often part of more complex neonatal malformative syndromes [5,12,13].

The cytogenetic and molecular information concerning pediatric lipomas is scarce. Vanni et al. [14] reported the

case of a deep-seated lipogenic tumor in a 3-year-old child, the karyotype of which showed a reciprocal translocation t(8;12)(q13;q15) as the sole chromosomal abnormality. Bao and Miles [10] described a three-way translocation t(1;4;12)(q25;q27;q15) in an intramuscular lipoma from a 8-year-old girl. Peulve et al. [15] observed both trisomy 19 and tetrasomy 1q in all metaphases analyzed in a case of myxolipoma in a 3-year-old girl. In addition, Bartuma et al. [16] reported six cases of lipomas in patients younger than 15 years, including two cases with 12q13~q15 rearrangements, one case with 6p abnormality, and three variant alterations.

Here we report a case of a deep-seated pediatric lipoma presenting a rearrangement of *HMGA2* and *NFIB* genes.

2. Materials and methods

2.1. Case report

A 5-year-old boy presented a palpable mass in the left buttock. Magnetic resonance imaging showed a well-delineated multilobulated mass adjacent to the gluteus

* Corresponding author. Tel.: +33-4-93377012; fax: +33-4-93377007.
E-mail address: pedetou@unice.fr (F. Pedetour).

maximus and gluteus medius. The two main nodules measured 50×50 mm and 65×50 mm. The patient was treated by marginal excision of the lesion. Macroscopically, the tumor was fragmented and skeletal muscle was attached to some fragments. It weighed 97 g. On cross section, the tumor appeared pale yellow. Histologically, the tumor was ill-demarcated and showed an infiltrative growth pattern, entrapping the surrounding muscle fibers. It was composed of mature adipocytes (Fig. 1A). There was no pronounced lobulated pattern typical of lipoblastoma. Nuclear atypia, myxoid changes and lipoblasts were absent. The diagnosis was lipoma with an intramuscular component. At 1 year after excision, there was no sign of clinical or radiologic recurrence.

2.2. Molecular cytogenetic analysis

A fresh fragment of the tumor was prepared for cytogenetic analysis. Tumor tissue was disaggregated and cells from short-term cultures (7 days) were used for metaphase chromosomes preparations according to established procedures. Five metaphase cells were analyzed by reverse banding using heat and Giemsa (RHG).

Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed on interphase nuclei using *HMGA2* and *NFIB* break-apart probes, as well as a probe for the *HMGA2*–*NFIB* fusion as described in Italiano et al. [17] (Table 1). Bacterial artificial chromosome (BAC) clones from the Roswell Park Cancer Institute library were selected according to their location in the University of California Santa Cruz genome browser (<http://genome.ucsc.edu>) and were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, <http://bacpac.chori.org>). Microscopic analysis was performed using a DM6000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The FISH images were processed using ISIS software (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

Table 1

Description of the fluorescence in situ hybridization probes used in the characterization of the pediatric lipoma

Probe name	Locus (chromosomal location)
RP11-30I11	<i>HMGA2</i> 5' region (12q14.3)
RP11-23C9	<i>HMGA2</i> exons 1–3 (12q14.30)
RP11-118B13	<i>HMGA2</i> 3' region (12q14.30)
RP11-298E19	<i>NFIB</i> 5' region (9p22.30)
RP11-355C15	<i>NFIB</i> exons 4–9 (9p22.30)
RP11-1140H24	<i>NFIB</i> 3' region (9p22.30)

The RP11 bacterial artificial chromosomes clones (BAC) are from the Roswell Park Cancer Institute library.

2.3. Reverse transcriptase–polymerase chain reaction and nucleotide sequence analyses

For reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, total RNA from a frozen fragment of the tumor was isolated by using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from RNA and amplified (SuperScript one-step RT-PCR kit, Invitrogen) in a GeneAmp PCR system 2400 thermocycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA; Courtaboeuf, France) with 0.8 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L of each dNTP, and 1 μmol/L of each forward primer (*HMGA2*-2F: 5'-AACCGGTGAGCCCTCTCCTA-3') and reverse primers (*NFIB* 41475-005R: 5'-TGGCCGGTAA GATGGGTGTCCT-3' and *NFIB* 41475-006R: 5'-TGGA-CATTGGCGGGTAAGATGG-3').

The RT-PCR consisted of an initial reverse transcription for 30 minutes at 55 °C, immediately followed by denaturation (5 minutes at 95 °C), 45 cycles of amplification (denaturation, 94 °C for 30 seconds; annealing, 60 °C for 30 seconds; elongation, 72 °C for 30 seconds), and final elongation for 7 minutes at 72 °C. β-actin-specific primers (*ACTIN-F1*: 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA-3'

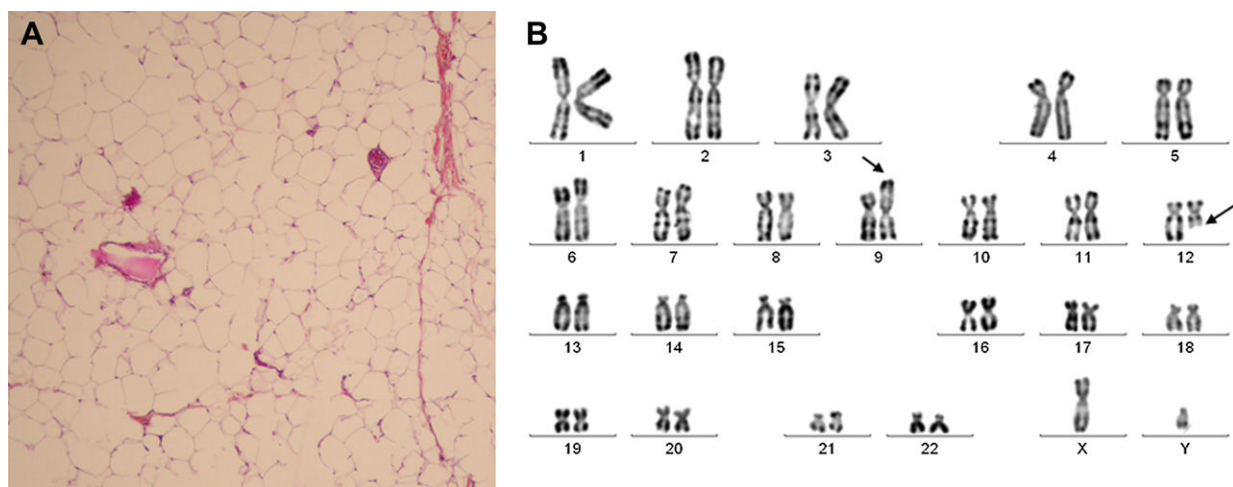


Fig. 1. (A) Pathologic findings in an intramuscular pediatric lipoma. The tumor was composed of mature fat cells with only slight variations in size and shape, typical of lipoma. No lipoblast was seen. (Hematoxylin–phloxin–safran stain; ×100). (B) The RHG-banded karyogram shows a translocation t(9;12)(p22;q14). Arrows indicate the der(9) and der(12) resulting from the translocation.

and ACTIN-R: 5'-GGGATAGCACAGCCTGGATAGCA-3') were used as quality control (amplification of a 196-bp sequence). Aliquots from RT-PCR products were visualized in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide after electrophoretic migration. The bands of interest were extracted from the gel, purified using an ultrafree DNA column (Millipore, Billerica, MA), cloned into pCR2.1-TOPO, and transformed into One Shot TOP10 *Escherichia coli* competent cells (Topo cloning kit for sequencing; Invitrogen, Carlsbad, CA). The clones were screened by PCR using M13 forward primer (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') and M13 reverse primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') and sequenced by using the Sequenase kit version 2.0 (USB, Cleveland, OH).

3. Results

3.1. Cytogenetic and FISH analysis

The karyotypic analysis showed a translocation involving the short arm of chromosome 9 and the long arm of chromosome 12 (Fig. 1B). The karyotype was 46,XY,t(9;12)(p22;q14). From FISH analysis using break-apart probes for *NFIB* and *HMGA2*, we observed a rearrangement of both *HMGA2* (Fig. 2A) and *NFIB* (Fig. 2B). Furthermore, by using probes RP11-23C9 and RP11-355C15, covering the *HMGA2* exons 1–3 and *NFIB* exons 4–9, we detected by FISH analysis a juxtaposed green–red signal corresponding to a fusion of *HMGA2* with *NFIB* (Fig. 1C).

3.2. Molecular analysis

The sequencing of the RT-PCR products obtained by using forward primers for *HMGA2* (HMGA2-2F) and reverse primers for *NFIB* (NFIB 41475-005R and NFIB 41475-006R) showed an in-frame fusion of the first four exons of *HMGA2* with exon 9 of *NFIB* (Fig. 3), indicating a genomic rearrangement within intron 4 of *HMGA2*.

4. Discussion

Cytogenetic studies have shown that lipomas are characterized by clonal chromosomal aberrations in approximately two thirds of the cases. A majority of these aberrations, mainly translocations and inversions, involves the chromosome segment 12q13~q15, which recombines with a variety of chromosomal regions. The *HMGA2* gene is the main target of these aberrations. Preferential break-points are clustered in the large third intron of this gene, leading to the formation of chimeric transcripts that include the 5' part of *HMGA2* [18,19]. The preferred rearrangement in lipomas is the translocation t(3;12)(q28;q14~q15), which fuses *HMGA2* to *LPP* [20]. *HMGA2* has also been reported to form fusion genes with *CXCR7* (2q37), *EBF1* (5q33), and *LHFP* (13q12) [21–23]. *HMGA2*–*NFIB* fusion genes were first described in pleomorphic adenomas of the salivary glands [24], before being also identified in lipomas [17,25]. *NFIB* (nuclear factor I/B) belongs to the nuclear factor family and is localized in a fragile chromosomal region (9p22.2). Translocation (9;12) has been observed in only 1–2% of the lipomas [16,17,25], mainly in adult patients.

In lipomas, four cases presenting a rearrangement of *NFIB* have been described [17,25], and two different *HMGA2*–*NFIB* fusion genes have been identified by 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR. The first reported case involved the first four exons of *HMGA2* and exon 9 of *NFIB* [25]. The second fusion gene, identified in our laboratory, was made up of the first three exons of *HMGA2*, exon 6 of *MSRB3* (12q14.3), and the last exon of *NFIB* [17]. In both cases, a stop codon was present on the 3' side shortly after the fusion point of *HMGA2* with *NFIB* or *MSRB3*, respectively. Note that fusion genes involving *HMGA2* and *NFIB* have previously been identified in pleomorphic adenomas with the presence of a stop codon located a few codons downstream the breakpoint [24].

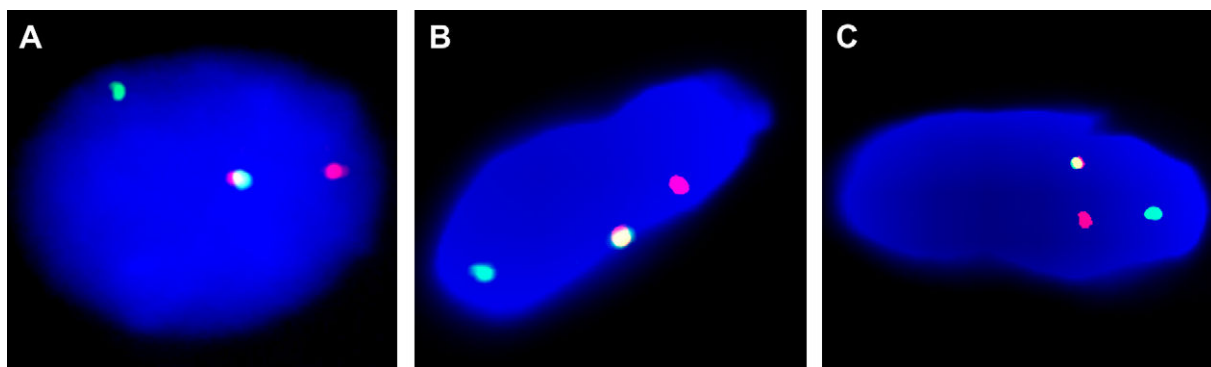


Fig. 2. Rearrangements of *HMGA2* and *NFIB* identified by interphase fluorescence in situ hybridization analysis in a case of pediatric lipoma. (A) RP11-30I11 (green signal) and RP11-118B13 (red signal) probes flank *HMGA2*. The juxtaposed red–green signal corresponds to the normal *HMGA2* allele and the split signal to the *HMGA2* rearrangement. (B) RP11-1140H24 (green signal) and RP11-298E19 (red signal) probes flank *NFIB*. The juxtaposed red–green signal corresponds to the normal *NFIB* allele and the split signal to the *NFIB* rearrangement. (C) A juxtaposed red–green signal corresponding to RP11-23C9 (red signal) containing the first three exons of *HMGA2* and RP11-355C15 (green signal) containing the last six exons of *NFIB* indicates a fusion of *HMGA2* with *NFIB*.

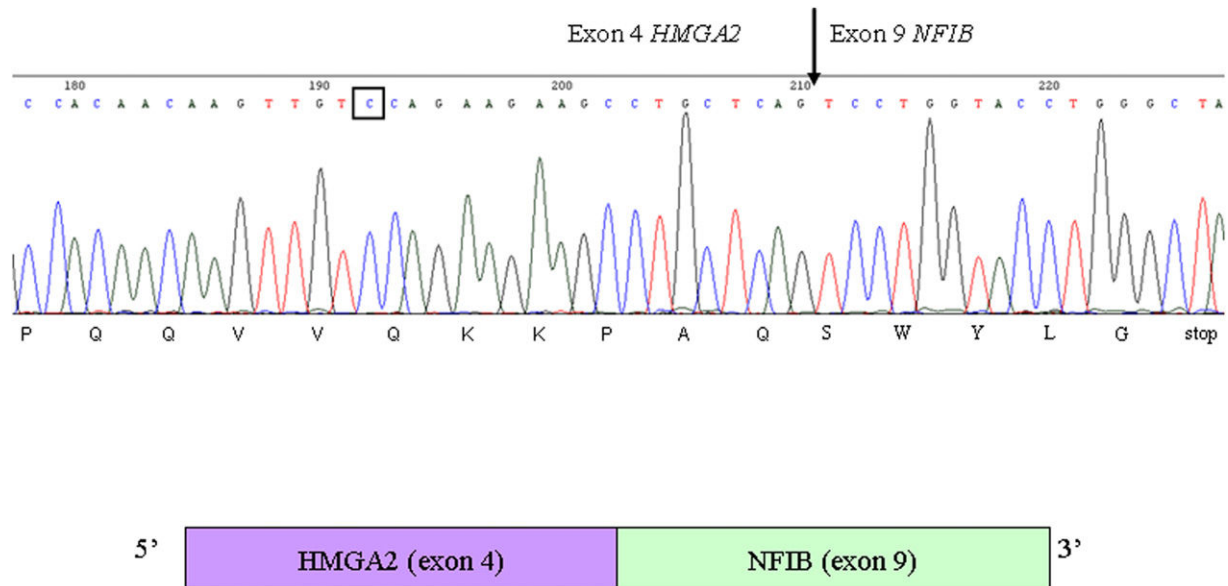


Fig. 3. Sequencing of the polymerase chain reaction product showing the in-frame fusion transcript between exon 4 of *HMGA2* and exon 9 of *NFIB*. The arrow indicates the fusion point; the square indicates a substitution of a nucleotide.

In the pediatric lipoma studied here, the sequence analysis of the *HMGA2*–*NFIB* fusion gene revealed that the chimeric transcript was identical to some described previously in pleomorphic adenomas of the salivary glands [24] and in lipomas [25]. This fusion gene involved the first four exons of *HMGA2* and exon 9 of *NFIB*, with a stop codon close to the breakpoint. The presence of this stop codon located shortly 3' after the fusion point suggests that this aberration induces a deregulation of the expression of the DNA-binding 5' elements of *HMGA2*. The role of the fused sequences might therefore be limited to providing the necessary elements for proper translation of the hybrid transcripts, such as a translational stop codon and a polyadenylation signal. Furthermore, the 3' untranslated region (UTR) of *HMGA2* contains fixation sites for let-7, a microRNA specifically involved in the posttranscriptional repression of *HMGA2* [26]. Furthermore, a recent study shows that let-7 plays a role in adipocyte differentiation [27].

It is noteworthy that, in the *HMGA2*–*NFIB* fusion gene described here, the fourth exon of *HMGA2* contains a mutation of one nucleotide, a substitution of a thymine by a cytosine (Fig. 3). This is a silent mutation, in that the amino acid (valine) is not modified. The significance of this change is unknown.

NFIB is located in a fragile region (9p22) and is amplified or overexpressed in several tumors, including esophageal cancer [28], prostate cancer [29], and breast cancer [30], as well as in polycythemia vera [31]. *NFIB* is a recurrent target for 9p22 rearrangements in lipomas, with or without *HMGA2* rearrangements [17,25]. In all of the cases described in the literature, lipomas presenting a rearrangement of *NFIB* were unusual, displaying a very large size or located in unusual anatomic sites (e.g., retroperitoneum,

colon) or deep-seated. Moreover, the lipoma with a t(9;12)(p22;q14) described by Bartuma et al. [16] in a 13-year-old child was large and deep-seated. Our case is also a rare type of lipoma, present at a young age of life, large and deep-seated. The fact that *NFIB* can be rearranged independently of *HMGA2* in large and deep-seated lipomas suggests a specific role of *NFIB* in the tumorigenesis of some lipomas.

Intramuscular and infiltrating lipomas are relatively rare, compared with superficial lipomas, and have been reported to comprise 1.8% of all fatty tumors [32]. Infiltrating lipomas are more common after 30–40 years of age. Lipomas are generally located superficially in subcutaneous fat but they can also be situated deeply in muscles or on the surface of bones, or, rarely, in visceral and other organ sites. Generally, lipomas are smaller than 5 cm (80% of cases), with only 1% of lesions greater than 10 cm in size [33].

In conclusion, the case presented here tends to confirm that *NFIB* rearrangements are probably associated with deep-seated and large lipomas, but this observation needs further confirmation. Moreover, not only the truncation of *HMGA2* but also the nature of its fusion partner gene might be relevant in the adipose tissue tumorigenesis.

Acknowledgments

This work was supported by the French Association for Research on Cancer (Association pour la Recherche sur le Cancer; ARC no. 4008 to F.P.), the French National Cancer Institute (Institut National du Cancer; projet libre GEN-OSTT), and the General Council of the Department Alpes-Maritimes (Conseil Général des Alpes-Maritimes).

References

- [1] Lipoma. In: Weiss SW, Goldblum JR, Enzinger FM, editors. *Enzinger and Weiss's soft tissue tumors*. 5th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2008. pp. 431–6.
- [2] Giubilei D, Cicia S, Nardis P, Patane E, Villani RM. Lipoma of the omentum in a child. *Radiology* 1980;137:357–8.
- [3] Bonneau LA, Delatte SJ, Bentz ML. Intraneural lipoma of the ulnar nerve. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:40e–1e.
- [4] Trusen A, Beissert M, Schultz G, Ergezinger K, Marx A, Darge K. Progressively enlarging pericardial lipoma in a child. *Br J Radiol* 2004;77:68–70.
- [5] Amonkar PP, Kiran KVV, Patil JA, Merchant SA. Cerebellopontine angle lipomas, multiple pigmented nevi, and temporal lobe hypoplasia: a new neurocutaneous syndrome? *AJR Am J Roentgenol* 1997;169:1429–30.
- [6] Edmonds JL, Woodroof JM, Ator GA. Middle-ear lipoma as a cause of otomastoiditis. *J Laryngol Otol* 1997;111:1162–5.
- [7] Shiraki K, Kamo M, Sai T, Kamo R. Rare site for an intramuscular lipoma. *Lancet* 2002;359:2077.
- [8] Chu AY, Rorke LB, Hood IC. Lipoma of the tuber cinereum. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:708–9.
- [9] Brunet C, Gourdeau Y, Hould F. Retroperitoneal lipoma in the child [In French]. *Can Med Assoc J* 1966;94:962–4.
- [10] Bao L, Miles L. Translocation (1;4)(q25;q27;q15) in a childhood intramuscular lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;158:95–7.
- [11] Leroisey Y, Choussy O, Gruyer X, Francois A, Marie JP, Dehesdin D, Andrieu-Guitrancourt J. Infiltrating lipoma of the head and neck: a report of one pediatric case. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999;47:91–5.
- [12] Puvabanditsin S, Garrow E, Applewhite L, Akpalu D, Quizon MC. Intracranial lipomas in neonate. *J Perinatol* 2002;22:414–5.
- [13] Buisson P, Leclair MD, Jacquemont S, Podevin G, Camby C, David A, Heloury Y. Cutaneous lipoma in children: 5 cases with Bannayan–Riley–Ruvalcaba syndrome. *J Pediatr Surg* 2006;41:1601–3.
- [14] Vanni R, Marras S, Gambarella R, Ambu R, Faa G. Translocation (8;12)(q13;q15) in a pediatric tumour. *Dis Markers* 1992;10:101–4.
- [15] Peulve P, Thomine E, Hemet J. Cytogenetic analysis of a rare case of pediatric myxolipoma. *Ann Genet* 1990;33:222–4.
- [16] Bartuma H, Hallor KH, Panagopoulos I, Collin A, Rydholm A, Gustafson P, Bauer HC, Brosjö O, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:594–606.
- [17] Italiano A, Ebran N, Attias R, Chevallier A, Monticelli I, Mainguéné C, Benchimol D, Pedetour F. *NFIB* rearrangement in superficial, retroperitoneal, and colonic lipomas with aberrations involving chromosome band 9p22. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:971–7.
- [18] Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. Disruption of the architectural factor *HMGIC*: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57–65.
- [19] Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, *HMGIC*, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10:436–44.
- [20] Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van de Ven WJ. *LPP*, the preferred fusion partner gene of *HMGIC* in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 1996;36:118–29.
- [21] Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ. *LHFP*, a novel translocation partner gene of *HMGIC* in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics* 1999;57:438–41.
- [22] Broberg K, Zhang M, Strömbeck B, Isaksson M, Nilsson M, Mertens F, Mandahl N, Panagopoulos I. Fusion of *RDC1* with *HMG2* in lipomas as the result of chromosome aberrations involving 2q35–37 and 12q13–15. *Int J Oncol* 2002;21:321–6.
- [23] Nilsson M, Mertens F, Höglund M, Mandahl N, Panagopoulos I. Truncation and fusion of *HMG2* in lipomas with rearrangements of 5q32→q33 and 12q14→q15. *Cytogenet Genome Res* 2006;112:60–6.
- [24] Geurts JM, Schoenmakers EF, Röijer E, Aström AK, Stenman G, van de Ven WJ. Identification of *NFIB* as recurrent translocation partner gene of *HMGIC* in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 1998;16:865–72.
- [25] Nilsson M, Panagopoulos I, Mertens F, Mandahl N. Fusion of the *HMG2* and *NFIB* genes in lipoma. *Virchows Arch* 2005;447:855–8.
- [26] Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007;315:1576–9.
- [27] Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2009;23:925–31.
- [28] Yang ZQ, Imoto I, Pimkhaokham A, Shimada Y, Sasaki K, Oka M, Inazawa J. A novel amplicon at 9p23–24 in squamous cell carcinoma of the esophagus that lies proximal to *GASCI* and harbors *NFIB*. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:423–8.
- [29] Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, Wang W, Goodrich DW, Roy-Burman P, Nikitin AY. Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:7889–98.
- [30] Han W, Jung EM, Cho J, Lee JW, Hwang KT, Yang SJ, Kang JJ, Bae JY, Jeon YK, Park IA, Nicolau M, Jeffrey SS, Noh DY. DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:490–9.
- [31] Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9 p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30:229–36.
- [32] Fletcher CD, Akerman M, Dal Cin P, de Wever I, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Rosai J, Rydholm A, Sciort R, Tallini G, van den Berghe H, van de Ven W, Vanni R, Willen H. Correlation between clinicopathological features and karyotype in lipomatous tumors: a report of 178 cases from the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Collaborative Study Group. *Am J Pathol* 1996;148:623–30.
- [33] Rydholm A, Berg NO. Size, site and clinical incidence of lipoma: factors in the differential diagnosis of lipoma and sarcoma. *Acta Orthop Scand* 1983;54:929–34.

Article 2 :

Lors de l'étude rétrospective de caryotypes de lipomes analysés dans le laboratoire, nous avons identifié 15 cas comportant une $t(1;12)(p32;q14)$. Il s'agissait ainsi de la deuxième translocation la plus fréquente après la $t(3;12)$ qui implique *LPP*. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les points de cassure en 12q14 en utilisant plusieurs sondes BACs qui couvraient de manière différentielle les exons et introns de *HMGA2*. Nous montrons sur cette série une variabilité de la localisation des points de cassure qui étaient tous situés entre les deux extrémités 5' et 3' de *HMGA2* sauf pour un cas où le point de cassure était situé dans la région centromérique de l'extrémité 5' de *HMGA2*. Nous avons ensuite caractérisé le gène partenaire situé en 1p32 en privilégiant une technique d'approche du gène candidat. Nous avons considéré que *JUN* (1p32.1), qui est amplifié dans environ un tiers des LDD (Mariani, Brennetot et al. 2007) était un gène potentiellement intéressant tout comme *ACOT11* (Acyl-coenzyme A thioesterase 11) localisé en 1p32.3 (Kirkby, Roman et al. 2010) dont la protéine est impliquée dans le métabolisme des acides gras chez les mammifères. En analysant les sondes FISH correspondant à ces gènes sur des métaphases de lipomes avec $t(1;12)(p32;q14)$, nous avons établi que le point de cassure en 1p était télomérique de *JUN* et centromérique de *ACOT11*. Nous avons ensuite utilisé la technique de clonage positionnel sur la région du bras court du chromosome 1 délimitée par ces deux gènes. En utilisant la cartographie du génome, nous avons mis en évidence que seul le gène *PPAP2B* (*Phosphatidic Acid Phosphatase type 2B*, 1p32) était orienté correctement pour former un gène de fusion potentiel avec *HMGA2*. Dans 11 cas avec $t(1;12)$, les points de cassure étaient dispersés sur une région télomérique de l'extrémité 3'UTR de *PPAP2B*. Un cas avec $t(1;12)$ présentait un point de cassure au sein de *PPAP2B* suggérant l'existence d'un possible gène de fusion *HMGA2-PPAP2B*. Nous avons confirmé la présence d'un transcrit *HMGA2-PPAP2B* pour ce cas par Reverse Transcriptase-PCR et séquençage nucléotidique. Nous avons localisé les points de cassure dans la partie 3'UTR de *HMGA2* et l'exon 6 de *PPAP2B* pour l'unique lipome de notre série présentant une cassure au sein du gène *PPAP2B*. L'analyse de l'expression de l'ARNm de *HMGA2* dans les 7 cas pour lesquels du tissu congelé était disponible a montré une surexpression systématique des deux premiers exons de *HMGA2*. L'expression de l'ARNm de *PPAP2B* était au contraire variable selon les cas, indépendamment de la localisation du point de cassure. En l'absence de matériel tumoral congelé disponible pour ce cas particulier avec fusion *HMGA2-PPAP2B*, nous n'avons pas pu mesurer l'expression de l'ARNm de *PPAP2B* dans ce cas particulier. La mise au point de la détection de la protéine PPAP2B par IHC a également été infructueuse du fait d'un manque de spécificité de l'anticorps commercialisé que nous avons testé. Nos résultats suggèrent que l'événement oncogénique essentiel dans ces lipomes est bien la troncation de *HMGA2*. *PPAP2B* n'était pas amplifié dans les cas de LBD/LDD avec amplification de *JUN* que nous avons analysés suggérant que *PPAP2B* n'appartient pas à l'amplicon

de *JUN* dans ces tumeurs. Nos résultats concernant ce gène sont originaux car le rôle de *PPAP2B* dans l'oncogenèse des TA n'avait jusqu'à ce moment-là jamais été décrit. En effet ce gène a été impliqué dans un nombre très restreint de modèles d'oncogenèse (carcinomes ovariens (Tanyi, Morris et al. 2003), médulloblastomes (Zhou, Picard et al. 2010), glioblastomes (Chatterjee, Humtsoe et al. 2011), gliomes anaplasiques (Torres-Martin, Pena-Granero et al. 2014) et cancer du poumon (Yongjun Zhang, Zhang et al. 2013)).

Parce que *PPAP2B* code pour une lipide phosphate phosphatase, nous avons également exploré son rôle potentiel dans l'adipogenèse. En effet, *PPAP2B* hydrolyse les phospholipides bioactifs tels que l'acide lysophosphatidique et la sphingosine-1-phosphate.

Nous avons émis l'hypothèse que *PPAP2B*, tout comme les deux autres membres de sa famille, *PPAP2A* et *PPAP2C*, pouvaient être également impliqués dans l'adipogenèse.

Cette hypothèse a pu être vérifiée à l'occasion du travail de master 2 de Sandrine Boutruche sous la direction de Laurence Bianchini en 2013. Leurs travaux ont mis en évidence, que contrairement à ce qui était observé sur des lignées cellulaires de préadipocytes murins (Simon, Rey et al. 2002), l'expression de *PPAP2B* et de *PPAP2A* dans les lignées de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMADs) augmentait au cours de la différenciation adipocytaire alors qu'elle diminue au cours de la différenciation ostéogénique de ces mêmes cellules. *PPAP2B* jouerait également le rôle de régulateur négatif de la conversion tissu adipeux blanc/tissu adipeux brun. Un autre résultat original de ces travaux est la mise en évidence d'une surexpression différentielle de ces gènes au sein des TLA/LBD et LDD : *PPAP2B* était en effet surexprimé dans les TLA/LBD alors que *PPAP2C* était surexprimé dans les LDD. Ces résultats fournissent un nouvel exemple de possible chevauchement entre les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme cellulaire et celles impliquées dans l'oncogenèse.

Identification of *PPAP2B* as a Novel Recurrent Translocation Partner Gene of *HMGA2* in Lipomas

Laurence Bianchini,^{1,2*} Loïc Birtwisle,^{1,2} Esma Saâda,^{1,2,3} Audrey Bazin,^{1,2} Elodie Long,⁴ Jean-François Roussel,⁵ Jean-François Michiels,⁶ Fabien Forest,⁷ Christian Dani,⁸ Ola Myklebost,⁹ Isabelle Birtwisle-Peyrottes,¹⁰ and Florence Pedetour^{1,2}

¹Laboratory of Solid Tumors Genetics, Nice University Hospital, Nice, France

²Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS UMR 7284/INSERM UI081, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

³Medical Oncology Department, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

⁴Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Human Tissue Biobank/CRB INSERM, Nice University Hospital, Nice, France

⁵Department of Pathology, Princess Grace Hospital, Monaco, Monaco

⁶Central Laboratory of Pathology, Nice University Hospital, Nice, France

⁷Department of Pathology and Tumor BioBank (CRB-TK 42), Saint Etienne University Hospital, Saint-Etienne, France

⁸Institute of Biology Valrose, UMR7277 CNRS/UMRI091 INSERM/University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

⁹Department of Tumor Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

¹⁰Laboratory of Cytology and Pathology, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

Most lipomas are characterized by translocations involving the *HMGA2* gene in 12q14.3. These rearrangements lead to the fusion of *HMGA2* with an ectopic sequence from the translocation chromosome partner. Only five fusion partners of *HMGA2* have been identified in lipomas so far. The identification of novel fusion partners of *HMGA2* is important not only for diagnosis in soft tissue tumors but also because these genes might have an oncogenic role in other tumors. We observed that t(1;12)(p32;q14) was the second most frequent translocation in our series of lipomas after t(3;12)(q28;q14.3). We detected overexpression of *HMGA2* mRNA and protein in all t(1;12)(p32;q14) lipomas. We used a fluorescence in situ hybridization-based positional cloning strategy to characterize the 1p32 breakpoint. In 11 cases, we identified *PPAP2B*, a member of the lipid phosphate phosphatases family as the 1p32 target gene. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis followed by nucleotide sequencing of the fusion transcript indicated that *HMGA2* 3' untranslated region (3'UTR) fused with exon 6 of *PPAP2B* in one case. In other t(1;12) cases, the breakpoint was extragenic, located in the 3' region flanking *PPAP2B* 3'UTR. Moreover, in one case showing a t(1;6)(p32;p21) we observed a rearrangement of *PPAP2B* and *HMGA1*, which suggests that *HMGA1* might also be a fusion partner for *PPAP2B*. Our results also revealed that adipocytic differentiation of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue was associated with a significant decrease in *PPAP2B* mRNA expression suggesting that *PPAP2B* might play a role in adipogenesis. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Lipomas are the most frequent mesenchymal tumors in humans. These benign adipose tumors occur mainly in the fourth to sixth decades. Most of them appear as small, well-circumscribed painless subcutaneous masses located in the upper back, neck, shoulders, arms or thighs. Occasionally they can be deeply situated, infiltrating the surrounding tissues or comprise a few atypical cells that make them difficult to distinguish from liposarcomas. Cytogenetic and molecular analyses are useful as complementary tools for differential diagnosis. Indeed, approximately two-thirds of lipomas are characterized by chromosomal aberrations (Mandahl et al., 1994; Fletcher et al., 2002). Among these lipomas exhibiting an abnormal karyotype, three major subgroups have been

described: structural rearrangements of the 12q14 region are detected in two-thirds of the cases, followed by anomalies of the 13q12-22 region (15%) and rearrangements of the 6p21 region (5%). Rearrangements of the 12q14 region include

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supported by: Association pour la Recherche sur le Cancer, Grant number: ARC 4008; Institut National du Cancer (projet libre "GENOSTT"); Cancéropôle Provence Alpes Côte d'Azur; Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur.

*Correspondence to: Laurence Bianchini, Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 02, France.

E-mail: laurence.bianchini@unice.fr

Received 25 November 2012; Accepted 6 February 2013

DOI 10.1002/gcc.22055

Published online 18 March 2013 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

translocations involving a large variety of chromosomal regions, inversions, insertions or deletions (Nishio, 2011; Mitelman et al., 2012). These rearrangements frequently result in fusion of the *HMGA2* (12q14.3) gene with several partner genes (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Fedele et al., 1998; Fletcher et al., 2002; Italiano et al., 2008b). Breakpoints have been reported to occur preferentially in the large third intron of *HMGA2* (Ashar et al., 1995) resulting either in the expression of a truncated protein lacking the acidic COOH-terminal region and the 3' untranslated region (3'UTR) or in the expression of a chimeric protein fusing the *HMGA2* AT-hooks domains to an ectopic sequence from the fusion partner (Ashar et al., 1995; Petit et al., 1996; Bartuma et al., 2007). Strikingly, although more than 40 chromosome bands have been described in rearrangements involving the 12q13-15 region in lipomas (Bartuma et al., 2007), only five genes have been identified as fusing with *HMGA2* so far: *LPP* (3q28), *CXCR7* (2q37), *EBF* (5q33), *LHFP* (13q12) and *NFIB* (9p22) (Petit et al., 1996, 1999; Broberg et al., 2002; Nilsson et al., 2005, 2006; Hatano et al., 2008; Italiano et al., 2008b). The most frequent fusion is *HMGA2-LPP*, detected in 20% of lipomas, which results in the fusion of the three AT-hooks of *HMGA2* to the LIM domains of *LPP*. *LPP*, for "Lipoma Preferred Partner," first identified in lipomas (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995) then in pulmonary chondroid hamartomas (Rogalla et al., 1998) as well as in chondroma (Dahlén et al., 2003), was subsequently found to be overexpressed in malignant tumors such as lung carcinomas (Choi et al., 2007) and sarcomas (Hussenet et al., 2006). Similarly, *NFIB* a gene that fused with *HMGA2* in pleomorphic adenomas of salivary glands (Geurts et al., 1998) and in t(9;12) lipomas (Nilsson et al., 2005; Italiano et al., 2008b; Pierron et al., 2009) was further shown to be overexpressed and oncogenic in small cell lung cancer (Dooley et al., 2011); amplified in a mouse model of prostate cancer (Zhou et al., 2006) and in patients with triple negative breast cancer (Han et al., 2008). Characterization of new fusion partners of *HMGA2* is therefore potentially useful for advances in molecular diagnosis of adipose tumors and for identification of candidate genes in malignant tumors. Here, we describe the identification of a novel recurrent translocation partner gene of *HMGA2* in lipomas showing t(1;12)(p32;q14) translocations.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetic, Histological, and Clinical Data

Sixteen cases were selected from our series of 418 lipomas analyzed between 1993 and 2012 at the Laboratory of Solid Tumor Genetics (Nice, France) because their RHG-banded karyotypes obtained from short term primary cell cultures showed the presence of a rearrangement of the 1p32 region and enough biological material was available for further fluorescence in situ hybridization (FISH) or expression analysis. These 1p32 rearrangements were either t(1;12)(p32;q14-15) (cases 1–15), sometimes in association with additional anomalies or t(1;6)(p32;p21) (case 16) (Table 1). The clinico-pathologic characteristics of the 16 cases are listed in Table 1. Histologically, all cases were ordinary lipomas. Atypias or lipoblasts were not detected. With the exception of one case showing intramuscular infiltration (case 5), and one case located in the caecal wall (case 12), no clinical or histological peculiar features were noted. All lipomas measured less than 15 cm in their largest axis (average size: 8 cm). In all cases, the diagnosis of lipoma was established according to the World Health Organization Classification of Tumors (Fletcher et al., 2002).

FISH Analyses

The FISH probes used in this study are listed in Table 2. We used sets of BAC probes located in the 12q14.3, 6p21, and 1p32.1-1p32.3 regions. The BAC clones from the Roswell Park Cancer Institute library were selected according to their location on the University of California Santa Cruz database (hg19, Feb. 2009, GRCh37 Genome 5 Reference Consortium Human Reference 37; <http://www.genome.ucsc.edu>) purchased from the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, <http://bacpacchori.org/>) or from Invitrogen (Carlsbad, CA) and prepared as probes for FISH analysis according to standard procedures. For each probe, the chromosomal location was verified by FISH on normal metaphases cells from peripheral blood lymphocytes. Microscopic analysis was performed using a DM6000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). FISH images were processed using the ISIS software (Metasystems, Altussheim, Germany).

RNA Isolation and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Twenty 5- μ M thick tissue sections from formalin-fixed paraffin embedded case 10 were

TABLE 1. Clinicopathologic and Cytogenetic Characteristics of 16 Cases of Lipomas with Ip32 Rearrangements

Case	Laboratory identification	Sex/age (year)	Size (cm)/weight (g)	Location	Partial RHG-banded karyotype	Breakpoint in <i>HMGA2</i> region ^a
1	93T639	M	ND	ND	t(1;12)(p32;q14)	+
2	09T089	M/56	14.5 × 6	Right calf	t(1;12)(p32;q14),del(13)(q14q31)	+
3	10T355	F/48	11 × 6 × 2/56	Right shoulder	t(1;12)(p32;q14)	+
4	10T777	M/61	14 × 9.5 × 3.5/134	Left hip	t(1;12)(p32;q14)	+
5	11T350	M/60	4.5 × 3.5 × 2/16	Right cheek	t(1;12)(p32;q14)	+
6	11T369^b	M/17	4 × 3.5 × 2.5/10	Right arm	Complex rearrangement involving 1p;7q;12q	+
7	11T874	F/38	9 × 6.5 × 3.5/61	Right shoulder	t(1;12)(p32;q14)	+
8	11T1233	M/37	11.7 (largest axis)	Left buttock	t(1;12)(p32;q14),t(1;20)(q32;p13)	+
9	05T312	M/51	10 × 6 × 6.5/94	Left buttock	t(1;12)(p32;q14),t(1;12)(q13;p13)	+
10	10T706	M/55	5.5 × 4.5 × 2.5/20	Right chest wall	t(1;12)(p32;q14)	+
11	09T699	F/64	6.5 × 4.1 × 1.5/16	Left forearm	t(1;12)(p32;q14), del(1)(p32), t(2;11)(q21;p15)	+
12	94T685^c	F/57	4 × 2.5	Caecal wall	t(1;12)(p32;q14)	+
13	10T034	F/36	10 × 7 × 4/80	Paravertebral	inv(1)(p32q11),t(1;12)(q11;q14), t(17;18)(q11;q23)	Deletion
14	11T124	F/56	4.2 × 4.2 × 2	Right axilla	t(1;12;19)(p32;q13;q11)	—
15	07T614	M/43	6 × 3/38	Right scapula	t(1;12)(p32;q14)	—
16	12T893	M/54	5 × 3.5 × 1	Back	t(1;6)(p32;p21)	ND ^d

F, female; M, male; ND, not done.

^aBased on FISH analysis using RP11-30111 and RP11-118B13 probes.^bContext of multiple lipomas.^cPublished in Bianchini et al. (2011).^dBreakpoint in *HMGA1* region.

TABLE 2. Description of the FISH Probes Used for the Characterization of the Ip32.2; 6p21 and 12q14.3 Regions in 10 Cases of Lipomas with t(1;12)(p32.2;q14.3) and One Case of Lipoma with t(1;6)(p32.2;p21)

Probe identification	Locus/chromosomal location/position ^a
Ip32 probes	
RP11-63G10	<i>JUN1</i> /1p32.1/59,179,090–59,321,753
RP11-20I22	<i>PPAP2B</i> 5' region/1p32.2/57,050,331–57,210,976
CTD-2362O17	<i>PPAP2B</i> /1p32.2/56,944,572–57,040,951
RP11-100M11	<i>PPAP2B</i> /1p32.2/56,926,040–57,085,832
RP11-213P13	<i>PPAP2B</i> /1p32.2/56,881,261–57,050,325
RP11-1089D11	<i>PPAP2B</i> /1p32.2/56,811,847–57,012,937
RP11-97I16	<i>PPAP2B</i> 3' region/1p32.2/56,711,452–56,866,789
RP11-606D16	<i>PPAP2B</i> 3' region/1p32.2/56,695,211–56,856,280
RP11-485A11	<i>PPAP2B</i> 3' region/1p32.3/55,708,546–55,908,106
RP11-154H10	<i>PPAP2B</i> 3' region/1p32.3/55,014,287–55,187,057
CTD-2171C24	<i>PPAP2B</i> 3' region/1p32.3/50,512,939–50,651,490
RP11-49M17	<i>ACOT11</i> /1p32.3/55,032,301–55,206,162
6p21 probes	
CTD-2527O17	<i>HMGA1</i> 3' region/6p21.31/34,227,823–34,405,143
CTD-2342D14	<i>HMGA1</i> 3' region/6p21.31/34,250,856–34,406,390
RP11-754H10	<i>HMGA1</i> 5' region/6p21.31/33,852,410–34,029,251
RP11-661K21	<i>HMGA1</i> 5' region/6p21.31/33,841,325–34,029,245
12q14 probes	
RP11-118B13	<i>HMGA2</i> (3'UTR)/12q14.3/66,358,701–66,502,988
CTD-2240K5	<i>HMGA2</i> (exons 4, 5 ; 3'UTR)/12q14.3/66,325,027–66,457,979
RP11-427K2	<i>HMGA2</i> (exons 4, 5 ; 3'UTR)/12q14.3/66,323,478–66,481,711
CTC-78219	<i>HMGA2</i> (exon 4)/12q14.3/66,235,316–66,355,707
RP11-23C9	<i>HMGA2</i> (5'UTR; exons 1, 2, 3)/12q14.3/66,093,846–66,246,663
RP11-30111	<i>HMGA2</i> 5' region/12q14.3/65,892,238–66,063,441

^ahg19, Feb. 2009, GRCh37 Genome 5 Reference Consortium Human Reference 37; <http://www.genome.ucsc.edu>.

deparaffinized in xylene and dehydrated in 100% ethanol. Following proteinase K digestion, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from RNA and amplified (SuperScript One-Step RT-PCR kit, Invitrogen) using the following primers: forward primer HMGA2-2F: 5'-AACCGGTGAGCCC TCTCCTA-3'; reverse primer PPAP2B-6R1420 5'-GAGCGTCGTCTTAGTCTTGAAG-3'. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were carried out as follows: 30 min at 55°C, 94°C for 5 min; 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, 72°C for 7 min; 45 cycles. β -actin-specific primers (ACTIN-F1: 5'-ACCAAC TGGGACGACATGGAGAAA-3' and ACTIN-R: 5'-GGGATAGCACAGCCTGGATAGCA-3') were used for quality control RT-PCR (amplification of a 196-bp sequence). Aliquots from RT-PCR products were visualized in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide after electrophoretic migration. The bands of interest were extracted from the gel, purified using an ultrafree DNA column (Millipore, Billerica, MA), cloned into pCR4-TOPO vector and transformed into One Shot TOP10 *Escherichia coli* competent cells (Topo Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen). The clones were screened by PCR using M13 forward primer (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') and M13 reverse primer (5'-CAGGAAACAGC TATGAC-3') and the clones of interest were sequenced by using the Sequenase kit version 2.0 (USB, Cleveland, OH).

Quantitative RT-PCR Analysis (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from lipomas (six cases), normal subcutaneous adipose tissue (NSAT), and human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells using the RNeasy lipid tissue mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA samples were treated using the DNA-free kit (Applied Biosystems). The quality of the isolated RNA was determined using the 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using the RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). One microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). *RPLP0* and *TBP* were used as endogenous controls for normalization of experiments in lipomas and hMADS cells, respectively (Gabrielsson et al., 2005). QRT-PCR was performed using the following TaqMan gene

expression assays (Applied Biosystems): Hs00171569_m1 (*HMGA2*, exons 1–2), Hs00971724_m1 (*HMGA2*, exons 3–4), Hs00971725_m1 (*HMGA2*, exons 4–5), Hs00170359_m1 (*PPAP2B*, exons 1–2), Hs01009653_m1 (*PPAP2B*, exons 4–5), Hs99999902_m1 (*RPLP0*), Hs00427620_m1 (*TBP*). The reaction mix consisted of 10 μ l of TaqMan universal master mix 2 $\times$, 1 μ l of TaqMan gene expression assay and 5 μ l containing 5 ng of cDNA in a final volume of 20 μ l.

The PCR conditions were as described previously (Italiano et al., 2008a). The comparative threshold cycle method was used to achieve relative quantification of gene expression (Italiano et al., 2008a). Each q-PCR experiment was performed three times in duplicate using the ABI PRISM 7500 Detection System (FAM dyes; Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) studies were performed on 4- μ m thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from 15 lipomas using a BenchMark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ) and a rabbit polyclonal antihuman HMGA2-P1 antibody (Biocheck, Foster city, CA) at a dilution of 1:500 as described previously (Bianchini et al., 2011). Well-differentiated liposarcoma (WDLPS) and adult normal subcutaneous adipose tissue samples were used as positive and negative controls, respectively. The slides were examined (I.B-P) in a blinded manner.

hMADS Cell Culture and Adipocyte-Differentiation

hMADS cells were isolated from white adipose tissue of young donors as described previously (Rodriguez et al., 2005). Self-renewal properties and ability of these cells to differentiate into adipocytes have been extensively described (Zaragosi et al., 2006). hMADS cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2.5 ng/ml human fibroblast growth factor (hFGF)-2, 60 μ g/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. hFGF-2 was removed when cells reached confluence. Adipocyte differentiation was performed as follows: on day 0, confluent hMADS cells were cultured in differentiation medium: DMEM low glucose/Ham's F12 supplemented with the following adipogenic cocktail: transferrin (10 μ g/ml), insulin (5 μ g/ml),

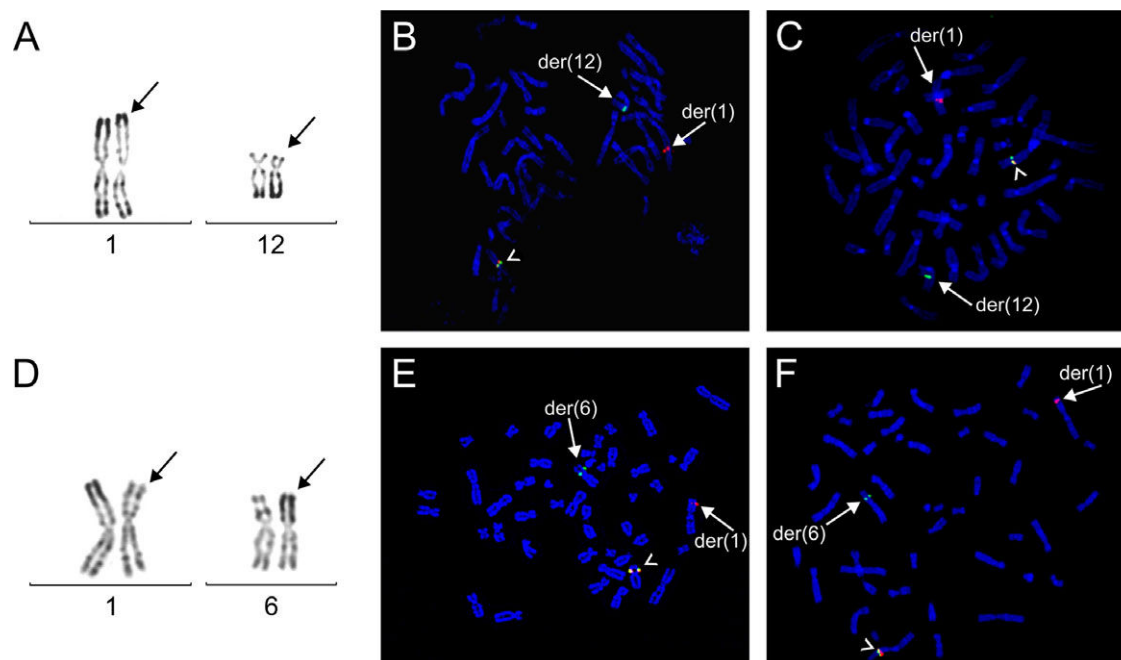


Figure 1. Chromosomal region 1p32 anomalies and genic rearrangements in lipoma cases 3 (A–C) and 16 (D–F). A and D: Partial RHG-banded karyotypes showing $t(1;12)(p32;q14)$ (A) and $t(1;6)(p32;p21)$ (D). Arrows indicate the der(1), der(12) (A) and der(6) (D) resulting from the translocations. B: The dual-color break-apart FISH probes set RP11-30111 (*HMGA2* 5' region; green signal) and RP11-118B13 (*HMGA2* 3' region; red signal) demonstrates rearrangement of *HMGA2* region. The arrows indicate der(1) (red signal) and der(12) (green signal), respectively. Overlapped green/red signals correspond to the normal allele (arrowhead) on 12q14.3. C and F: The dual-color break-apart FISH probes set RP11-485A11 (telomeric to the *PPAP2B* 3'UTR region; green signal) and

RP11-20122 (flanking the *PPAP2B* 5'UTR region; red signal) demonstrates rearrangement of *PPAP2B* region. The arrows indicate der(1) (red signal), der(12) (green signal) (C) and der(6) (F), respectively. Overlapped green/red signals correspond to the normal allele (arrowhead) on 1p32.2. E: The dual-color break-apart FISH probes set RP11-754H10/RP11-661K21 (flanking *HMGA1* 5' region; red signal) and CTD-2527O17/CTD-2342D14 (flanking *HMGA1* 3' region; green signal) demonstrates rearrangement of *HMGA1* region. Arrows indicate der(1) (red signal) and der(6) (green signal), respectively. Overlapped green/red signals correspond to the normal allele (arrowhead) on 6p21. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

triiodothyronine (0.2 nM), dexamethasone (1 μ M), isobutyl-methylxanthine (100 μ M) and rosiglitazone (1 μ M). Three days later (day 3), the medium was changed: dexamethasone and isobutyl-methylxanthine were omitted.

RESULTS

FISH Positional Cloning Data: Identification of *HMGA2* in 12q14.3, *HMGA1* in 6p21 and *PPAP2B* in 1p32 as Candidate Fusion Genes

We used a FISH-based positional cloning strategy to define the chromosomal breakpoints in 15 cases of lipomas showing simple balanced or complex $t(1;12)$ (cases 1–15) (illustrated for case 3, Fig. 1A) and the one case showing a $t(1;6)$ (case 16) (Fig. 1D). In cases 1–12, we observed breakpoints located within the interval containing *HMGA2* framed by probes RP11-30111 and RP11-118B13 (chr12: 65,892,238–66,502,988; 12q14.3) (illustrated for case 3, Fig. 1B). Using a set of probes spanning *HMGA2* (Table 2) in cases 1–10, we showed that the breakpoints were located

within *HMGA2* in all cases except case 9 (Fig. 2A). In case 9, the breakpoint was centromeric to the 5'UTR of *HMGA2* (Fig. 2A). Case 13 showed a deletion of the region delineated by the RP11-30111 and RP11-118B13 probes (Supporting Information Fig. S1) whereas in cases 14 and 15 we did not detect any rearrangement of *HMGA2* using these probes.

In case 16, we observed a breakpoint in the interval between RP11-754H10/RP11-661K21 and CTD-2527O17/CTD-2342D14 probes that flank *HMGA1*, indicating a structural rearrangement of *HMGA1* (Fig. 1E).

The 1p32 region contains two genes that we initially considered as candidates: *JUN* in 1p32.1 [amplified in dedifferentiated liposarcomas (DDLPS) (Mariani et al., 2007)], and *ACOT11* in 1p32.3 (involved in mammalian fatty acid metabolism (Kirkby et al., 2010)). We observed that the breakpoints in 1p32 were located neither in *JUN* nor in *ACOT11*. They were located in a telomeric position with regard to *JUN*, and in a centromeric position with regard to *ACOT11* within a 1.5 Mb region delineated by the RP11-485A11 (chr1:

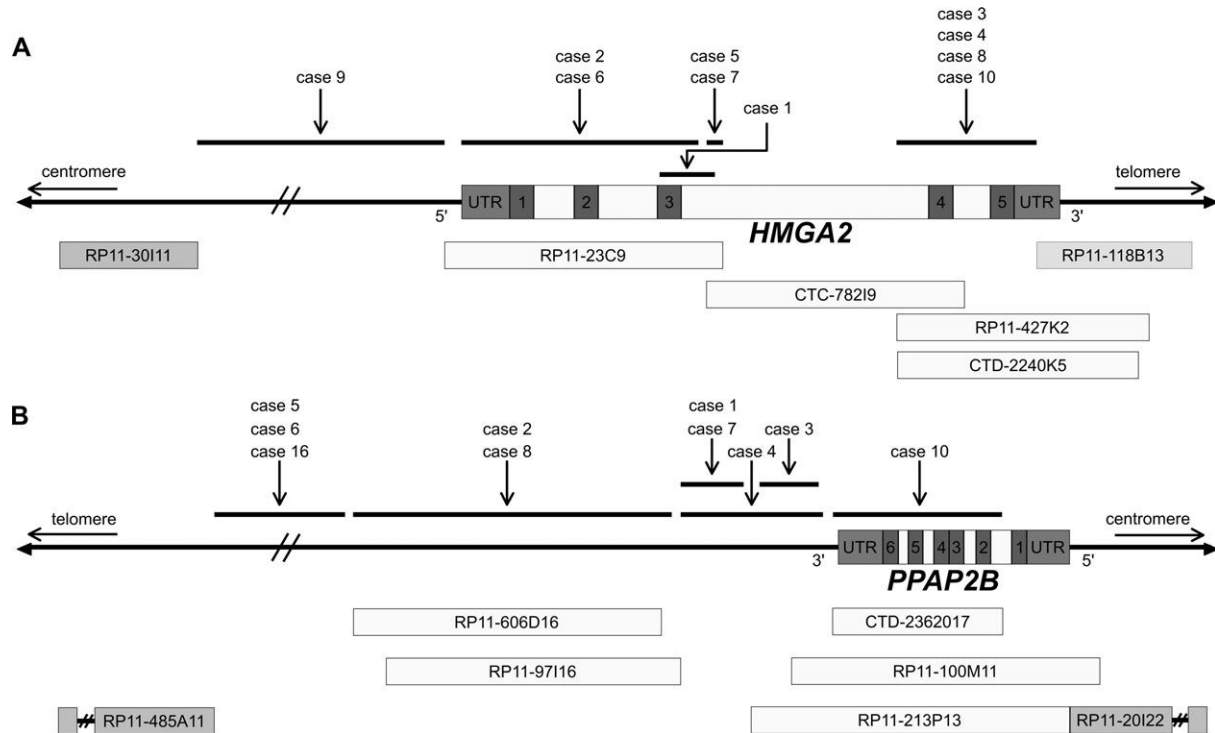


Figure 2. Schematic illustration of the location of the breakpoints on 12q14.3 (A) and 1p32.2 (B) identified by FISH analysis using a series of BAC probes. Horizontal lines delineate the regions of the breakpoints as determined by FISH analysis using the BAC probes mentioned on the scheme. A: Characterization of the 12q14.3 breakpoints in 10 cases of lipomas with t(1;12)(p32.2;q14.3) (cases 1–10).

B: Characterization of the breakpoints on 1p32.2 in nine cases of lipomas with t(1;12)(p32.2;q14.3) (cases 1–8 and 10) and one case of lipoma with t(1;6)(p32.2;p21) (case 16). Case 9 presented a deletion of the region delineated by the RP11-606D16 and RP11-100M11 probes and is therefore not represented on the scheme.

55,708,546–55,908,106; 1p32.3) and RP11-20I22 (chr1: 57,050,331–57,210,976; 1p32.2) BAC probes (illustrated by a split signal of these probes for case 3 in Fig. 1C and case 16 in Fig. 1F). We narrowed down the breakpoints more precisely in cases 1–10 and case 16 (Fig. 2B). According to the genome map, a single gene in this region was correctly oriented to potentially produce a fusion transcript with *HMGA2*: *PPAP2B* (Phosphatidic Acid Phosphatase type 2B). In cases 1–10 and case 16, the breakpoints were spread out in a region of approximately 1.3 Mb flanked by BAC probes RP11-485A11 and CTD-2362O17 (Fig. 2B). This region was telomeric of *PPAP2B* 3'UTR. In case 10, we observed a split signal on der(12) and der(1) using CTD-2362O17 BAC probe that spans *PPAP2B* (Fig. 3B) suggesting that this case might present a fusion of *HMGA2* with *PPAP2B*.

RT-PCR and Sequencing Analysis of *HMGA2*-*PPAP2B* Transcript in Case 10

The sequencing of the RT-PCR product obtained using a forward primer for *HMGA2* in

exon 2 and a reverse primer for *PPAP2B* in exon 6 showed an in-frame fusion of the 3'UTR of *HMGA2* with exon 6 of *PPAP2B* (Figs. 3D and 3E).

Q-RT-PCR Analysis of *HMGA2* and *PPAP2B* Expression

Q-RT-PCR was done for cases 1, 2, 4, 5, 8, 11, and 12 frozen samples of which were available. We observed a strong overexpression of *HMGA2* mRNA compared to NSAT in seven of seven cases that always included expression of exons 1 and 2 (Fig. 4A). The fold changes ranged from 231 (case 4) to 4749 (case 11). Exons 3 and 4 were overexpressed in three of seven cases (43%) whereas exon 5 was overexpressed in only two cases (29%). For *PPAP2B* mRNA expression analysis, probes for exons 1–2 and exons 4–5 gave roughly similar results. In contrast to the consistent overexpression of *HMGA2* in all cases, *PPAP2B* expression was variable: cases 1, 2 and 5 showed a slight overexpression, cases 4 and 8 showed a decreased expression, and no variation

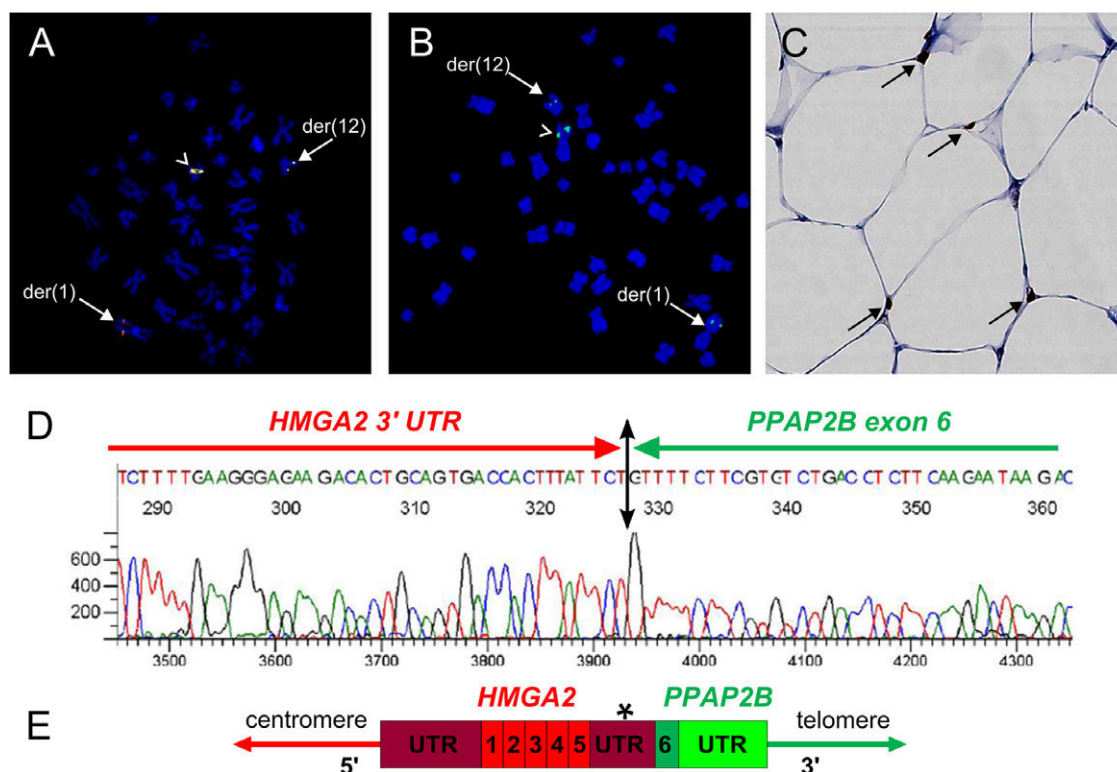


Figure 3. A–B: FISH analysis of *HMGA2* (A) and *PPAP2B* (B) in case 10 using CTD-2240K5 (red signal) and RP11-427K2 (green signal) probes that span the same region of *HMGA2* exons 4 and 5 and 3'UTR (A) and CTD-2362O17 (green signal) that spans the *PPAP2B* gene (B). Fusion of *HMGA2* (A) is demonstrated by split red and green signals on der (12) and der (1) (arrows). Fission of *PPAP2B* (B) is demonstrated by split green signals on der (12) and der (1) (arrows). The normal alleles are indicated by arrow-

heads. C: analysis of the *HMGA2* protein by IHC on a representative section of case 10. The arrows indicate a nuclear staining of the *HMGA2* protein. D: chromatogram showing the in-frame fusion of *HMGA2* (3'UTR) with *PPAP2B* (last exon) mRNA in case 10. E: scheme representing the *HMGA2-PPAP2B* fusion transcript resulting from the t(1;12)(p32;q14.3) in case 10. Asterisk indicates a stop codon. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

of expression was detected in cases 11 and 12 (Fig. 4B).

Expression of *HMGA2* Detected by IHC

We showed that *HMGA2* rearrangement in case 10 led to expression of *HMGA2* protein (Fig. 3C). We also detected *HMGA2* protein expression in all t(1;12) cases analyzed (cases 1 to 15) including case 13 showing a deletion of the *HMGA2* region (Supporting Information Fig. S1) and the two cases without *HMGA2* rearrangement (cases 14 and 15) (data not shown).

FISH Analysis of the Ip32.2 Region in a Series of WDLPS/DDLPS

We have analyzed by FISH 10 cases of WDLPS/DDLPS presenting an amplification of *MDM2* including seven cases showing a co-amplification of *JUN*. None of these cases showed an amplification of *PPAP2B* (using the RP11-1089D11 probe) (data not shown), indicating that

PPAP2B does not belong to the *JUN* amplicon in WDLPS/DDLPS.

PPAP2B Expression in hMADS Cells

PPAP2B codes for a lipid phosphate phosphatase. We therefore assumed that it might play a role in human adipogenesis. To test this hypothesis, we used the hMADS cells as a model for adipocyte differentiation. As shown in Figure 5, the expression of *PPAP2B* was significantly downregulated during adipogenic differentiation. The effect was detected late during adipocyte differentiation since *PPAP2B* expression was inhibited 7 days after treatment of hMADS cells with the adipogenic cocktail.

DISCUSSION

Translocation t(1;12)(p32;q14) has been previously reported in lipomas (Mitelman et al., 2012) but it had not been explored at the molecular level. In our series of karyotyped lipomas, this rearrangement appeared to be the second most

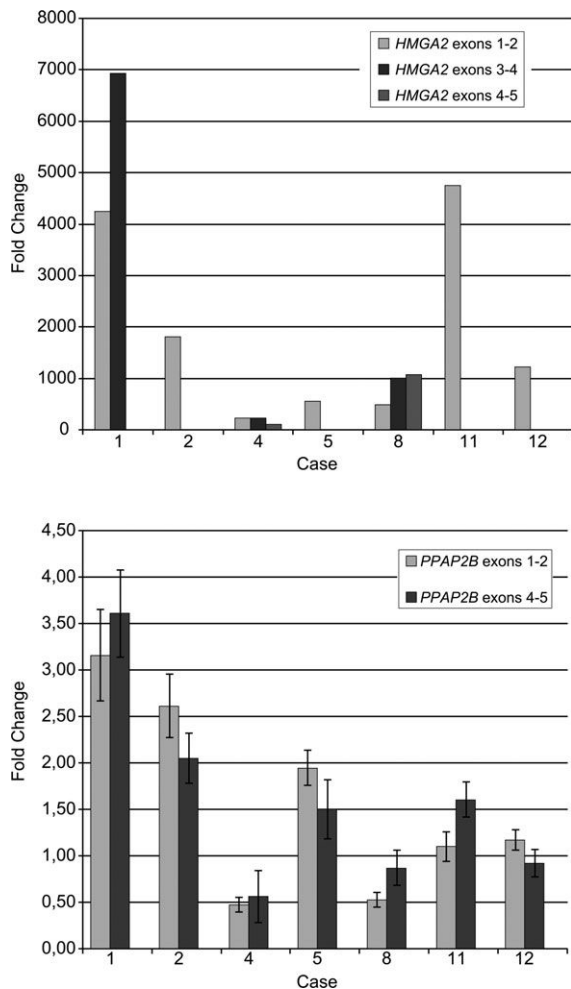


Figure 4. Expression patterns of exons 1–2, exons 3–4, and exons 4–5 of *HMGA2* (A) and exons 1–2 and exons 4–5 of *PPAP2B* (B) using qRT-PCR in seven lipomas with t(1;12)(p32;q14.3). *HMGA2* and *PPAP2B* mRNA were expressed as fold changes relative to expression in NSAT from control individuals. Data for *HMGA2* expression are from an experiment representative of three independent experiments. Data for *PPAP2B* expression are presented as means $\pm$ S. E. of three independent experiments.

frequent after that of t(3;12). We evaluated the frequency of this translocation to be approximately 4% of lipomas with abnormal karyotypes.

We have demonstrated that *PPAP2B* is the translocation partner of *HMGA2* in lipomas harboring this recurrent t(1;12) translocation. *PPAP2B*, also called *LPP3* for *Lipid Phosphate Phosphatase 3* (the acronym's similarity to *LPP-Lipoma Preferred Partner* is fortuitous), belongs to the lipid phosphate phosphatases family which comprises three members: *LPP1*, *LPP2* and *LPP3*. *PPAP2B* codes for a membrane glycoprotein containing six transmembrane domains widely expressed in human tissues (Sigal et al., 2005) that hydrolyses lipid phosphates including lysophosphatidic acid (LPA) and sphingosine

1-phosphate. Invalidation of the murine *Ppap2b* gene results in embryonic lethality due to defects in both vasculogenesis and patterning during early development (Escalante-Alcalde et al., 2003). *PPAP2B* was also reported to play a critical role in neuron differentiation and neurite outgrowth (Sanchez-Sanchez et al., 2012). LPA and sphingosine 1-phosphate are bioactive lipids that can induce proliferation, survival, and invasiveness in certain cell types and *PPAP2B* might exert an anti-tumorigenic effect by limiting LPA signalling. Overexpression of *PPAP2B* has been shown to decrease growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells (Tanyi et al., 2003). A limited number of studies have reported the potential involvement of *PPAP2B* in tumorigenesis: *PPAP2B* has been identified as a Myc-bound locus in medulloblastoma cells (Zhou et al., 2010) and shown to regulate tumor growth via β -catenin and cyclin D1 signaling in glioblastoma (Chatterjee et al., 2011).

We have shown that in nine out of 10 t(1;12) cases and one t(1;6) case, the breakpoints were located in 3' extragenic region flanking *PPAP2B* 3'UTR, in a distance range of 100–800 kb. Case 10 was the only one presenting a breakpoint within the *PPAP2B* gene resulting in fusion of the last exon of *PPAP2B* (exon 6) with the *HMGA2* 3'UTR. The potential consequences of extragenic breakpoints in the alteration of expression of *PPAP2B* are not known. Data reporting expression of *PPAP2B* in adult human tissues are scarce. *PPAP2B* mRNA appear widely distributed (Kai et al., 1997; Humtsoe et al., 2003; Sigal et al., 2005). Expression profiles based on detection of EST (expressed sequence tag) transcripts

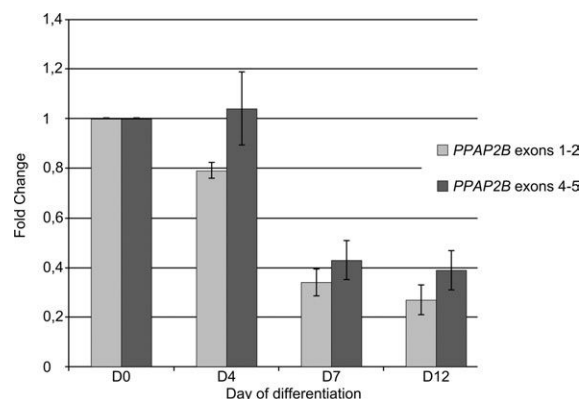


Figure 5. Expression pattern of exons 1–2 and exons 4–5 of *PPAP2B* using qRT-PCR during adipocyte-differentiation of hMADS cells. *PPAP2B* mRNA was expressed as fold changes relative to expression in undifferentiated hMADS cells (Day 0: D0). Data are presented as means $\pm$ S.E. of three independent experiments.

in human adult tissues show heterogeneous levels of expression: in particular, vascular system, placenta, prostate, lymph node, and mammary gland express high levels of *PPAP2B* whereas skin, spleen and thymus show no expression (Sigal et al., 2005). In the absence of currently available reliable antibodies for IHC studies, we explored the expression of *PPAP2B* mRNA in NSAT and lipomas using qRT-PCR. We found that *PPAP2B* mRNA was quite abundant in NSAT. The expression levels in t(1;12) lipomas were also significant but variable. They were apparently not correlated to the presence or absence of the t(1;12) translocation. Therefore these data need to be extended to additional cases. It can be hypothesized that only a slight alteration of *PPAP2B* expression levels, sufficient for giving a selective advantage to tumor cells but difficult to detect, might result from the genomic rearrangement. It can also be hypothesized that the rearrangement does not impact *PPAP2B* expression but only affects *HMGA2*. Indeed, some studies suggest that the critical event leading to *HMGA2* oncogenicity relies on its truncation, regardless of the nature of the fused sequences (Fedele et al., 1998; Arlotta et al., 2000). However, an intrinsic role for fusion partners has also been suggested. For instance, the *HMGA2-LPP* fusion transcript always contains at least the last three exons of *LPP* leading to the expression of either two or three LIM domains of the LPP protein, domains that have a function in cell migration, proliferation and transcription [reviewed in (Grunewald et al., 2009)]. Moreover, Kubo et al. (2009) have reported three cases of lipomas with t(3;12) for which the only transcript they could detect using RT-PCR was the reciprocal *LPP-HMGA2* transcript suggesting a role for *LPP* in the tumorigenesis of these lipomas.

The location of the *HMGA2* breakpoints in our t(1;12) series was variable. It was intragenic for all cases except in case 9 that showed an extragenic 5' breakpoint (Fig. 2). In case 10, we have found that the rearrangement fuses the 3'UTR region of *HMGA2* with exon 6 of *PPAP2B*. Breakpoints occurring in the 3'UTR of *HMGA2* have been previously described in three cases of lipomas (Schoenmakers et al., 1995; Wang et al., 2009) as well as in other types of tumors, such as leiomyomas (Quade et al., 2003), pleomorphic adenomas (Geurts et al., 1997), polycythemia vera (Storlazzi et al., 2006) and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (Inoue et al., 2006). Interestingly, the breakpoint that we have identified in case 10

(80 bp downstream of the stop codon) is very close to the breakpoints reported in two lipomas described by Wang et al. (2009) which were 97 and 106 bp downstream to the stop codon, respectively. Moreover, Medeiros et al. (2007) have reported a breakpoint occurring in *HMGA2* at the same position as in case 10 in a case of aggressive angiomyxoma presenting a t(1;12) (p32;q14). The authors have located the breakpoint in the 1p32 region 496 bp downstream from the *PPAP2B* 3'UTR. This indicates that *PPAP2B* rearrangements might be involved in tumors other than lipomas. We showed a strong overexpression of *HMGA2* mRNA (at least exons 1 and 2) and protein in all t(1;12) cases, including case 13 that harbored a deletion of the *HMGA2* region and cases 14 and 15 without detectable rearrangement of this region (Table 1). In case 10, we can predict from the sequencing of the fusion transcript an expression of the full length *HMGA2* protein. Note that the breakpoint in the *HMGA2* 3'UTR was located downstream from the first *let-7* microRNA (miRNA) binding site. The 3'UTR of *HMGA2* indeed contains multiple binding sites for the *let-7* family. Targeted mutations of these binding sites or functional inactivation of *let-7* result in upregulation of *HMGA2* (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007). Our results confirm that deletion of the *let-7* binding sites results in *HMGA2* overexpression. They also demonstrate that elimination of the first *let-7* binding site is not critical for upregulation of *HMGA2* as reported by Wang et al. (2009).

Interestingly, *PPAP2B* also appears to be a translocation partner for *HMGA1* in a t(1;6)(p32;p21) case suggesting that *HMGA1* might play a role similar to that of *HMGA2* in t(1;6) lipomas.

We have demonstrated previously that *NFIB* is a recurrent fusion partner of *HMGA2* in lipomas (Italiano et al., 2008b). *NFIB* is involved in the pathogenesis of benign tumors but also in malignant tumors such as the adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (Marchio et al., 2010). Interestingly, besides its role in tumorigenesis, *NFIB* has recently been shown to play a role in adipocyte differentiation (Waki et al., 2011). Our hypothesis was that it might also be the case for *PPAP2B*. To test this hypothesis, we used the hMADS cells as a model for adipocyte differentiation. These cells exhibit the characteristics of mesenchymal stem cells and they can in vitro differentiate into cells that display a unique combination of properties similar, if not identical, to those of native human

adipocytes (Bezaire et al., 2009; Poitou et al., 2009). Our results showed that differentiation of hMADS cells in adipocytes was associated with a strong down regulation of *PPAP2B* expression suggesting that *PPAP2B* might play a role in human adipogenesis. Our results validate in a human model the results obtained on the mouse preadipocyte cell line 3T3F442A (Simon et al., 2002). The involvement of *PPAP2B* in adipogenesis might occur through the control of LPA production. Indeed, Simon et al. (2002) have shown that down regulation of *PPAP2B* during differentiation of 3T3F442A preadipocytes into adipocytes is concomitant to and might be responsible for a strong reduction in LPA phosphatase activity resulting in an increased production of LPA by the adipocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to J.M. Coindre (Institut Bergonié, Bordeaux) for providing lipoma samples and histological data. They thank F. Keslair and R. Grattery for skilful technical assistance.

REFERENCES

- Arlotta P, Tai AK, Manfioletti G, Clifford C, Jay G, Ono SJ. 2000. Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas. *J Biol Chem* 275:14394–14400.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Wercmowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57–65.
- Bartuma H, Hallor KH, Panagopoulos I, Collin A, Rydholm A, Gustafson P, Bauer HC, Brosjö O, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. 2007. Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 46:594–606.
- Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Grousse A, Jocken J, Laurencikienė J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P, Langin D. 2009. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284:18282–18291.
- Bianchini L, Saada E, Gjernes E, Marty M, Haudebourg J, Birtwistle-Peyrottes I, Keslair F, Chignon-Sicard B, Chamorey E, Pedetour F. 2011. Let-7 microRNA and HMGA2 levels of expression are not inversely linked in adipocytic tumors: Analysis of 56 lipomas and liposarcomas with molecular cytogenetic data. *Genes Chromosomes Cancer* 50:442–455.
- Broberg K, Zhang M, Strombeck B, Isaksson M, Nilsson M, Mertens F, Mandahl N, Panagopoulos I. 2002. Fusion of RDC1 with HMGA2 in lipomas as the result of chromosome aberrations. *Int J Oncol* 21:321–326.
- Chatterjee I, Humtsoe JO, Kohler EE, Sorio C, Wary KK. 2011. Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via beta-catenin and cyclin D1 signaling. *Mol Cancer* 10:51.
- Choi YW, Choi JS, Zheng LT, Lim YJ, Yoon HK, Kim YH, Wang YP, Lim Y. 2007. Comparative genomic hybridization array analysis and real time PCR reveals genomic alterations in squamous cell carcinomas of the lung. *Lung Cancer* 55:43–51.
- Dahlén A, Mertens F, Rydholm A, Brosjö O, Wejde J, Mandahl N, Panagopoulos I. 2003. Fusion, disruption, and expression of HMGA2 in bone and soft tissue chondromas. *Mod Pathol* 16:1132–1140.
- Dooley AL, Winslow MM, Chiang DY, Banerji S, Stransky N, Dayton TL, Snyder EL, Senna S, Whittaker CA, Bronson RT, Crowley D, Barretina J, Garraway L, Meyerson M, Jacks T. 2011. Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Dev* 25:1470–1475.
- Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Le Stunff H, Maeda R, Lee HS, Jr Gang C, Sciorra VA, Daar I, Spiegel S, Morris AJ, Stewart CL. 2003. The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development* 130:4623–4637.
- Fede M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, Rippe V, Bullerdick J, Santoro M, Fusco A. 1998. Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 17:413–418.
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. 2002. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press.
- Gabrielsson BG, Olofsson LE, Sjogren A, Jernas M, Elander A, Lonn M, Rudemo M, Carlsson LM. 2005. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13:649–652.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ. 1997. Molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in a pleomorphic salivary gland adenoma involving the 3'-UTR of HMGI-C. *Cancer Genet Cytogenet* 95:198–205.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Astrom AK, Stenman G, van de Ven WJ. 1998. Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGI-C in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 16:865–872.
- Grunewald TGP, Pasdag SM, Butt E. 2009. Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Proto-oncogene LPP. *Transl Oncol* 2:107–116.
- Han W, Jung EM, Cho J, Lee JW, Hwang KT, Yang SJ, Kang JJ, Bae JY, Jeon YK, Park IA, Nicolau M, Jeffrey SS, Noh DY. 2008. DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 47:490–499.
- Hatano H, Morita T, Ogose A, Hotta T, Kobayashi H, Segawa H, Uchiyama T, Takenouchi T, Sato T. 2008. Clinicopathological features of lipomas with gene fusions involving HMGA2. *Anticancer Res* 28:535–538.
- Humtsoe JO, Feng S, Thakker GD, Yang J, Hong J, Wary KK. 2003. Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *EMBO J* 22:1539–1554.
- Husenet T, Mallem N, Redon R, Jost B, Aurias A, du Manoir S. 2006. Overlapping 3q28 amplifications in the COMA cell line and undifferentiated primary sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 169:102–113.
- Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. 2006. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 108:4232–4236.
- Italiano A, Bianchini L, Keslair F, Bonnafous S, Cardot-Leccia N, Coindre JM, Dumollard JM, Hofman P, Leroux A, Mainguene C, Peyrottes I, Ranchere-Vince D, Terrier P, Tran A, Gual P, Pedetour F. 2008a. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer* 122:2233–2241.
- Italiano A, Ebran N, Attias R, Chevallier A, Monticelli I, Mainguene C, Benchimol D, Pedetour F. 2008b. NFIB rearrangement in superficial, retroperitoneal, and colonic lipomas with aberrations involving chromosome band 9p22. *Genes Chromosomes Cancer* 47:971–977.
- Kai M, Wada I, Imai S, Sakane F, Kanoh H. 1997. Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* 272:24572–24578.
- Kirkby B, Roman N, Kobe B, Kellie S, Forwood JK. 2010. Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases. *Prog Lipid Res* 49:366–377.
- Kubo T, Matsui Y, Naka N, Araki N, Goto T, Yukata K, Endo K, Yasui N, Myoui A, Kawabata H, Yoshikawa H, Ueda T. 2009. Expression of HMGA2-LPP and LPP-HMGA2 fusion genes in lipoma: Identification of a novel type of LPP-HMGA2 transcript in four cases. *Anticancer Res* 29:2357–2360.

- Lee YS, Dutta A. 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21:1025–1030.
- Mandahl N, Hoglund M, Mertens F, Rydholm A, Willen H, Brosjo O, Mitelman F. 1994. Cytogenetic aberrations in 188 benign and borderline adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 9:207–215.
- Marchio C, Weigelt B, Reis-Filho JS. 2010. Adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (or "The strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde" of exocrine glands carcinomas). *J Clin Pathol* 63:220–228.
- Mariani O, Brennetot C, Coindre JM, Gruel N, Ganem C, Delattre O, Stern MH, Aurias A. 2007. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell* 11:361–374.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315:1576–1579.
- Medeiros F, Erickson-Johnson MR, Keeney GL, Clayton AC, Nascimento AG, Wang X, Oliveira AM. 2007. Frequency and characterization of HMGA2 and HMGA1 rearrangements in mesenchymal tumors of the lower genital tract. *Genes Chromosomes Cancer* 46:981–990.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors. 2012. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Accessed October 20, 2012.
- Nilsson M, Panagopoulos I, Mertens F, Mandahl N. 2005. Fusion of the HMGA2 and NFIB genes in lipoma. *Virchows Arch* 447:855–858.
- Nilsson M, Mertens F, Hoglund M, Mandahl N, Panagopoulos I. 2006. Truncation and fusion of HMGA2 in lipomas with rearrangements of 5q32-->q33 and 12q14-->q15. *Cytogenet Genome Res* 112:60–66.
- Nishio J. 2011. Contributions of cytogenetics and molecular cytogenetics to the diagnosis of adipocytic tumors. *J Biomed Biotechnol* 2011:524067.
- Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van de Ven WJ. 1996. LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 36:118–129.
- Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ. 1999. LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics* 57:438–441.
- Pierron A, Fernandez C, Saada E, Keslair F, Hery G, Zattara H, Pedetour F. 2009. HMGA2-NFIB fusion in a pediatric intramuscular lipoma: A novel case of NFIB alteration in a large deep-seated adipocytic tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 195:66–70.
- Poitou C, Divoux A, Faty A, Tordjman J, Hugol D, Aissat A, Keophipath M, Henegar C, Commans S, Clement K. 2009. Role of serum amyloid A in adipocyte-macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1810–1817.
- Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. 2003. Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 63:1351–1358.
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdizkonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C. 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 201:1397–13405.
- Rogalla P, Kazmierczak B, Meyer-Bolte K, Tran KH, Bullerdick J. 1998. The t(3;12)(q27;q14–q15) with underlying HMGIC-LPP fusion is not determining an adipocytic phenotype. *Genes Chromosomes Cancer* 22:100–104.
- Sanchez-Sanchez R, Morales-Lazaro SL, Baizabal JM, Sunkara M, Morris AJ, Escalante-Alcalde D. 2012. Lack of lipid phosphate phosphatase-3 in embryonic stem cells compromises neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Dev Dyn* 241:953–964.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdick J, Van den Bergh H, Van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436–444.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ. 2005. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: Common structure and diverse functions. *Biochem J* 387:281–293.
- Simon MF, Rey A, Castan-Laurel I, Gres S, Sibrac D, Valet P, Saulnier-Blache JS. 2002. Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem* 277:23131–23136.
- Storlazzi CT, Albano F, Locunsolo C, Lonoce A, Funes S, Guastadisegni MC, Cimarosto L, Impera L, D'Addabbo P, Panagopoulos I, Specchia G, Rocchi M. 2006. t(3;12)(q26;q14) in polycythemia vera is associated with upregulation of the HMGA2 gene. *Leukemia* 20:2190–2192.
- Tanyi JL, Morris AJ, Wolf JK, Fang X, Hasegawa Y, Lapushin R, Auersperg N, Sigal YJ, Newman RA, Felix EA, Atkinson EN, Mills GB. 2003. The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: Validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res* 63:1073–1082.
- Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. 2011. Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 7:e1002311.
- Wang X, Hulshizer RL, Erickson-Johnson MR, Flynn HC, Jenkins RB, Lloyd RV, Oliveira AM. 2009. Identification of novel HMGA2 fusion sequences in lipoma: Evidence that deletion of let-7 miRNA consensus binding site 1 in the HMGA2 3' UTR is not critical for HMGA2 transcriptional upregulation. *Genes Chromosomes Cancer* 48:673–678.
- Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. 2006. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24:2412–2419.
- Zhou L, Picard D, Ra YS, Li M, Northcott PA, Hu Y, Stearns D, Hawkins C, Taylor MD, Rutka J, Der SD, Huang A. 2010. Silencing of thrombospondin-1 is critical for myc-induced metastatic phenotypes. *Cancer Res* 70:8199–8210.
- Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, Wang W, Goodrich DW, Roy-Burman P, Nikitin AY. 2006. Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 66:7889–7898.

2-3. Place des microARN *let-7* dans la régulation de *HMGA2* dans les tumeurs adipocytaires

Article 3 :

L. Bianchini, **E. Saâda**, E. Gjernes, M. Marty, J. Haudebourg, I. Birtwisle-Peyrottes, F. Keslair, B. Chignon-Sicard, E. Chamorey, F. Pedeutour. *Let-7 MicroRNA and HMGA2 levels of expression are not inversely linked in adipocytic tumors: Analysis of 56 lipomas and liposarcomas with molecular cytogenetic data. Genes Chromosomes Cancer. 2011 Jun;50(6):442-55.*

Article 4 :

E. Saâda, L. Bianchini, J. Mouroux, B. Padovani, M. Yver, F. Pedeutour. *HMGA2 not rearranged but overexpressed and associated with inhibition of let-7 expression in a first description of genetic analysis in diffuse lipomatosis. Histopathology. 2012 Sep;61(3):519-22.*

Une deuxième partie de notre travail a consisté en l'étude de l'interaction entre *HMGA2* et les microARN *let-7* dans les TA. En effet, *HMGA2* contient 8 sites de fixation potentielle aux microARN *let-7* dans sa portion 3'UTR. Il a été montré en 2007 dans deux articles princeps (Lee and Dutta 2007, Mayr, Hemann et al. 2007) que l'inactivation de ces sites de fixation induisait la surexpression de *HMGA2*, apportant la preuve d'une dérégulation oncogénique de *HMGA2* par ces microARN. Par la suite, plusieurs travaux ont permis d'objectiver une corrélation inverse entre les niveaux d'expression des *let-7* et *HMGA2* dans diverses tumeurs (carcinomes ovariens, carcinomes pulmonaires, rétinoblastomes, leiomyosarcomes, carcinomes épidermoïdes ORL) (Shi, Perle et al. 2009, Mahajan, Liu et al. 2010, Mu, Liu et al. 2010, Sterenczak, Eckardt et al. 2014, Zhang, Gao et al. 2014).

Avant la réalisation de nos travaux, aucune donnée sur la régulation de l'expression de *HMGA2* par les microARN *let-7* dans les TA n'était disponible. Dans le cas particulier des TLA/LBD et LDD, la surexpression de *HMGA2* est systématiquement associée à un remaniement structural et une amplification du gène. Dans les lipomes, les observations étaient plus complexes puisque nous avons remarqué une surexpression de l'ARNm et de la protéine de *HMGA2* non seulement dans les cas présentant une altération structurale du gène mais également en l'absence d'anomalie détectable par FISH. Ainsi, nous avons étudié le statut d'expression de *HMGA2* et des *let-7* dans une grande série de cas avec et sans anomalie du chromosome 12.

Article 3 :

Nous avons étudié une série de 41 lipomes. Nous avons dans un premier temps montré que seuls 43% des lipomes de notre série présentaient un remaniement structural de *HMGA2* détectable par FISH (sondes « *break-apart* » en 5' et 3'UTR du gène). De manière attendue, tous les lipomes avec remaniement de *HMGA2* surexprimaient l'ARNm et la protéine *HMGA2*. De façon plus surprenante, les lipomes sans remaniement de *HMGA2* surexprimaient également l'ARNm et la protéine de *HMGA2* respectivement dans 76% et 48 % des cas. Le niveau d'expression de l'ARNm des deux premiers exons de *HMGA2* était significativement plus élevé que celui détecté dans les lipomes avec remaniement du gène. Notre hypothèse était qu'une inhibition du niveau d'expression des microARN *let-7* pouvait expliquer la surexpression de *HMGA2* dans des lipomes dont la partie 3'UTR, et donc les sites de fixation potentiels des *let-7*, étaient conservés. Nous avons donc mesuré par RT-PCR quantitative les niveaux d'expression respectifs des micro-ARN *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g* et *let-7i* et corrélé ceux-ci au niveau d'expression des exons 1-2, exons 3-4 et exons 4-5 de *HMGA2*. Notre analyse a montré l'absence de lien statistique entre le niveau d'expression des microARN *let-7* et celui de *HMGA2*. Le niveau d'expression de ceux-ci était en effet variable et aléatoire et non corrélé au sous-type anatomo-pathologique des lipomes, à la présence d'un

remaniement de *HMGA2* ou au niveau d'expression de *HMGA2*. Cependant, nous avons mis en évidence une corrélation positive significative entre les niveaux d'expression respectifs de *let-7a* et *let-7b* ($r=0,83$), *let-7a* et *let-7g* ($r=0,7$) et *let-7f* et *let-7g* ($r=0,73$). Une faible expression de *let-7a*, *let-7b* ou *let-7e* était significativement associée à une absence d'expression de la protéine HMGA2. Nous avons également observé que les lipomes qui ne surexprimaient pas HMGA2 étaient pour la plupart des lipomes non ordinaires. En effet, sur les 5 lipomes d'histologie non ordinaire de notre série (myolipomes, fibrolipomes, lipomes intramusculaires, lipomes à cellules fusiformes), 4 (80%) ne surexprimaient pas HMGA2 et un cas (20%) surexprimait faiblement HMGA2 (intensité +1). Pour ces lipomes particuliers, il est vraisemblable que les dérégulations génétiques initiatrices font intervenir des gènes autres que *HMGA2*, gènes qui pourraient eux-mêmes être la cible des microARN *let-7a*, *let-7b* ou *let-7e*.

Nous avons également analysé une série de 15 LPS (13 ALT/LBD ou LDD, 1 LPS à cellules fusiformes et 1 LPS pléomorphe). Tous les TLA/LBD et LDD dont le caryotype était disponible présentaient un CMS. *MDM2* était amplifié dans 100% des TLA/LBD et LDD alors que *CDK4* était amplifié dans 7 cas sur 13 (54%). Les deux premiers exons de *HMGA2* étaient amplifiés dans tous les TLA/LBD et LDD et cette amplification était associée à une surexpression de l'ARNm et de la protéine HMGA2. Ces données confirmaient et approfondissaient nos résultats préliminaires concernant les remaniements et l'amplification de *HMGA2* dans ces tumeurs (Italiano, Bianchini et al. 2008). Les cas de LPS pléomorphe et à cellules fusiformes ne présentaient pas d'amplification de *MDM2*, *CDK4* ou *HMGA2*. L'analyse par qRT-PCR des 13 TLA/LBD et LDD montrait une surexpression de l'ARNm des deux premiers exons de *HMGA2* dans 100% des cas alors que les exons 3-4 et 4-5 étaient surexprimés dans 7/13 cas confirmant la possible troncation du gène associée à son amplification. Aucun des LPS ne présentait une inhibition de tous les membres de la famille des microARN *let-7* mais 5 d'entre eux montraient une inhibition de l'expression de plusieurs membres de la famille *let-7*.

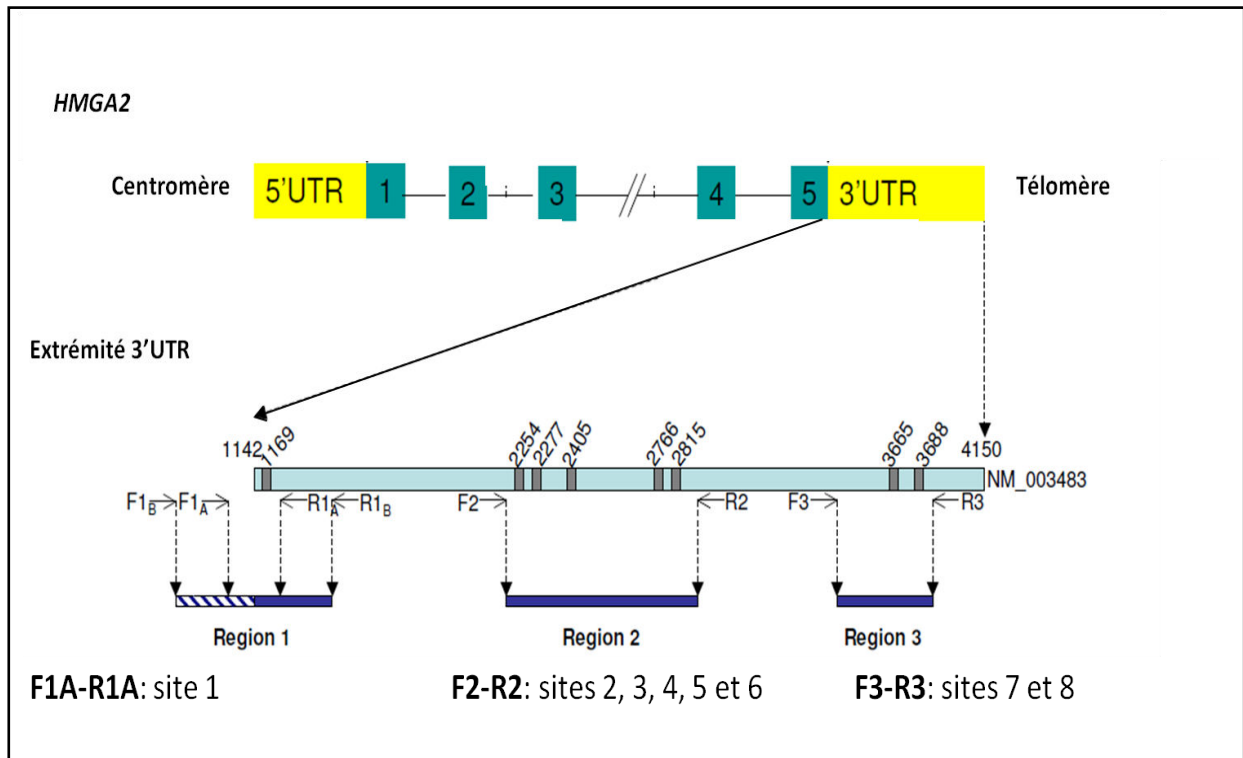
Ainsi, nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression des *let-7* n'est pas le mécanisme essentiel de dérégulation de l'expression de *HMGA2* dans les TA sans remaniement structural et/ou numérique du gène.

Nos résultats ne permettent cependant pas d'écarter un possible rôle des microARN *let-7* dans la biologie des TA via des voies de signalisation non encore établies. Ainsi les *let-7* ciblent-ils d'autres oncogènes tels que *RAS*, *MYC* ou d'autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire dans d'autres modèles tumoraux (Barh, Malhotra et al. 2010, Nie, Zhang et al. 2010, Koukos, Polyarchou et al. 2013, Tummala, Nadiminty et al. 2013). De plus, l'expression de HMGA2 peut être régulée par d'autres miARN tels que miR-145 (Kim, Song et al. 2015), miR 182 (Xu, Ayub et al. 2014), miR26a (Zhou, Guo et al. 2014) ou LIN28A (Mao, Hutt-Cabezas et al. 2013). De nombreuses études

ont montré et/ou confirmé le rôle prépondérant de la régulation de l'expression de *HMGA2* par les microARN *let-7* dans la biologie des cancers du poumon (Alam, Ahmad et al. 2014), des astrocytomes anaplasiques (Yang, Chen et al. 2014), des hépatocarcinomes (Chen, Hou et al. 2014), des carcinomes épidermoïdes œsophagiens (Liu, Liu et al. 2014), des tumeurs rhabdoïdes (Zhang, Gao et al. 2014), des carcinomes séreux ovariens (Zhang, Ding et al. 2013), les carcinosarcomes endométriaux (Romero-Perez, Castilla et al. 2013). Des données très récentes publiées dans la revue *Nature* ajoutent un niveau de complexité dans la compréhension des interactions entre *HMGA2* et les microARN. En effet, Kumar et al. montrent (Kumar, Armenteros-Monterroso et al. 2014) dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire murin et humain présentant une forte surexpression de *HMGA2*, que l'ARNm de *HMGA2* est capable de moduler l'expression d'autres gènes en régulant la disponibilité des microARN pour ces gènes. Les auteurs démontrent ainsi que l'ARNm de *HMGA2* peut également exercer ses propriétés pro-oncogéniques via un rôle d'ARN compétiteur endogène pour les microARN de la famille *let-7*.

L'ensemble de ces résultats nous a fait réexaminer l'importance du rôle joué par l'extrémité 3'UTR du gène *HMGA2*. Bartuma et al. (Bartuma, Panagopoulos et al. 2009) venaient de montrer, dans une série de 18 lipomes analysés par RT-PCR, une diminution significative de l'expression des régions d'ADN qui codent pour les sites de fixation aux *let-7* en 3'UTR de *HMGA2*. Cette diminution/disparition de l'expression de ces régions était paradoxalement également constatée dans des lipomes sans remaniement structural de *HMGA2* détectable par FISH. Pour notre part, nous avons poursuivi notre effort de caractérisation de l'extrémité 3'UTR de *HMGA2* sur 49 lipomes au total (données non publiées). Nous avons utilisé trois couples d'amorces oligonucléotidiques pour délimiter trois régions porteuses de sites de fixations au niveau de l'extrémité 3'UTR de *HMGA2*. De 5' en 3', la première région incluait le premier site de fixation aux microARN, la région 2 incluait 5 sites de fixation (du 2^e au 6^e), la région 3 les 7^e et 8^e sites de fixation (figure 6 ci-contre).

Figure 6. Représentation schématique du gène *HMGA2*, de son extrémité 3'UTR et des sites de fixation aux microARN *let-7*.



Partie supérieure : représentation schématique du gène *HMGA2* composé de gauche à droite de l'extrémité 5'UTR, des 5 exons suivis de l'extrémité 3'UTR. Partie inférieure : schématisation des 8 sites de fixation aux micro-ARN *let-7* (barres grises) au sein de l'extrémité 3'UTR de *HMGA2*. Les trois couples d'amorces oligonucléotidiques, F1A-R1A, F2-R2 et F3-R3 délimitent respectivement les régions 1, 2 et 3 (d'après Bartuma et al. 2009 (Bartuma, Panagopoulos et al. 2009)).

Nous montrons dans cette série de lipomes que, de manière récurrente, plus on s'approche de l'extrémité de la région 3'UTR, moins les sites de fixation sont retrouvés sur les lipomes analysés. De plus, l'absence de détection des 8 sites de fixation aux *let-7* était corrélée à une forte surexpression des exons 1-2 de *HMGA2*. La détection de la deuxième région (qui contient 5 sites de fixation) était statistiquement liée à l'inhibition de *let-7b*, *let-7f* et *let-7i*, évoquant une régulation possible par les *let-7* de l'expression de *HMGA2* uniquement lorsqu'une majorité des sites de fixation est détectée. Par ailleurs, d'autres éléments constitutifs de cette extrémité 3'UTR peuvent intervenir dans la régulation de l'expression de *HMGA2*. En effet, des séquences répétées riches en dinucléotides AU sont retrouvées au niveau de cette extrémité 3'UTR et peuvent réguler négativement l'expression de *HMGA2*. Borrmann et al (Borrmann, Wilkening et al. 2001) montrent que la perte de ces éléments est associée à une surexpression de *HMGA2*. De même la présence de polymorphismes ou de mutations dans les séquences codant pour la séquence 3'UTR ont été impliquées dans la régulation de la taille des individus (Lettre, Jackson et al. 2008). Pour définir au mieux lequel de ces mécanismes intervient dans la dérégulation positive de l'expression de *HMGA2* dans les tumeurs sans remaniement du gène, un séquençage de l'extrémité 3'UTR de *HMGA2* fournirait de précieuses informations. A notre connaissance cette analyse n'a jamais été réalisée. Nos résultats soulignent une nouvelle fois le rôle probablement central des remaniements structurels/modifications de la séquence nucléotidique de *HMGA2* dans la genèse des lipomes.

Let-7 MicroRNA and HMGA2 Levels of Expression Are Not Inversely Linked in Adipocytic Tumors: Analysis of 56 Lipomas and Liposarcomas with Molecular Cytogenetic Data

Laurence Bianchini,^{1,2*} Esma Saâda,^{1,2} Elisabet Gjernes,^{1,2} Marion Marty,³ Juliette Haudebourg,⁴ Isabelle Birtwisle-Peyrottes,⁵ Frédérique Keslair,^{1,2} Bérangère Chignon-Sicard,⁶ Emmanuel Chamorey,⁷ and Florence Pedeutour^{1,2}

¹Laboratory of Solid Tumors Genetics, Nice University Hospital, Nice, France

²Laboratory of Solid Tumors Genetics, University of Nice Sophia-Antipolis, CNRS, UMR 6543, Nice, France

³Department of Pathology, Bergonié Institute, Bordeaux, France

⁴Central Laboratory of Pathology, Nice University Hospital, Nice, France

⁵Department of Pathology, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

⁶Department of Plastic, Aesthetic and Restorative Surgery, Nice University Hospital, Nice, France

⁷Department of Biostatistics, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

The aim of our study was first to assess the role of HMGA2 expression in the pathogenesis of adipocytic tumors (AT) and, second, to seek a potential correlation between overexpression of HMGA2 and *let-7* expression inhibition by analyzing a series of 56 benign and malignant AT with molecular cytogenetic data. We measured the levels of expression of HMGA2 mRNA and of eight members of the *let-7* microRNA family using quantitative RT-PCR and expression of HMGA2 protein using immunohistochemistry. HMGA2 was highly overexpressed in 100% of well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas (WDLPS/DDLPS), all with HMGA2 amplification, and 100% of lipomas with HMGA2 rearrangement. Overexpression of HMGA2 mRNA was detected in 76% of lipomas without HMGA2 rearrangement. HMGA2 protein expression was detected in 100% of lipomas with HMGA2 rearrangement and 48% of lipomas without HMGA2 rearrangement. We detected decreased expression levels of some *let-7* members in a significant proportion of AT. Notably, *let-7b* and *let-7g* were inhibited in 61% of WDLPS/DDLPS. In lipomas, each type of *let-7* was inhibited in approximately one-third of the cases. Although overexpression of both HMGA2 mRNA and protein in a majority of ordinary lipomas without HMGA2 structural rearrangement may have suggested a potential role for *let-7* microRNAs, we did not observe a significant link with *let-7* inhibition in such cases. Our results indicate that inhibition of *let-7* microRNA expression may participate in the deregulation of HMGA2 in AT but that this inhibition is neither a prominent stimulator for HMGA2 overexpression nor a surrogate to genomic HMGA2 rearrangements. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Although rearrangements of the *HMGA2* locus (12q14.3) have been well documented in benign mesenchymal tumors including lipomas [reviewed in Cleyneen and Van de Ven (2008)], the modes of *HMGA2* dysregulation in these tumors remain mysterious. First, *HMGA2* alterations are characterized by the variety of chromosomal rearrangements that include translocations, inversions, insertions, or deletions. It has been demonstrated in some cases that these rearrangements result in the formation of chimeric genes that fuse *HMGA2* with various partner genes, such as *LPP* (*Lipoma Preferred Partner*; 3q28) (Petit et al., 1996). Second, although *HMGA2* rearrangements have long been considered as exclusively associated to benign tumors, we and others have shown

that *HMGA2* is also amplified and rearranged in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas (WDLPS/DDLPS) and in carcinoma ex-pleomorphic adenoma of salivary glands (Meza-Zepeda et al., 2001; Italiano et al., 2008a; Bartuma et al., 2009; Persson et al., 2009).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supported by: Association pour la Recherche sur le Cancer, Grant number: ARC 4080; Institut National du Cancer (projet libre "GENOSTT"), Cancéropôle Provence Alpes Côte d'Azur, and Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur.

*Correspondence to: Laurence Bianchini, Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides, Faculté de Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice cedex 02, France. E-mail: laurence.bianchini@unice.fr

Received 9 November 2010; Accepted 9 February 2011

DOI 10.1002/gcc.20869

Published online 15 March 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Breakpoints have been described within, upstream or downstream of the *HMGA2* sequence (Merscher et al., 1997; Quade et al., 2003; Dal Cin et al., 2004; Otero et al., 2005; Pierantoni et al., 2005; Persson et al., 2009). In lipomas, the preferential clustering of breakpoints in the third intron of *HMGA2* (Ashar et al., 1995) results either in the expression of a truncated protein lacking the acidic COOH-terminal region and the 3' untranslated region (3' UTR) or in the expression of a chimeric protein containing the HMGA2 AT-hooks domains fused to an ectopic region from another gene (Ashar et al., 1995; Petit et al., 1996; Bartuma et al., 2007). The finding that HMGA2-LPP fusion proteins have no higher transforming ability than truncated HMGA2 led to the hypothesis that the truncation of HMGA2 was crucial for tumorigenicity (Fedele et al., 1998). Indeed, Borrmann et al. (2001) have shown that *HMGA2* expression is controlled by negatively acting regulatory elements within the 3'UTR. Strikingly, the 3'UTR of *HMGA2* contains multiple-binding sites for the *let-7* family of microRNAs (miRNAs) (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007). The respective levels of expression of *let-7* and *HMGA2* during development are inversely correlated (Miska et al., 2004). Targeted mutations of these binding sites, as well as functional inactivation of *let-7*, result in *HMGA2* overexpression (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007). Inverse correlation between *HMGA2* and *let-7* expression has been reported in various tumors including ovarian carcinomas (Mahajan et al., 2010), retinoblastomas (Mu et al., 2010), leiomyosarcomas (Shi et al., 2009), and leiomyomas (Peng et al., 2008). Such an inverse correlation has also been shown in the mouse 3T3-L1 preadipocyte cell line, suggesting a role for *let-7* in the regulation of adipogenesis (Sun et al., 2009). This potential role might be related to the involvement of *HMGA2* in both normal and neoplastic adipose tissue. Indeed, *Hmga2* knock-out mice exhibit a pygmy phenotype corresponding to a drastic reduction of adipose tissue (Zhou et al., 1995); conversely, transgenic mice expressing activating mutations of *HMGA2* develop gigantism and lipomatosis (Battista et al., 1999). In adipocytic tumors (AT), data about *HMGA2* mRNA expression (Italiano et al., 2008a; Bartuma et al., 2009) and protein status (Tallini et al., 1997; Dreux et al., 2010) are scarce. Moreover, no analysis of the status of *HMGA2* and of *let-7* in AT has been performed thus far. Approximately 50% of lipomas do not show anomalies of

the 12q14 region. In such lipomas, it can be hypothesized that *HMGA2* might be deregulated by means other than a chromosomal rearrangement such as inhibition of *let-7* expression.

Our goal was to use quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) to investigate the mRNA and protein expression of *HMGA2* as well as the expression of eight members of the *let-7* miRNA human family in a large series of liposarcomas (LPS) and lipomas with cytogenetic data. In particular, we aimed to identify how *HMGA2* expression was correlated to chromosomal rearrangements and to *let-7* miRNA expression.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Fifty-six AT were selected on the basis of their histopathologic and cytogenetic features (Table 1). Fifteen LPS (13 WDLPS/DDLPS, 1 spindle cell LPS, and 1 pleomorphic LPS) and 41 lipomas (3 intramuscular lipomas, 1 myelolipoma, 1 fibrolipoma, 1 spindle cell lipoma, 1 lipoma in a context of multiple lipomas, and 34 ordinary lipomas) were retrieved from the databases of the Laboratory of Solid Tumors Genetics (Nice, France) and the Department of Pathology of the Bergonié Institute (Bordeaux, France). The clinico-pathologic characteristics are listed in Table 1. Diagnoses were established according to the World Health Organization Classification of Tumors (Fletcher et al., 2002).

Molecular Cytogenetic Analysis

When available, a fresh fragment of the tumor was disaggregated, and cells from short-term cultures were used for metaphase chromosome preparations according to established procedures. Metaphase cells were analyzed by reverse banding using heat and Giemsa (RHG). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was done in 15 LPS and 37 lipomas with available frozen or formalin-fixed tissues to determine the genomic status of *HMGA2*, *MDM2*, and *CDK4* in these tumors. Five-micrometer sections of the formalin-fixed paraffin-embedded blocks were deparaffinized, rehydrated, and incubated with pepsin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) by using the Histology FISH Accessory Kit (Dako, Glostrup, Denmark). Bacterial artificial chromosomes (BAC) clones from the Roswell Park Cancer Institute library selected according to their

TABLE 1. Clinicopathologic and cytogenetic characteristics of 56 cases of adipocytic tumors

Case	Laboratory identification	Histology	Age (year)/sex	Location	Size (mm)	Conventional karyotype ^a
<i>Well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas with MDM2 and HMGA2 amplification</i>						
1	LPS 266	WDLPS	78/F	Thigh	250	ND
2	07T071	WDLPS	38/M	Thigh	120	ND
3	08T062	WDLPS	42/F	Leg	145	ND
4	03T084 ^b	WDLPS	73/M	Arm	130	47,XY,+r
5	04T053 ^b	WDLPS	62/M	Thigh	225	47~48,XY,+1~2r
6	04T191 ^b	WDLPS	79/F	Thigh	200	47~49,XX,+1~3r
7	05T155 ^b	WDLPS	70/M	Thigh	240	47,XY,+r
8	06T105 ^b	WDLPS	53/M	Iliac fossa	75	47,XY,+r[6]/47,XY,+mar[2]
9	99T1491 ^b	WDLPS	53/F	Retroperitoneum	ND	47~48,XX,+1~2r
10	08T500 ^b	WDLPS	63/M	Arm	135	ND
11	93T592 ^b	InflammatoryDDLPS	57/M	Arm	250	47,XY,+mar[7]/48,idem, +2mar[2]/48,idem,+r[6]/49, idem,+2mar,+r[3]/46,XY[2]
12	96T1157	WDLPS/DDLPS	73/M	Retroperitoneum	220	67~83,XX,-Y,+3~5mar,inc[cp5]
13	09T151	WDLPS	60/F	Forearm	40	ND
<i>Liposarcomas without MDM2 and HMGA2 amplification</i>						
14	96T1142 ^b	Spindle cell LPS	93/F	Thigh	70	45,XX,-7
15	07T480	Pleomorphic LPS	66/F	Thigh	120	Complex anomalies not involving 12q13-15
<i>Lipomas with HMGA2 structural rearrangement^c</i>						
16	94T685	LP	57/F	Colon	100	46,XX,t(1;12)(p31~32;q15)
17	HC651	LP	61/F	Scapular girdle	130	ND
18	01T1718	LP	53/F	Pelvis	60	46,XX,t(3;12)(q28;q14)
19	GM239	LP	60/M	Knee	50	ND
20	93T460	LP	59/F	Thigh	ND	46,XX,t(7;12)(q31;q14)
21	08T499	LP	56/F	Arm	170	Complex translocations involving chromosomes 3,7,11 and 12
22	93T529	IM LP ^d	65/F	Shoulder	40	46,XX,ins(16;12)(p12;q14q15), t(19;20)(p13;p11)
23	FH922	LP	37/M	Axilla	140	ND
24	FS403	LP	43/M	Thigh	70	ND
25	GK179	LP	46/M	Forearm	90	ND
26	FZ86	LP	59/F	Chest wall	90	ND
27	GJ25	LP	63/F	Thigh	60	ND
28	09T225	LP	46/M	Neck	ND	46,XY,t(3;12)(q28;q14)
29	GU845	LP	68/M	Thigh	200	ND
30	GB484	LP	59/F	Thigh	150	ND
31	GZ241	LP	47/M	Scapular girdle	120	ND
<i>Lipomas without HMGA2 structural rearrangement^c</i>						
32	GY81	LP	78/M	Chest wall	70	ND
33	GI677	LP	56/M	Chest wall	50	ND
34	GY766	LP	51/F	Abdomen	160	ND
35	GQ529	LP	44/M	Thigh	150	ND
36	HA27	LP	31/F	Arm	80	ND
37	FP392	LP	55/M	Arm	120	ND
38	GS451	LP	59/M	Forearm	140	ND
39	GD784	LP	47/M	Forearm	60	ND
40	GD233	LP	0,5/M	Chest wall	60	ND
41	GR84	LP	53/F	Chest wall	100	ND
42	HB667	LP	56/M	Head and neck	35	ND
43	09T519	LP	36/F	Iliac crest	45	46,XX,t(12;13)(q14;q34)
44	FL803	Fibrolipoma ^d	1/M	Chest wall	30	ND
45	93T485	LP ^{d,e}	43/M	Inguinal	40	46,XY
46	09T013	LP	53/M	Inguinal	100	Complex structural anomalies involving 1p, 12q, 16q, 22q
47	08T680 ^f	Myelolipoma ^d	46/M	Retroperitoneal	220	46,XY

(Continued)

TABLE 1. Clinicopathologic and cytogenetic characteristics of 56 cases of adipocytic tumors (Continued)

Case	Laboratory identification	Histology	Age (year)/sex	Location	Size (mm)	Conventional karyotype ^a
48	09T306 ^f	IM LP ^d	81/F	Thigh	200	46,XX,del(1)(q25),inv(2)(p11q37),t(2;8)(q22;q24)
49	93T644 ^b	Spindle cells LP ^d	54/M	Cervical	40	45,XY,der(5)t(5;6)(q11;p11),-6,add(10)(p11),del(13)(q12)
50	93T591	IM LP ^d	26/M	Thigh	150	46,XY,t(9;11)(p11;p15.3)
51	09T521 ^g	LP	60/M	Neck	ND	Complex rearrangements involving chromosomes 1,6,12,13,17,22
52	GJ915	LP	70/M	Arm	130	ND
<i>Lipomas (FISH data for HMGA2 not available)</i>						
53	04T075 ^{b,g}	LP	62/F	Shoulder	ND	Complex translocations involving chromosomes 3, 4, 6, 14
54	GQ417	LP	44/F	Arm	100	ND
55	GB655	LP	50/F	Thigh	150	ND
56	GL354	LP	67/F	Thigh	60	ND

F, female; M, male; ND, not done; LPS, liposarcoma; WDLPS/DDLPs, well-differentiated liposarcoma/dedifferentiated liposarcoma; LP, lipoma; IM LP, intramuscular lipoma.

^aAccording to ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. Basel: S. Karger.

^bFISH and molecular analysis of cases 4, 5, 6, 7, 8, and 53 (Italiano et al., 2008a), case 9 (Sirvent et al., 2000), case 10 (Italiano et al., 2009), case 11 (Coindre et al., 2004), case 14 (Italiano et al., 2008b) and case 49 (Dahlen et al., 2003) have been partially described previously.

^cBased on FISH analysis with RP11-30111 and RP11-118B13 probes.

^dNon ordinary lipomas.

^eContext of multiple lipomas.

^fCases showing no rearrangement of the *HMGA1* region based on FISH analysis with RP11-513I15 and RP11-375E1 probes.

^gCases showing rearrangement of the *HMGA1* region based on FISH analysis with RP11-513I15 and RP11-375E1 probes.

location on the University of California Santa Cruz database (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009 release) were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, <http://bacpac.chori.org/>) and prepared for FISH analysis according to standard procedures. We used the following probes: RP11-30111 (chr12: 65,892,238-66,063,441; *HMGA2* 5' region), RP11-299L9 (chr12:66,049,805-66,225,867; *HMGA2* exons 1 and 2), and RP11-118B13 (chr12: 66,358,701-66,502,988; *HMGA2* 3' region) (Fig. 1). FISH analysis for the *HMGA1* region (6p21.3) was performed with the following probes: RP11-513I15 (chr6:34,100,439-34,252,266) and RP11-375E1 (chr6:34,382,492-34,565,727). FISH images were processed using the ISIS software (MetaSystems, Altussheim, Germany).

Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA was extracted from 41 lipomas, 15 LPS, and normal subcutaneous adipose tissue (NSAT) using the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). The RNA samples were treated with the DNA-free kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). The quality of the iso-

lated RNA was determined using the 2100 BioAnalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with the RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). For *HMGA2* mRNA expression detection, one microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). *RPLP0* was used as endogenous control for normalization (Gabrielsson et al., 2005). Because *HMGA2* expression was undetectable in control NSAT (Ct > 35 cycles), we performed a preamplification reaction by using the TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems). The preamplification reaction was performed using 25 ng of cDNA according to the manufacturer's instructions. For *let-7* expression detection, total RNA (10 ng) was reverse transcribed into cDNA using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) including a stem loop primer specific of each mature miRNA. *RNU48* (small nucleolar RNA) was used as endogenous control for normalization. QRT-PCR was performed using the following TaqMan gene expression and miRNA assays (Applied Biosystems): Hs00171569_m1 (*HMGA2*, exons 1–2), Hs00971724_m1 (*HMGA2*, exons 3–4),

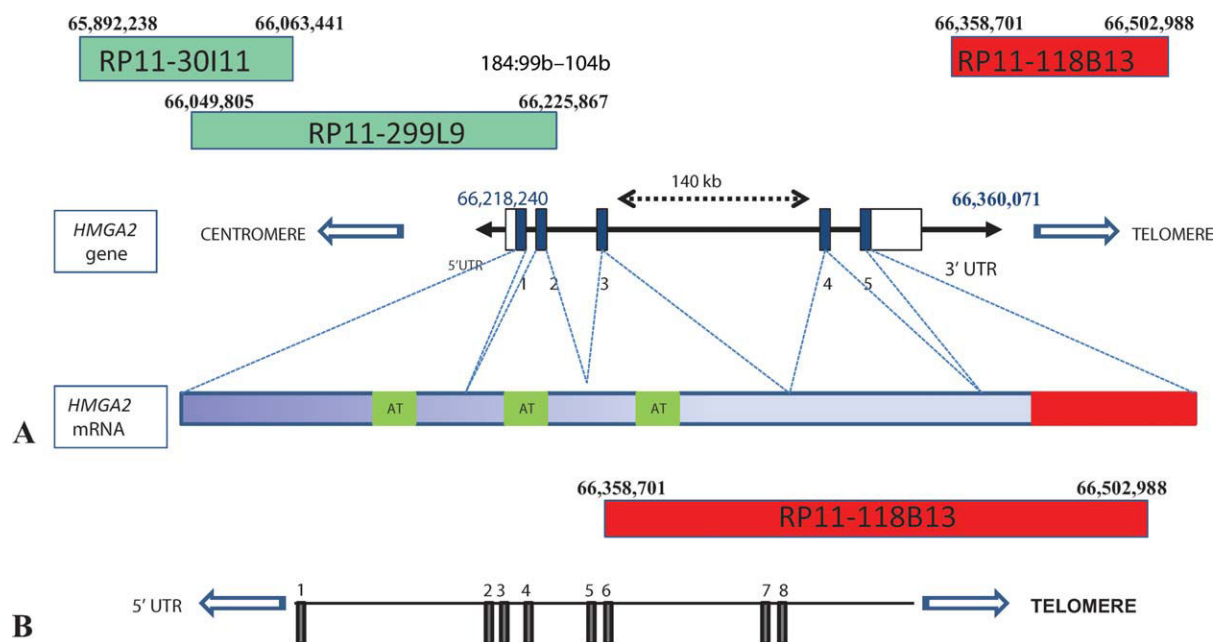


Figure 1. Schematic illustration of the *HMGA2* gene and *let-7* binding sites. A: Schematic representation of the *HMGA2* gene (12q14.3). The upper part indicates the locations of BAC clones RP11-30I11, RP11-299L9, and RP11-118B13 in regard to *HMGA2* (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009 release). The lower part shows *HMGA2* mRNA with the three AT-hooks domains (AT) and the polyA

region. Bp positions are based on the nucleotide sequence of NM_003483.4. B: Schematic representation of *HMGA2* 3'UTR. The upper part indicates the location of BAC clone RP11-118B13 in regard to *HMGA2* 3'UTR. Reported binding sites for *let-7* (Lee and Dutta, 2007) are shown as solid rectangles with nucleotide positions on chromosome 12.

Hs00971725_m1 (*HMGA2*, exons 4–5), Hs99999902_m1 (*RPLP0*), hsa-let-7a 000377 (*let-7a*), hsa-let-7b 000378 (*let-7b*), hsa-let-7c 000379 (*let-7c*), hsa-let-7d 002283 (*let-7d*), hsa-let-7e 000381 (*let-7e*), hsa-let-7f 000382 (*let-7f*), hsa-let-7g 000383 (*let-7g*), hsa-let-7i 000384 (*let-7i*), and 001006 (*RNU48*). The reaction mix consisted of 10 μ l of TaqMan universal master mix 2 $\times$, 1 μ l of TaqMan gene expression assay, and 5 μ l containing 5 ng of cDNA (*HMGA2* expression) or 1 ng of cDNA (*let-7* expression) in a final volume of 20 μ l.

The PCR conditions were as described previously (Italiano et al., 2008a). The comparative Ct (threshold cycle) method was used to achieve relative quantification of gene expression (Italiano et al., 2008a). Each q-PCR experiment was performed twice in triplicate with the ABI PRISM 7500 Detection System using FAM dyes (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Overexpression of *HMGA2* was defined as a log₁₀ value of >1 for exons 1–2, exons 3–4, or exons 4–5. Differential expression was defined as expression levels of exons 1–2 ten times or more higher than expression levels of exons 3–4 or exons 4–5.

Expression of *let-7* in the tumors was considered to be inhibited when the fold change was equal or less than 0.52 when compared with NSAT. The expression of *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, and *let-7i* was assessed in NSAT used as normalizer tissue. The highest level of expression in NSAT was detected for *let-7a* and *let-7b*, followed by *let-7g* and *let-7c*, then *let-7d*, *let-7f* and *let-7i*, finally, *let-7e*, which showed the lowest expression.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) studies were done on 4- μ m-thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from 15 LPS and 41 lipomas using a BenchMark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ) with a rabbit polyclonal antihuman HMGA2-P1 (Biocheck, Foster City, CA) antibody at a dilution of 1:500. HMGA2-P1 is directed against amino acids 8–26, corresponding to a part of the first exon of *HMGA2*. Heat epitope retrieval was provided according to the Cell Conditioning 1 standard protocol (Ventana). The antibody was incubated at 37°C for 60 min. Enzymatic reactivity was visualized with 3,3'-

diaminobenzidine, UltraView Universal DAB (Ventana). WDLPS and adult NSAT samples were used as positive and negative controls, respectively. The slides were examined independently by three observers (E.S, J.H, and M.M) in a blinded manner. Intensity of the anti-HMGA2 staining was scored as null (0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+: corresponding to the intensity of the positive controls). In case of a patchy, heterogeneous staining, the score value referred to the strongest intensity.

Statistical Analysis

Biostatistical analyses were performed by using the R-2.10.1 software for Windows. Statistical comparisons were performed by using Chi2 or Fisher's exact tests for categorical data, Student's *t*-test, or Wilcoxon tests for quantitative data. The associations between the expression levels of *HMGA2* and *let-7* were analyzed by using Pearson's correlation coefficient and confirmed with Spearman's correlation coefficient (perfect correlation, $r = 1.0$). Results were considered significant when the *P* value (two-tailed) was 0.05 or less.

RESULTS

Liposarcomas

All the karyotyped WDLPS/DDLPS showed the presence of supernumerary ring or giant markers chromosomes (Table 1). *MDM2* and *CDK4* were amplified in 13 of 13 and 7 of 13 WDLPS/DDLPS cases evaluated by FISH analysis, respectively. Exons 1–2 of *HMGA2* (based on results obtained with RP11-299L9 probe) were amplified in all the WDLPS/DDLPS cases tested (Fig. 2A). By contrast, no amplification of *HMGA2*, *MDM2*, or *CDK4* was detected in the pleomorphic LPS that presented complex chromosomal rearrangements not involving the 12q14–15 region and the spindle-cell LPS that showed monosomy 7 as the sole anomaly (Italiano et al., 2008b).

Overexpression of exons 1–2 of *HMGA2* was detected by qRT-PCR in 13 of 13 WDLPS/DDLPS analyzed, associated with overexpression of exons 3–4 and exons 4–5 in 7 of 13 cases (Table 2 and Fig. 3A). A moderate expression of the gene was detected in the pleomorphic LPS while no expression was detected in the spindle-cell LPS (Table 2). The level of expression of *HMGA2* was not statistically linked to any of the anatomoclinical features (sex, age, size, and ana-

tomical location). By using IHC, we detected expression of HMGA2 in 10 of 12 WDLPS/DDLPS (Fig. 2B and Table 2) and no staining in the spindle cell and the pleomorphic LPS (Table 2).

Analysis of *let-7* expression was performed in the 13 WDLPS/DDLPS (Fig. 4A, Supporting Information Table S1). A significant inhibition of expression was detected for *let-7b* (mean fold value = 0.54; Fig. 4A). *Let-7a* was inhibited in five cases (38%), *let-7b* in eight cases (61%), *let-7c* in five cases (38%), *let-7d* in three cases (23%), *let-7e* in three cases (23%), *let-7f* in three cases (23%), *let-7g* in eight cases (61%), and *let-7i* in three cases (23%) (Supporting Information Table S1). None of the LPS presented inhibition of all *let-7* members but five of them showed inhibition of half or more of them.

Lipomas

Among the 15 lipomas with cytogenetic data, we distinguished three groups according to their karyotypes: (i) anomalies of the 12q13–15 region (cases 16, 18, 20, 21, 22, 28, 43, and 46); (ii) structural chromosomal rearrangements involving regions other than 12q13–15 (cases 48, 49, 50, 51, and 53); (iii) Apparently normal karyotype (cases 45 and 47; Table 1).

We analyzed 37 of the 41 lipomas by FISH using RP11-30I11 and RP11-118B13 probes that flank *HMGA2* (Fig. 1). Structural rearrangements of *HMGA2* were observed in 16 cases (43%; Fig. 2C and Table 2). In cases 32–36, we detected no structural rearrangement of *HMGA2* but gain of copies. In 16 cases (cases 37–52, 43%), we did not detect any *HMGA2* alteration (Fig. 2E and Table 2). In two cases showing complex rearrangements involving chromosome 6 (cases 51 and 53), we detected a rearrangement of the *HMGA1* region (6p21) using RP11-513I15 and RP11-375E1 probes (data not shown).

By using qRT-PCR, we observed overexpression of *HMGA2* mRNA in 34 of 41 lipomas (83%; Table 2 and Figs. 3B and 3C). A strong expression of *HMGA2* mRNA was detected in 16 of 16 (100%) lipomas with a structural rearrangement of *HMGA2* and in 16 of 21 (76%) lipomas without structural rearrangement of *HMGA2* (fold change mean value: 1,571 vs. 922, $P = 0.15$, p-Student's test; fold change median value: 1,292 vs. 214, $P = 0.015$, p-Wilcoxon test). Levels of expression of exons 1–2 of *HMGA2* were significantly higher in WDLPS/DDLPS than in all lipomas (fold

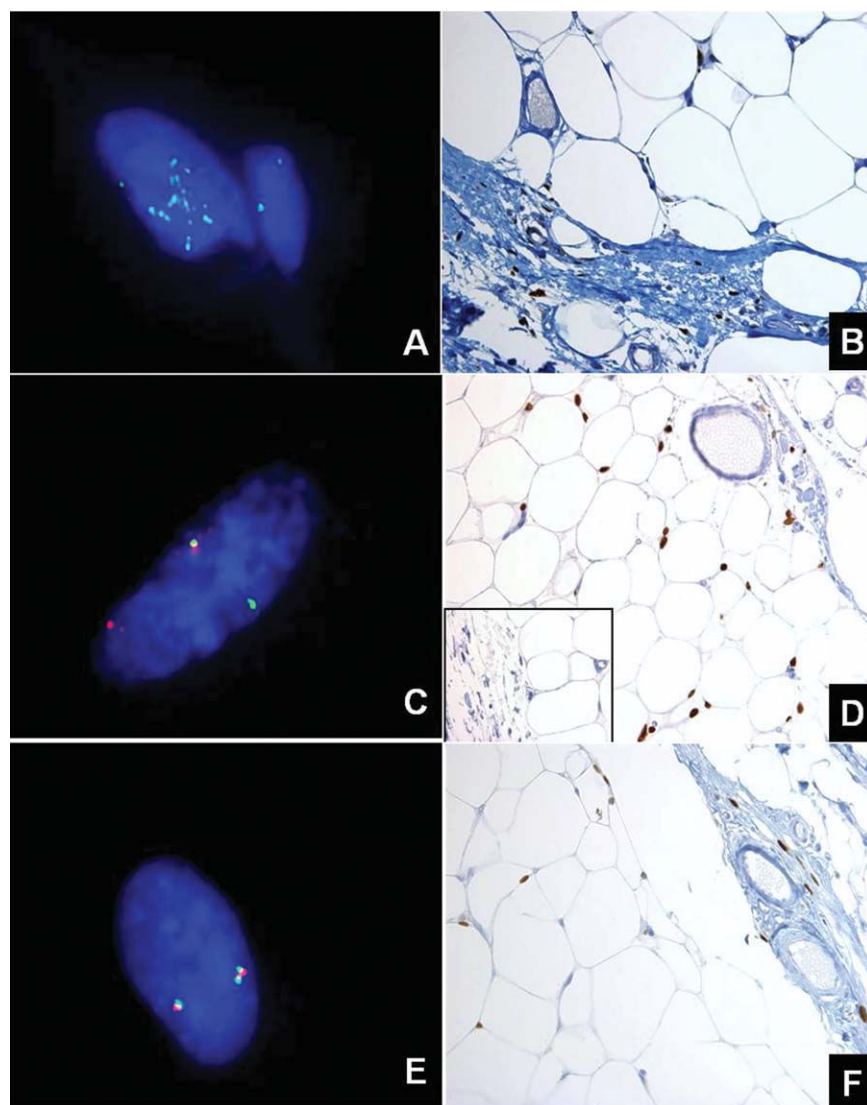


Figure 2. Analysis of the *HMGA2* gene by interphase FISH (A, C, E) and of the *HMGA2* protein by immunohistochemistry (B, D, F) in WDLPS/DDLPS and lipomas. A, B: Well-differentiated liposarcoma case 2. A: Amplification detected by the presence of multiple green signals using the RP11-299L9 probe containing the *HMGA2* exons 1 and 2. B: Nuclear staining of the *HMGA2* protein (score 2+). C, D: Lipoma case 19. C: Structural rearrangement of the *HMGA2* gene detected by separation of signals for the RP11-30111 (5' region; green signal) and RP11-118B13 (3' region; red signal) probes. Overlapped

green/red signals correspond to the normal *HMGA2* allele. D: Nuclear staining of the *HMGA2* protein (score 2+). Insert: adjacent normal adipose tissue used as internal negative control. E, F: Lipoma case 40. E: Two overlapped green/red signals corresponding to the RP11-30111 (5' region; green signal) and RP11-118B13 (3' region; red signal) probes indicate the absence of rearrangement of *HMGA2*. F: Nuclear staining of the *HMGA2* protein (score 2+). A, C, E: Nuclei are counterstained in blue by DAPI.

change mean value: 5,342 vs. 1,216, $P = 0.01$, p-Student's test; fold change median value: 4,989 vs. 645, $P < 0.001$, p-Wilcoxon test) as well as than in lipomas with *HMGA2* rearrangement (fold change mean value: 5,342 vs. 1,571, $P = 0.05$, p-Student's test; fold change median value: 4,989 vs. 1,292, $P = 0.02$, p-Wilcoxon test). Levels of expression of *HMGA2* mRNA were weak to moderate in five out of seven non ordinary lipomas (fold change = 23–207; Table 2).

HMGA2 overexpression always included exons 1–2. Exons 3–4 were overexpressed in 18 lipomas (5 lipomas with *HMGA2* structural rearrangement, 12 lipomas without structural rearrangement, and 1 lipoma with *HMGA2* genomic status undetermined). Exons 4–5 of *HMGA2* were overexpressed in 11 of 41 lipomas (three lipomas with *HMGA2* structural rearrangement and eight lipomas without structural rearrangement). A differential expression of *HMGA2* mRNA was observed

TABLE 2. *HMGA2* Genomic Alterations and Expression Detected by FISH, qRT-PCR, and IHC

Case	HMGA2 exons 1–2 (qRT-PCR) fold change	HMGA2 qRT-PCR ^a			IHC score intensity ^b
		Exons 1–2	Exons 3–4	Exons 4–5	
Liposarcomas					
1	4,672	+	+	+	2+
2	5,607	+	+	+	2+
3	20,880	+	–	–	2+
4	1,495	+	+	+	1+
5	791	+	–	–	1+
6	4,989	+	+	+	1+
7	7,132	+	–	–	1+
8	2,524	+	–	–	2+
9	405	+	–	–	0
10	5,196	+	–	–	3+
11	5,573	+	+	+	0
12	8,378	+	+	+	2+
13	1,810	+	+	+	ND
14	9	–	–	–	0
15	395	+	+	+	0
Lipomas with HMGA2 structural rearrangement ^c					
16	1,218	+	–	–	1+
17	310	+	+	+	2+
18	1,517	+	+	+	2+
19	5,195	+	–	–	2+
20	25	+	+	+	2+
21	1,300	+	+	–	3+
22	1,284	+	–	–	1+
23	2,781	+	–	–	2+
24	1,000	+	–	–	1+
25	2,356	+	–	–	2+
26	488	+	–	–	1+
27	1,837	+	–	–	1+
28	1,078	+	–	–	2+
29	2,799	+	–	–	2+
30	1,400	+	–	–	1+
31	555	+	+	–	1+
Lipomas without structural rearrangement of HMGA2 ^c					
32	214	+	+	+	1+
33	1,002	+	–	–	2+
34	645	+	+	–	1+
35	1,163	+	+	+	0
36	1	–	–	–	0
37	4,020	+	+	+	3+
38	1,819	+	+	+	2+
39	3,834	+	+	–	3+
40	1,485	+	+	+	2+
41	283	+	–	–	1+
42	111	+	+	+	1+
43	423	+	+	–	3+
44	4,035	+	+	–	0
45	207	+	–	–	0
46	27	+	+	+	0
47	75	+	+	+	0
48	23	+	–	–	0
49	2	–	–	–	0
50	3	–	–	–	0
51	1	–	–	–	0
52	2	–	–	–	0
Lipomas (FISH data for HMGA2 not available)					
53	3	–	–	–	0
54	338	+	+	–	2+
55	0	–	–	–	0
56	4,997	+	–	–	3+

FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry; qRT-PCR, quantitative RT-PCR.

^a*HMGA2* expression: *HMGA2* overexpression was defined as a fold change ≥ 10 for exons 1–2 (+). Exons 3–4 and 4–5 of *HMGA2* were considered overexpressed (+) if their fold changes were at least equal to 1/10 of exons 1–2 fold change.^bIHC: Intensity of the anti-*HMGA2* staining was scored as: null (0), weak (1+), moderate (2+), and strong (3+).^cBased on FISH analysis with probes RP11-30111 and RP11-118B13.

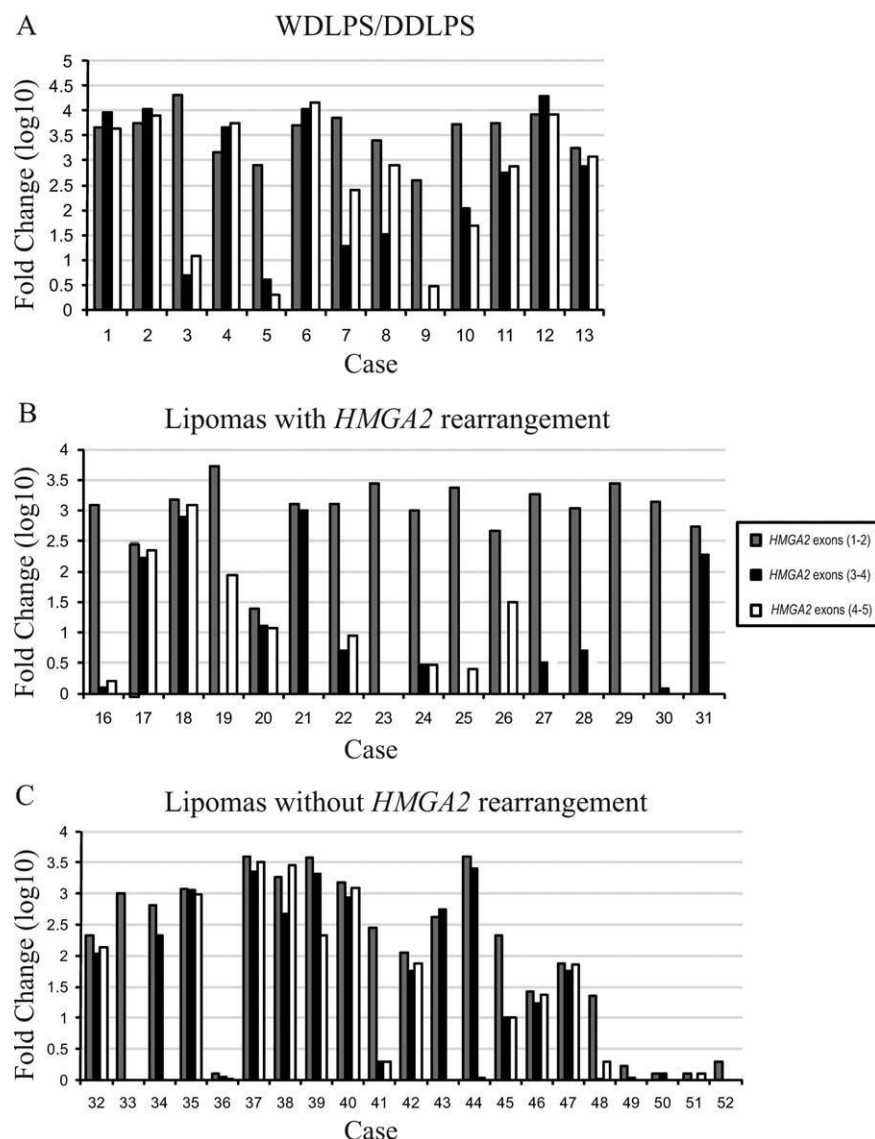


Figure 3. Expression pattern (log₁₀ scale) of exons 1–2, exons 3–4, and exons 4–5 of *HMGA2* using qRT-PCR in (A) 13 WDLPS/DDLPS, (B) 16 lipomas with a structural rearrangement of *HMGA2*, and (C) 21 lipomas without structural rearrangement of *HMGA2*. *HMGA2* mRNA was expressed as fold changes relative to NSAT from control individuals.

in 81% of lipomas (13 of 16) with structural rearrangement of *HMGA2* versus 50% of lipomas (8 of 16) without structural rearrangement of *HMGA2* (Table 2 and Figs. 3B and 3C). The expression level of exons 1–2 was higher in cases showing a differential expression than in cases showing no differential expression ((mean values: 1,647 vs. 1,087). In cases 49, 50, 51, and 53, the karyotypes of which showed structural chromosomal rearrangement of regions other than the 12q13–15, no expression of *HMGA2* was detected by qRT-PCR (Table 2).

By using IHC, we detected *HMGA2* protein expression in 68% of lipomas (28 of 41; Figs. 2D and 2F and Table 2), including 100% of lipomas (16 of 16) with rearrangement of *HMGA2* and 48% of lipomas (10 of 21) without structural rearrangement of *HMGA2* ($P = 0.0006$, Fisher test). Expression of the protein was not detected in the seven lipomas without expression of *HMGA2* mRNA and in six lipomas (including four non ordinary lipomas) expressing the mRNA. *HMGA2* protein was less frequently expressed in non ordinary lipomas than in ordinary lipomas: 14% (1 of 7)

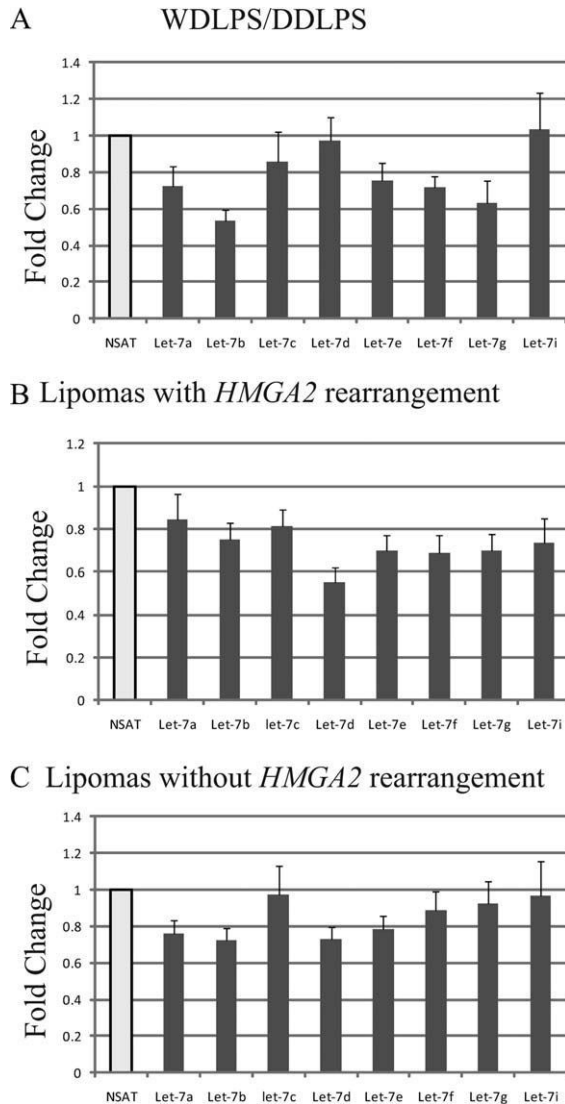


Figure 4. Expression pattern of *let-7* miRNAs using qRT-PCR in (A) 13 WDLPS/DDLPS, (B) 16 lipomas with a structural rearrangement of *HMGA2*, and (C) 21 lipomas without structural rearrangement of *HMGA2*. *Let-7*s (dark gray bars) are expressed as fold changes (mean values $\pm$ SE) relative to NSAT from control individuals (light gray bar).

versus 79% (27 of 34; $P = 0.003$, χ^2 test; $P = 0.002$, Fisher test).

Analysis of *let-7* expression was performed in the lipomas (Figs. 4B and 4C, Supporting Information Table S1). Among 41 lipomas, *let-7a* was inhibited in 11 cases (27%), *let-7b* in 13 cases (32%), *let-7c* in 12 cases (29%), *let-7d* in 16 cases (39%), *let-7e* in 11 cases (27%), *let-7f* in 13 cases (32%), *let-7g* in 13 cases (32%), and *let-7i* in 14 cases (34%) (Supporting Information Table S1). Inhibition of expression of *let-7* was randomly observed among lipomas without a significant link with anatomoclinical features. The expres-

sion level of *let-7d* was lower in lipomas with *HMGA2* rearrangement than in lipomas without *HMGA2* rearrangement (fold change mean value: 0.55 vs. 0.73, $P = 0.06$, p-Student's test; fold change median value: 0.5 vs. 0.65, $P = 0.07$, p-Wilcoxon test; Figs. 4B and 4C). In lipomas showing expression of *HMGA2* exons 1–2, the levels of expression were higher in lipomas without inhibition of *let-7* members than in lipomas with at least one inhibited *let-7* (mean level: 2,211 vs. 1,109).

Comparative Patterns of Expression of *let-7* Members

A strong correlation was detected between *let-7a* and *let-7b* expression ($r = 0.83$), *let-7a* and *let-7g* expression ($r = 0.7$), and *let-7f* and *let-7g* expression ($r = 0.73$; Table 3). *Let-7b* was expressed in WDLPS/DDLPS at a lower level than in lipomas (fold change mean value: 0.54 vs. 0.74, $P = 0.01$, p-Student's test; fold change median value: 0.47 vs. 0.73, $P = 0.04$, p-Wilcoxon test) and expressed in nonordinary lipomas at a level lower than in ordinary lipomas (fold change mean value: 0.56 vs. 0.78, $P = 0.05$, p-Student's test; fold change median value: 0.55 vs. 0.78, $P = 0.07$, p-Wilcoxon test). *Let-7d* expression level was lower in lipomas than in WDLPS/DDLPS (fold change mean value: 0.68 vs. 0.97, $P = 0.05$, p-Student's test; fold change median value: 0.65 vs. 0.96, $P = 0.03$, p-Wilcoxon test) and expressed in ordinary lipomas at a lower level than in nonordinary lipomas (fold change mean value: 0.63 vs. 0.93, $P = 0.02$, p-Student's test; fold change median value: 0.6 vs. 0.95, $P = 0.02$, p-Wilcoxon test). A low expression of *let-7a*, *let-7b*, and *let-7e* was significantly associated with a null expression of *HMGA2* protein (respectively, *let-7a* fold change: 0.57 vs. 0.87, $P = 0.003$, p-Student's test; 0.5 vs. 0.83, $P = 0.01$, p-Wilcoxon test; *let-7b* fold change: 0.52 vs. 0.75, $P = 0.002$, p-Student's test; 0.48 vs. 0.77, $P = 0.009$, p-Wilcoxon test; *let-7e* fold change: 0.61 vs. 0.8, $P = 0.04$, p-Student's test; 0.57 vs. 0.76, $P = 0.01$, p-Wilcoxon test).

DISCUSSION

We have analyzed the genomic and expression status of *HMGA2* and the potential role of *let-7* miRNAs in the regulation of *HMGA2* expression in a series of LPS and lipomas. We aimed to comprehensively explore DNA and RNA alterations

TABLE 3. Correlations Between Expressions of *let-7* miRNAs and *HMGA2* Exons 1–2 Determined by qRT-PCR

	<i>Let-7a</i>	<i>Let-7b</i>	<i>Let-7c</i>	<i>Let-7d</i>	<i>Let-7e</i>	<i>Let-7f</i>	<i>Let-7g</i>	<i>Let-7i</i>	<i>HMGA2</i> exons 1–2
<i>Let-7a</i>	1								
<i>Let-7b</i>	0.83	1							
<i>Let-7c</i>	0.42	0.53	1						
<i>Let-7d</i>	0.15	−0.02	0.11	1					
<i>Let-7e</i>	0.56	0.62	0.69	0.33	1				
<i>Let-7f</i>	0.59	0.56	0.32	0.03	0.47	1			
<i>Let-7g</i>	0.7	0.65	0.28	0.13	0.35	0.73	1		
<i>Let-7i</i>	0.38	0.45	0.28	0.03	0.45	0.57	0.52	1	
<i>HMGA2</i> exons 1–2	0.05	−0.08	0	0.02	−0.03	−0.11	−0.15	−0.08	1

The associations between the expression levels of *HMGA2* exons 1–2 and *let-7* were analyzed by using Pearson's correlation coefficient and confirmed with Spearman's correlation coefficient (perfect correlation, $r = 1.0$).

and their consequences on *HMGA2* deregulation in AT. Indeed, most published data were partial, focusing separately either on the genomic or expression issues. Moreover, studies concerning *HMGA2* protein in AT are scarce and need further development in regard to genomic and mRNA alterations (Tallini et al., 1997; Dei Tos et al., 2000; Tallini et al., 2000; Dreux et al., 2010).

In LPS, our results confirm the crucial role of *HMGA2*. Indeed, we found overexpression of *HMGA2* mRNA in 100% of the WDLPS/DDLPS, in accordance with our genomic data that showed amplification of exons 1 and 2 of *HMGA2* in 100% of cases as well as with data from other groups (Berner et al., 1997; Italiano et al., 2008a; Bartuma et al., 2009). Protein expression was found in 83% of cases, which is consistent with the results presented recently by Dreux et al. (2010). Thus far, the cause of discrepancy between mRNA and protein expression levels is not known. A similar feature has been reported in thyroid carcinomas (Chiappetta et al., 2008). It could result from post-transcriptional mechanisms (Eulalio et al., 2007). It might also be due to lesser sensitivity of the IHC technique compared to q-RT-PCR. To note, the two WDLPS/DDLPS IHC negative cases were the oldest of the series (archived 12 and 17 years in paraffin blocks). In the study by Dreux et al. (2010), the protein level has mainly been evaluated on tissue micro-arrays, a method that might give only a partial overview of a tumor tissue.

In lipomas, using break-apart FISH probes for *HMGA2*, we observed a structural rearrangement in 42% of the cases. This proportion is similar with those reported in previous studies (Mandahl et al., 1994; Schoenmakers et al., 1995; Bartuma et al., 2007; Billing et al., 2008). We observed mRNA and protein expression in 83% and 68%

of the cases, respectively. In all the cases showing *HMGA2* rearrangement, we detected both mRNA and protein overexpression. Strikingly, as much as 76% and 48% of cases among lipomas without apparent *HMGA2* genomic rearrangement showed overexpression of mRNA or protein, respectively. We cannot exclude that, in some cases, *HMGA2* rearrangement detection might have been below the threshold of FISH sensitivity. Moreover, whereas in lipomas breakpoints often occur in the large third intron of *HMGA2* (Ashar et al., 1995), breakpoints in other benign tumors such as uterine leiomyomas can be found in the 5' region, more than 100 kb upstream of the *HMGA2* coding region (Quade et al., 2003). Therefore, we cannot exclude that *HMGA2* might have been deregulated in a few cases in the present series as a consequence of a breakpoint located outside the region covered by the RP11-30I11 and RP11-118B13 probes. However, it is unlikely that these limitations accounted for a significant number of cases. Altogether, our results indicate that in 43% (16 of 37) of lipomas, *HMGA2* overexpression was not induced by a structural rearrangement within or nearby the *HMGA2* gene. Expression of *HMGA2* protein in cases without *HMGA2* rearrangement has already been reported in lipomas (Tallini et al., 2000) and in pediatric pleomorphic adenomas of salivary glands (Craver et al., 2010).

We therefore hypothesized that *let-7* miRNAs might be responsible for *HMGA2* overexpression in this subset of lipomas. Although an inverse correlation between *HMGA2* and *let-7* levels has been reported in several types of tumors (Boyerinas et al., 2010), it had never been investigated in AT. Moreover, most studies on *let-7* were restricted to one or two members of the *let-7* family. Although we did not observe any global correlation between the inhibition of expression

of *let-7* family and the expression levels of *HMGA2*, we detected some significant changes in the level of expression of some individual *let-7* miRNAs. In most WDLPS/DDLPs (10 of 13) inhibition of at least one member of the *let-7* family was observed. Notably, *let-7b* and *let-7g* were inhibited in 61% of cases. *Let-7b* expression level was significantly lower in WDLPS/DDLPs than in lipomas. In lipomas, each member of the *let-7* family was inhibited in approximately one-third of the cases. Unexpectedly, we found that a low expression of *let-7a*, *let-7b*, and *let-7e* was significantly associated with a null expression of *HMGA2* protein. These results allow us to speculate that in the lipomas that do not express *HMGA2*—mostly non ordinary lipomas—tumorigenesis may involve genes other than *HMGA2* that are also targets of *let-7* miRNAs.

Altogether, our results suggest that (i) a decrease in the expression of *let-7* does not appear to be the main mechanism accounting for *HMGA2* deregulation in AT and (ii) *let-7* miRNAs may be involved in the pathogenesis of AT, but through mechanisms other than those expected. For instance, *let-7* miRNAs might target oncogenes such as *MYC* or *RAS* as well as genes involved in cell cycle and cell proliferation (Barh et al., 2010).

The importance of loss of regulatory sequences from the 3'UTR of *HMGA2* has been shown by Bartuma et al. (2009). These authors observed a significant reduction of expression of the 3' region containing the binding sites for *let-7* in almost all of the 18 lipomas they analyzed. Surprisingly, this feature was observed in nine lipomas showing expression of the full-length *HMGA2* gene and normal *HMGA2* loci by FISH analysis. The mechanism underlying this systematic loss or reduction of expression of the 3'UTR in lipomas overexpressing *HMGA2* remains to be elucidated. Breakpoints in the 3'UTR have also been reported in lipomas (Schoenmakers et al., 1995; Wang et al., 2009). In the two cases described by Wang et al. (2009), the breakpoints occurred between the *let-7* consensus-binding sites (CBS) 1 and 2 allowing the authors to suggest that the elimination of *let-7* CBS 1 was not critical for transcriptional upregulation of *HMGA2*.

According to in silico predictions, *HMGA2* might contain target sites for more than 30 miRNAs other than *let-7* (Peng et al., 2008). Moreover, 10 AUUUA motifs of AU-rich elements (ARE) are present in the 3'UTR of *HMGA2*. It has been suggested that loss of these elements is

responsible for the upregulation of *HMGA2* (Borrmann et al., 2001). These motifs might play a role in the destabilization of *HMGA2* mRNA via the ARE-mediated mRNA decay (AMD pathway) (Eulalio et al., 2007). AMD and *let-7* regulation might cooperatively contribute to the repression of *HMGA2* expression. Along those lines, it has recently been shown that proliferating cells tend to express mRNA with shortened 3'UTR regions. This would allow polyadenylation sites to escape regulation by miRNAs (Mayr and Bartel, 2009). Aberrant expression of *HMGA2* might also result from activating mutations or polymorphisms in the DNA sequence. Indeed, single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the 3'UTR of target genes have recently been involved in miRNA-mediated control of gene expression (Chin et al., 2008). For instance, SNP (rs1042725) located in *HMGA2* 3'UTR very close to a *let-7*-binding site and potentially able to abolish *let-7* binding has been associated with height determination (Lettre et al., 2008). In this purpose, search for mutations or polymorphisms in *HMGA2* sequence potentially leading to its overexpression deserves further investigation.

In conclusion, we present in this study the first comprehensive analysis describing alterations of *HMGA2* mRNA and protein in a large series of both benign and malignant AT with molecular and cytogenetic data. In addition, our study provides a complete overview of the expression profiles of eight members of the *let-7* family highlighting interesting correlations of expression between some members of the *let-7* family.

Our results show that amplification and rearrangements at the *HMGA2* locus systematically induce *HMGA2* overexpression. A decrease in *let-7* expression does not appear to be responsible for *HMGA2* overexpression in cases of lipomas without *HMGA2* rearrangement. Therefore, overexpression of *HMGA2* in AT showing no *HMGA2* rearrangement is induced by mechanisms that remain to be elucidated. We have detected significant changes in the level of expression of some *let-7* in AT, suggesting that they might be involved in the pathogenesis of AT by targeting genes other than *HMGA2*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to J.M. Coindre (Institut Bergonié, Bordeaux), J.F. Michiels (Centre Hospitalier Universitaire de Nice), P. Terrier (Institut Gustave Roussy, Villejuif), F. Dupré and her

team (Hôpital Princesse Grace, Monaco), F. Collin (Centre Georges-François Leclerc, Dijon), A. Leroux (Centre Alexis Vautrin, Nancy), D. Ranchere-Vince (Centre Léon-Bérard, Lyon), M. Peoc'h (Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne) and J. Jacquemier (Institut Paoli-Calmettes, Marseille) for providing adipose tumor samples and histological data. We thank V. Velasco and S. Bonnafous for their expert technical assistance.

REFERENCES

- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Wermowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding at hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57–65.
- Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. 2010. MicroRNA let-7: An emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol* 17:70–80.
- Bartuma H, Hallor KH, Panagopoulos I, Collin A, Rydholm A, Gustafson P, Bauer HC, Brosjo O, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. 2007. Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 46:594–606.
- Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, Trombetta D, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. 2009. Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 8:36.
- Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJ, Outwater E, Brunner H, Santoro M, Croce CM, Fusco A. 1999. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 59:4793–4797.
- Berner JM, Meza-Zepeda LA, Kools PF, Forus A, Schoenmakers EF, Van De Ven WJ, Fodstad O, Myklebost O. 1997. HMGI-C, the gene for an architectural transcription factor, is amplified and rearranged in a subset of human sarcomas. *Oncogene* 14:2935–2941.
- Billing V, Mertens F, Domanski HA, Rydholm A. 2008. Deep-seated ordinary and atypical lipomas: Histopathology, cytogenetics, clinical features, and outcome in 215 tumours of the extremity and trunk wall. *J Bone Joint Surg Br* 90:929–933.
- Bormann L, Wilkening S, Bullerdick J. 2001. The expression of HMGA genes is regulated by their 3'UTR. *Oncogene* 20:4537–4541.
- Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. 2010. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 17:F19–F36.
- Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, De Simone V, Califano D, Pallante P, Botti G, Pezzullo L, Pierantoni GM, Santoro M, Fusco A. 2008. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 44:1015–1021.
- Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. 2008. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68:8535–8540.
- Cleynen I, Van De Ven WJ. 2008. The HMGA proteins: A myriad of functions. *Int J Oncol* 32:289–305.
- Coindre JM, Hostein I, Maire G, Derre J, Guillou L, Leroux A, Ghnassia JP, Collin F, Pedetour F, Aurias A. 2004. Inflammatory malignant fibrous histiocytomas and dedifferentiated liposarcomas: Histological review, genomic profile, and MDM2 and CDK4 status favour a single entity. *J Pathol* 203:822–830.
- Craver RD, Fonseca P, Carr R. 2010. Pediatric epithelial salivary gland tumors: Spectrum of histologies and cytogenetics at a children's hospital. *Pediatr Dev Pathol* 13:348–353.
- Dal Cin P, Thomas A, Wermowicz S. 2004. An intragenic rearrangement of HMGA2 is not necessary for lipoma formation. *Cancer Genet Cytogenet* 149:178–179.
- Dahlen A, Debiec-Rychter M, Pedetour F, Domanski HA, Hoglund M, Bauer HC, Rydholm A, Sciort R, Mandahl N, Mertens F. 2003. Clustering of deletions on chromosome 13 in benign and low-malignant lipomatous tumors. *Int J Cancer* 103:616–623.
- Dei Tos AP, Doglioni C, Piccinini S, Sciort R, Furlanetto A, Boiocchi M, Dal Cin P, Maestro R, Fletcher CD, Tallini G. 2000. Coordinated expression and amplification of the MDM2, CDK4, and HMGI-C genes in atypical lipomatous tumors. *J Pathol* 190:531–536.
- Dreux N, Marty M, Chibon F, Velasco V, Hostein I, Ranchere-Vince D, Terrier P, Coindre JM. 2010. Value and limitation of immunohistochemical expression of HMGA2 in mesenchymal tumors: About a series of 1052 cases. *Mod Pathol* 23:1657–1666.
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. 2007. P-bodies: At the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:9–22.
- Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, Rippe V, Bullerdick J, Santoro M, Fusco A. 1998. Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 17:413–418.
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. 2002. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon: IARC Press.
- Gabrielsson BG, Olofsson LE, Sjogren A, Jernas M, Elander A, Lonn M, Rudemo M, Carlsson LM. 2005. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13:649–652.
- Italiano A, Bianchini L, Keslar F, Bonnafous S, Cardot-Leccia N, Coindre JM, Dumollard JM, Hofman P, Leroux A, Mainguene C, Peyrottes I, Ranchere-Vince D, Terrier P, Tran A, Gual P, Pedetour F. 2008a. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer* 122:2233–2241.
- Italiano A, Chambonniere ML, Attias R, Chibon F, Coindre JM, Pedetour F. 2008b. Monosomy 7 and absence of 12q amplification in two cases of spindle cell liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 184:99–104.
- Italiano A, Bianchini L, Gjernes E, Keslar F, Ranchere-Vince D, Dumollard JM, Haudebourg J, Leroux A, Mainguene C, Terrier P, Chibon F, Coindre JM, Pedetour F. 2009. Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Clin Cancer Res* 15:5696–5703.
- Lee YS, Dutta A. 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21:1025–1030.
- Lette G, Jackson AU, Gieger C, Schumacher FR, Berndt SI, Sanna S, Eyheramendy S, Voight BF, Butler JL, Guiducci C, Illig T, Hackett R, Heid IM, Jacobs KB, Lyssenko V, Uda M, Boehnke M, Chanock SJ, Groop LC, Hu FB, Isomaa B, Kraft P, Peltonen L, Salomaa V, Schlessinger D, Hunter DJ, Hayes RB, Abecasis GR, Wichmann HE, Mohlke KL, Hirschhorn JN. 2008. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet* 40:584–591.
- Mahajan A, Liu Z, Gellert L, Zou X, Yang G, Lee P, Yang X, Wei JJ. 2010. HMGA2: A biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol* 23:673–681.
- Mandahl N, Hoglund M, Mertens F, Rydholm A, Willen H, Brosjo O, Mitelman F. 1994. Cytogenetic aberrations in 188 benign and borderline adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 9:207–215.
- Mayr C, Bartel DP. 2009. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138:673–684.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and HMGA2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315:1576–1579.
- Merscher S, Marondel I, Pedetour F, Gaudray P, Kucherlapati R, Turc-Carel C. 1997. Identification of new translocation breakpoints at 12q13 in lipomas. *Genomics* 46:70–77.
- Meza-Zepeda LA, Berner JM, Henriksen J, South AP, Pedetour F, Dahlberg AB, Godager L, Nizetic D, Forus A, Myklebost O. 2001. Ectopic sequences from truncated HMGI-C in liposarcomas are derived from various amplified chromosomal regions. *Genes Chromosomes Cancer* 31:264–273.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR. 2004. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5:R68.

- Mu G, Liu H, Zhou F, Xu X, Jiang H, Wang Y, Qu Y. 2010. Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with *let-7* down-regulation in retinoblastomas. *Hum Pathol* 41:493–502.
- Odero MD, Grand FH, Iqbal S, Ross F, Roman JP, Vizmanos JL, Andrieux J, Lai JL, Calasanz MJ, Cross NC. 2005. Disruption and aberrant expression of HMGA2 as a consequence of diverse chromosomal translocations in myeloid malignancies. *Leukemia* 19:245–252.
- Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, Wei JJ. 2008. Antiproliferative effects by *let-7* repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol Cancer Res* 6:663–673.
- Persson F, Andren Y, Winnes M, Wedell B, Nordkvist A, Gudnadottir G, Dahlenfors R, Sjogren H, Mark J, Stenman G. 2009. High-resolution genomic profiling of adenomas and carcinomas of the salivary glands reveals amplification, rearrangement, and fusion of HMGA2. *Genes Chromosomes Cancer* 48:69–82.
- Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van De Ven WJ. 1996. LPP, the preferred fusion partner gene of HMGI-C in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 36:118–129.
- Pierantoni GM, Finelli P, Valtorta E, Giardino D, Rodeschini O, Esposito F, Losa M, Fusco A, Larizza L. 2005. High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), even in the absence of chromosome 12 polysomy. *Endocr Relat Cancer* 12:867–874.
- Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. 2003. Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 63:1351–1358.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdick J, Van Den Berghe H, Van De Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436–444.
- Shi G, Perle MA, Mittal K, Chen H, Zou X, Narita M, Hernando E, Lee P, Wei JJ. 2009. *Let-7* repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma. *J Cell Mol Med* 13:3898–3905.
- Sirvent N, Forus A, Lescaut W, Burel F, Benzaken S, Chazal M, Bourgeon A, Vermeesch JR, Myklebost O, Turc-Carel C, Ayrault N, Coindre JM, Pedetour F. 2000. Characterization of centromere alterations in liposarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 29:117–129.
- Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. 2009. MicroRNA *let-7* regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 23:925–931.
- Tallini G, Dal Cin P, Rhoden KJ, Chiapetta G, Manfioletti G, Giancotti V, Fusco A, Van Den Berghe H, Sciot R. 1997. Expression of HMGI-C and HMGI(Y) in ordinary lipoma and atypical lipomatous tumors: Immunohistochemical reactivity correlates with karyotypic alterations. *Am J Pathol* 151:37–43.
- Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, Bullerdick J, Giancotti V, Van Den Berghe H, Dal Cin P. 2000. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 80:359–369.
- Wang X, Hulshizer RL, Erickson-Johnson MR, Flynn HC, Jenkins RB, Lloyd RV, Oliveira AM. 2009. Identification of novel HMGA2 fusion sequences in lipoma: Evidence that deletion of *let-7* miRNA consensus binding site 1 in the HMGA2 3' UTR is not critical for HMGA2 transcriptional upregulation. *Genes Chromosomes Cancer* 48:673–678.
- Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. 1995. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376:771–774.

Article 4 :

Nous nous sommes également intéressés à un cas de lipomatose profonde. Très peu de données sont disponibles quant à la biologie des lipomatoses qui sont des pathologies hypertrophiques du tissu adipeux. A notre connaissance, aucune donnée de cytogénétique ou génomique de ces pathologies n'avait jusqu'alors été rapportée. Dans l'article 4, nous décrivons un cas de lipomatose gastrique révélée par une hématomèse et traitée par gastrectomie partielle survenue chez un jeune homme de 20 ans. Deux ans après ce premier épisode, la survenue d'un pneumothorax spontané a permis de diagnostiquer une malformation adénoïde kystique ainsi qu'une fistule artério-veineuse associées à une lipomatose médiastinale constituée d'une prolifération mal limitée s'étendant au-delà du diaphragme et de deux masses adipeuses encapsulées intra-thoraciques de 8 cm de grand axe. Une lobectomie inférieure gauche a été réalisée. L'analyse histologique a confirmé la présence d'adipocytes matures et l'absence d'atypies cyto-nucléaires. Le caryotype réalisé sur les cellules de l'une des deux masses ne montrait pas d'anomalie (46,XY). En utilisant la méthode de FISH, nous avons montré une absence d'amplification de *MDM2*, *CDK4* ou *HMGA2* et une absence de remaniement structural de *HMGA2*. Tous les exons de l'ARNm de *HMGA2* étaient surexprimés (RT-PCR quantitative) de même que la protéine de HMGA2 (IHC), alors que la protéine HMGA2 n'était pas surexprimée dans les composantes gastriques ou la malformation adénoïde kystique. Ces premiers résultats suggéraient un possible rôle de HMGA2 dans la genèse des lipomatoses et ceci indépendamment de la présence d'un remaniement du gène. Nous avons mesuré le niveau d'expression de plusieurs membres de la famille des microARN *let-7* (*let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, *let-7i*) par RT-PCR quantitative, en comparaison au tissu adipeux sous-cutané normal, dans ces échantillons de lipomatoses et avons mis en évidence une diminution significative de l'expression de tous ces microARN. Nous montrons ainsi pour la première fois une possible régulation de la surexpression de HMGA2 par les microARN *let-7* dans un cas de lipomatose. Nos résultats font écho aux phénotypes associés à la surexpression de *hmg2* décrits chez l'animal (Battista, Fidanza et al. 1999). Ce résultat, original, fournit un argument supplémentaire quant à un rôle précoce de la dérégulation de *HMGA2* dans la survenue des pathologies tumorales ou pseudo-tumorales adipocytaires.

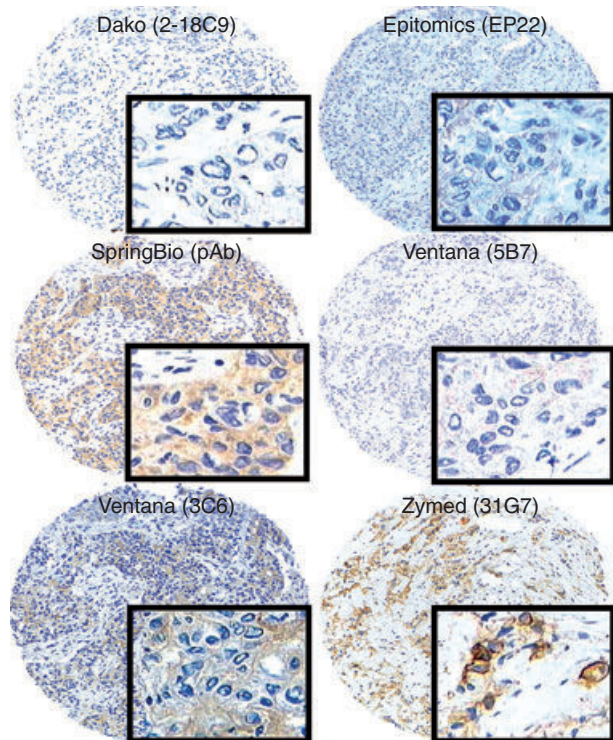


Figure 1. Representative staining of commercial epidermal growth factor receptor antibodies used at selected facilities included in the study. The antibody clone number is indicated in brackets. pAb, polyclonal antibody.

antibodies are currently in use. Similarly, use of the same commercial antibody but with slight variations in the staining protocol (e.g. inclusion of a biotin-blocking step) at a different facility can also lead to highly variable staining (data not shown). Interlaboratory variability in staining results persisted regardless of the scoring system used, supporting the notion that standardization efforts are necessary for EGFR immunostaining before it can be used in the diagnosis of basal-like breast carcinoma in clinical practice. Easy-to-interpret and robust biomarkers are needed to allow positive identification of basal-like breast cancer and facilitate the development of targeted therapies for this more aggressive breast cancer subtype through subtype-specific clinical trials.

Jennifer R Won
Dongxia Gao¹
Dennis Grant²
James Cupples³
Amir Rahemtulla⁴
Robert Wolber⁵
Torsten O Nielsen
Cyril B Gilks¹

Department of Pathology and Laboratory Medicine, Vancouver General Hospital and University of British Columbia, ¹Genetic Pathology Evaluation Centre, Vancouver, ²Department of Pathology, Surrey Memorial Hospital, Surrey, ³Department of Pathology, Royal Columbian Hospital, New Westminster, ⁴Department of Pathology, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, and ⁵Department of Pathology, Lion's Gate Hospital, North Vancouver, BC, Canada

1. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK *et al.* Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin. Cancer Res.* 2010; **16**: 6100–6110.
2. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; **10**: 5367–5374.
3. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod. Pathol.* 2010; **24**: 157–167.
4. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2008; **14**: 1368–1376.
5. Hung T, Wolber R, Garratt J, Kalloger S, Gilks CB. Improved breast cancer biomarker detection through a simple, high frequency, low cost external proficiency testing program. *Pathology* 2010; **42**: 637–642.
6. Makretsov N, Gilks CB, Alaghehbandan R *et al.* Development of an evidence-based approach to external quality assurance for breast cancer hormone receptor immunohistochemistry: comparison of reference values. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011; **135**: 874–881.
7. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 2009; **27**: 1160–1167.

First description of inhibition of *let-7* microRNA expression and *HMGA2* overexpression in a case of deep-seated diffuse lipomatosis

DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04266.x

© 2012 Blackwell Publishing Limited.

Sir: Lipomatosis are rare proliferative disorders of the adipose tissue.¹ The biology of this peculiar lesion remains unexplored. A 20-year-old man presented with acute upper gastrointestinal bleeding, revealing a lipomatosis of the gastric wall. Macroscopic analysis of the partial gastrectomy found cerebriform and hypertrophic rugae that corresponded microscopically to a thickened 2–3-mm mucosa associated with heterogeneous foveolar hyperplasia and marked glandular atrophy. Mature adipocytes were found in the submucosa and mucosa (Figure 1A). The gastropathy was associated with a

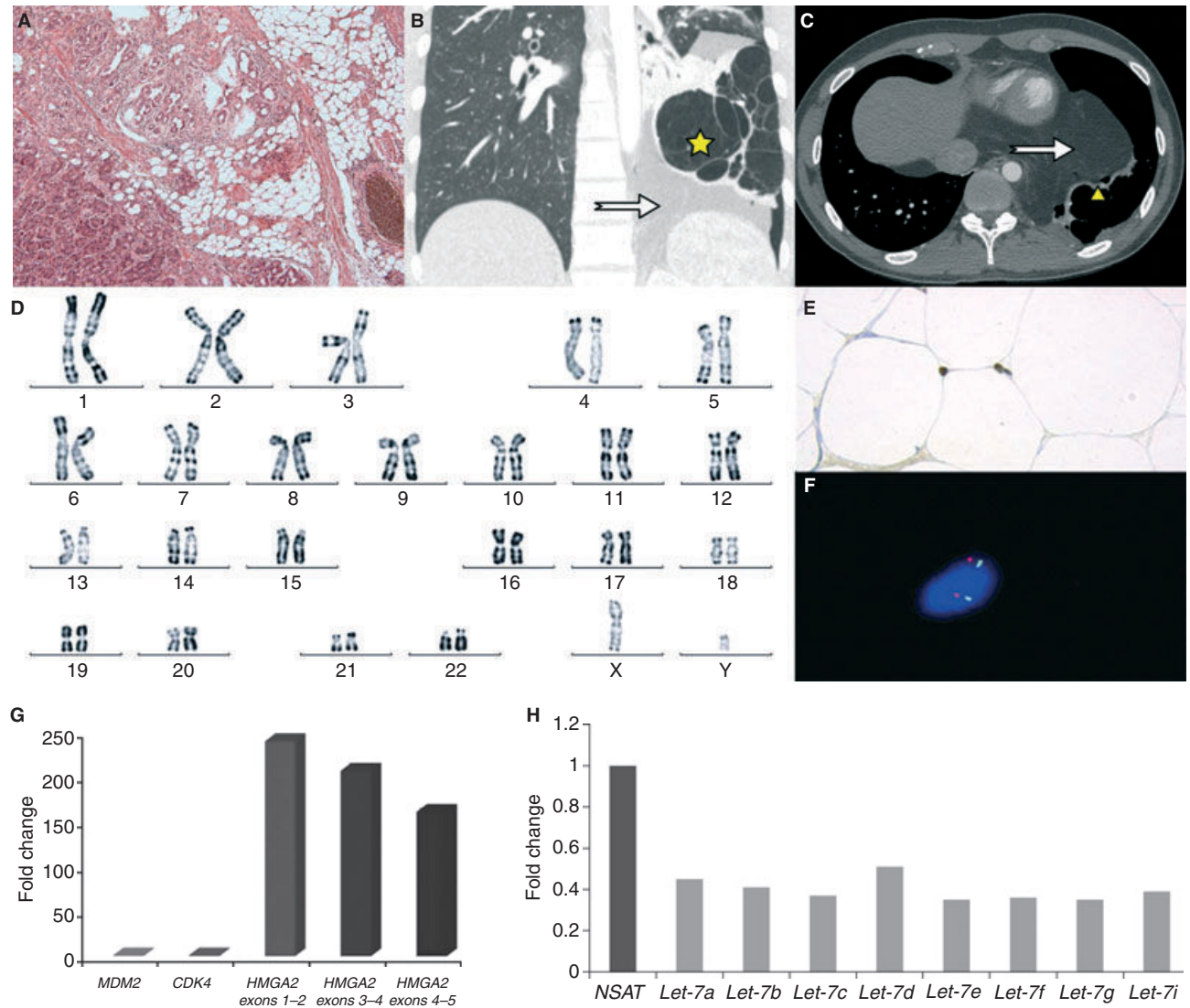


Figure 1. A, Histological analysis of the gastrectomy: thickened gastric mucosa associated with heterogeneous foveolar hyperplasia and marked glandular atrophy. Mature adipocytes were found in the submucosa and mucosa. B,C, Coronal (B) and transverse (C) injected computed tomography scan showing multiple large cysts in the left pulmonary parenchyma corresponding to a cystic adenoid malformation (yellow star) and associated with an arteriovenous fistula (yellow arrowhead), all surrounded by lipomatosis (arrow). D, Karyotype without evidence of chromosomal anomaly. E, *HMGA2* fluorescence *in-situ* hybridization analysis showing two juxtaposed green and red signals corresponding to the RP11-30I11 (5' *HMGA2* region; green signal) and RP11-118B13 (3' *HMGA2* region; red signal) probes, meaning an absence of rearrangement of *HMGA2*. F, Immunohistochemical nuclear staining of *HMGA2*. G, Expression pattern (log₁₀ scale) of *MDM2*, *CDK4*, exons 1–2, exons 3–4 and exons 4–5 of *HMGA2* as determined by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR), showing no expression of *MDM2* and *CDK4* but strong expression of exons 1–2, exons 3–4 and exons 4–5 of *HMGA2*. *MDM2*, *CDK4* and *HMGA2* mRNAs were expressed as fold changes relative to normal subcutaneous adipose tissue from control individuals. H, Expression pattern of *let-7* microRNAs as determined by qRT-PCR, showing significant inhibition of the expression of *let-7a*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f*, *let-7g*, and *let-7i*, expressed as fold changes relative to normal subcutaneous adipose tissue from control individuals.

pedunculated lipoma-like adipocytic mass that was composed of mature adipocytes without atypia or lipoblasts, diagnosed as a deep-seated diffuse lipomatosis.

Two years later, the patient was admitted for spontaneous left pneumothorax. An injected computer tomography scan revealed a cystic adenoid malforma-

tion (Figure 1B, yellow star) associated with an arteriovenous fistula (Figure 1C, arrowhead), all surrounded by lipomatosis (arrow) extending above and below the diaphragm. Because of threatening functional consequences, a left lower lobectomy was performed. Macroscopic examination showed a multi-

cystic lesion of 220 × 150 mm and two pedunculated adipocytic masses, each 80 mm in diameter. Microscopic examination revealed several cysts. Neither cartilage nor immature mesenchymal tissues were found. Large arteriolar and venular vessels with fat cells in the lining of the veins were observed. Both pedunculated adipocytic masses were composed of mature adipocytes and surrounded by a thin conjunctival capsule.

We performed a comprehensive immunohistochemical and molecular analysis of the thoracic and paragastric pedunculated adipocytic masses. The karyotype was apparently normal (46, XY) (Figure 1D). Fluorescence *in-situ* hybridization analysis with probes for several genes known to be involved in the pathogenesis of adipose tumours was performed. Neither the murine double minute 2 gene (*MDM2*) nor the cyclin-dependent kinase 4 gene (*CDK4*) gene was amplified. The high mobility group A2 gene (*HMGA2*) was neither amplified nor structurally rearranged (Figure 1E). Using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR), we detected strong overexpression of all exons of *HMGA2* mRNA (Figure 1G). Strong immunohistochemical labelling of *HMGA2* protein in both thoracic and paragastric adipocytic lesions was found (Figure 1F), whereas no expression was detected in the gastropathy and the adenoid cystic malformation components. qRT-PCR analysis of eight members of the microRNA (miRNA) *let-7* family was performed, and showed significant inhibition of the expression of all *let-7* miRNAs (Figure 1H) as compared with normal subcutaneous adipocytic tissue. qRT-PCR analysis of *MDM2*, *CDK4* and several other genes involved in liposarcoma biology did not show any overexpression.

We present here, to the best of our knowledge, the first comprehensive biological analysis of a case of diffuse lipomatosis. *HMGA2* overexpression is most often the consequence of somatic alterations of the gene, such as amplification in well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas² or structural rearrangement in lipomas.³ Dysregulation of *HMGA2* has been experimentally linked to developmental anomalies of adipose tissue, as transgenic mice expressing a truncated form of *hmg2* develop gigantism and abdominal lipomatosis.⁴ Conversely, inactivation of *hmg2* induces a pygmy phenotype in mice, consisting of small size and low weight linked to a marked reduction in fat tissue.⁵ We did not detect any structural *HMGA2* rearrangement, an alteration that is often present in lipomas, whereas we observed strong overexpression of *HMGA2* associated with inhibition of the expression of eight members of the *let-7* miRNA family.

In some models of malignant tumours, *HMGA2* expression is negatively regulated by binding of *let-7* miRNA to sites located in its 3'-untranslated region.⁶ In a previous study,⁷ we showed that a significant proportion of lipomas without *HMGA2* structural rearrangement displayed strong expression of *HMGA2* mRNA and protein. However, in such lipomas, *let-7* inhibition was not significantly correlated with *HMGA2* overexpression, suggesting that *let-7* inhibition could not be considered as a systematic surrogate of *HMGA2* genomic rearrangements. In the present case of lipomatosis, we found that inhibition of all *let-7* family members correlated with *HMGA2* overexpression in the absence of *HMGA2* genomic alteration. Moreover, the absence of *HMGA2* expression in the gastropathy and in the adenoid cystic malformation indicates specific overexpression of *HMGA2* in the lipomatous component. We provide here evidence for *HMGA2* overexpression as a common biological feature between lipomatosis and adipose tissue tumours. Our results might contribute to the identification of the biological mechanisms involved in the genesis of lipomatosis, and provide future potential therapeutic targets.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Annie-Claude Peyron, Thibault Fabas, Audrey Bazin and Roger Grattery for skilful technical assistance. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 4080 to F. Pedeutour), Institut National du Cancer (project 'GENOSTT' and master fellowship to E. Saâda), and the Conseil Général des Alpes-Maritimes, France.

Esma Saâda^{1,2}
Laurence Bianchini^{1,2}

Jérôme Mouroux³

Florence Dupré⁴

Catherine Butori⁵

Isabelle Birtwisle-Peyrottes⁶

Bernard Padovani⁷

Matthieu Yver⁴

Charles Ferrari⁸

Florence Pedeutour^{1,2}

¹Laboratory of Solid Tumours Genetics, Nice University Hospital, ²University of Nice Sophia-Antipolis, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), Nice, France, ³Department of Thoracic Surgery, Nice University Hospital, Nice, France, ⁴Department of Pathology, Princess Grace Hospital, Monaco, Monaco, ⁵Laboratory of Clinical and Experimental Pathology and Human Biobank, Nice University Hospital, ⁶Laboratory of Cytology and

Pathology, Centre Antoine-Lacassagne, ⁷Department of Radiology, Nice University Hospital, Nice, France, and ⁸Department of Surgery, Princess Grace Hospital, Monaco, Monaco

1. Nielsen GP. Lipomatosis. In Fletcher CDM, Unni K, Mertens F eds. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press, 2000; 23–24.
2. Italiano A, Bianchini L, Keslair F *et al*. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int. J. Cancer* 2008; **122**: 2233–2241.
3. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A *et al*. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995; **82**: 57–65.
4. Battista S, Fidanza V, Fedele M *et al*. The expression of a truncated hmgi-c gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res.* 1999; **59**: 4793–4797.
5. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor hmgi-c. *Nature* 1995; **376**: 771–774.
6. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007; **21**: 1025–1030.
7. Bianchini L, Saada E, Gjernes E *et al*. Let-7 microRNA and HMGA2 levels of expression are not inversely linked in adipocytic tumors: analysis of 56 lipomas and liposarcomas with molecular cytogenetic data. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; **50**: 442–455.

Immunostaining in the context of loss mismatch repair function: interpretive confounders and cautionary tales!

DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04268.x

© 2012 Blackwell Publishing Limited.

Sir: It is well accepted that approximately 10–15% of colorectal cancers (CRCs) will have microsatellite instability (MSI). This arises as a consequence of defective mismatch repair (MMR) function, which, in turn, arises from functional loss of any one of the four main MMR proteins (MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6). The use of immunohistochemistry (IHC) to detect loss of MMR protein expression (which implies loss of MMR function) is now standard practice in many laboratories.¹ Interpretation of IHC is usually straightforward (especially when a panel of four antibodies is used), although, as we and others have reported, there are technical sources of variation (such as tissue fixation and poor antibody affinity) that can make interpretation difficult.² Other sources of variation may also serve to confound interpretation, and we report herein a series of four interesting cases in which the pattern of immunostaining is unusual. We believe that these are

not technical artefacts, but rather that the observed variation may be implicit in the biology of the disease. An awareness of these patterns will prevent misinterpretation of immunostaining and misdiagnosis.

Case 1 (Figure 1A): this case was an adenocarcinoma arising in a patient who was suspected of having Lynch syndrome. The haematoxylin and eosin (H&E) sections from the surgical resection showed a moderately differentiated adenocarcinoma with no other unusual features. Immunostaining for MMR protein expression was performed on a single tumour block, and this showed widespread nuclear expression of MSH2 and MSH6. However, the pattern of expression of both MLH1 and PMS2 was unusual, inasmuch as some foci of invasive tumour were unequivocally positive, whereas large areas showed complete absence of expression in the epithelium but positive expression in the adjacent tumour stroma and the tumour-infiltrating lymphocytes (TILs). The positive stromal and TIL staining showed that this pattern was unlikely to be a technical artefact, and testing with polymerase chain reaction (PCR) (with a panel of five mononucleotide markers³) showed instability in four of five markers (Figure 1A, lower panel).

This case appears to represent subclonal evolution in an invasive cancer. It is not known when loss of MMR occurs during tumour development, but it is generally thought to occur at the middle to late adenoma stage.⁴ Generally, by the time that tumours with MSI present, the adenomatous precursor has been obliterated. Most pathologists would regard any positive staining as being indicative of positive expression, with absence of staining being attributed to fixation artefact. In this case, close scrutiny of the stroma and TILs in the non-staining tumour epithelium allowed us to conclude that this was 'true' negative staining, and that the tumour should be classed as MMR-deficient.

Case 2 (Figure 1B): in this case, the clinical context and H&E appearances were as in case 1. Immunostaining for MMR protein expression showed widespread nuclear expression of MSH2 and MSH6. However, MLH1 was seen patchily throughout the section, and showed moderate cytoplasmic staining with weak but unequivocal nuclear staining. There was extensive weak but unequivocal expression of PMS2 in the tumour nuclei. In both of the sections stained for MLH1 and PMS2, the tumour stroma, the TILs and adjacent non-malignant epithelium all showed nuclear expression that was much more intense than that seen in the tumour nuclei. This is the reverse of what would normally be expected (tumour nuclei usually stain more intensely than stroma), and confirmed that the observed expression was unlikely to be a technical

2-4. Place de l'amplification de *HMGA2* dans la biologie des liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés

Article 5 :

E. Saâda, F. Burel-Vandenbos, D. Ranchère-Vince, I. Birtwisle-Peyrottes, B. Chetaille, C. Bouvier, M-C. Château, M. Peoc'h, M. Battistella, J-M. Coindre, A. Bazin, J. Gal¹³, J-F. Michiels, F. Pedeutour, L. Bianchini. Prognostic value of *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. Soumis à *Modern Pathology*.

Si le caractère pathognomonique de l'amplification de *MDM2* dans les TLA-LBD et LDD est maintenant bien démontré, l'incidence de l'amplification d'autres oncogènes impliqués dans la biologie de ces tumeurs est moins bien connue.

Notre équipe avait étudié la plus grande série de TLA-LBD et LDD dans laquelle l'incidence de l'amplification de *CDK4* a été établie (Italiano, Bianchini et al. 2009). Elle a ainsi démontré le caractère fréquent mais non obligatoire de l'amplification de *CDK4* et observé que cette amplification était significativement plus fréquente dans le sous-type LDD. Elle a également démontré le rôle pronostique péjoratif de l'amplification de *CDK4* dans cette population.

Article 5 :

Mon objectif a été d'étudier le rôle et la signification pronostique de l'amplification du gène *HMGA2* dans cette grande série de tumeurs, en évaluant plus précisément le statut distinctif des différentes parties 3' et 5' du gène.

Des données d'autres équipes suggéraient que la protéine HMGA2 pouvait ne pas être surexprimée dans les LDD (Dreux, Marty et al. 2010). Il était de plus important de clarifier le statut d'amplification et le rôle du gène *JUN*. Des données contradictoires, probablement parce qu'elles étaient extrapolées à partir d'un petit nombre de cas, soulevaient la question de la corrélation entre amplification de *JUN* et dédifférenciation (Chibon, Mariani et al. 2004, Mariani, Brennetot et al. 2007, Snyder, Sandstrom et al. 2009). Une autre question à résoudre était le caractère mutuellement exclusif de l'amplification de *JUN* et de l'amplification du gène *MAP3K5* dont le rôle dans la dédifférenciation des LPS avait aussi été évoqué (Horvai, DeVries et al. 2009).

Nous avons ainsi caractérisé les amplifications respectives des gènes *CDK4*, *HMGA2* et *JUN* sur une série de 116 TLA/LBD et LDD, tous porteurs d'amplification du gène *MDM2*. Notre but était de déterminer l'incidence de l'amplification de ces oncogènes *HMGA2*, *JUN* et *CDK4* dans les des TLA-LBD et LDD. Notamment, en utilisant un panel de sondes couvrant différentes portions extra- et intra-géniques de *HMGA2*, nous avons plus particulièrement étudié l'amplification différentielle des régions 5'UTR, des exons 1-2, exons 1-3, exons 4-5 et région 3'UTR du gène. Nous avons également recueilli les données anatomo-cliniques des patients et établi des corrélations avec ces amplifications. Nous avons recherché un éventuel rôle pronostique de ces amplifications. Notre série était constituée de 48 LDD et 68 TLA/LBD. Le suivi médian était de 40,7 mois. La survie globale était de façon cohérente avec les données de la littérature négativement impactée par le sous type histologique LDD, l'âge au diagnostic, l'utilisation d'une chimiothérapie en première intention, l'absence de chirurgie dans la première séquence thérapeutique, le grade 3, la présence de métastases.

Nous confirmons dans un premier temps sur une série indépendante les données précédemment démontrées quant à l'amplification de *CDK4*. Celle-ci était significativement associée au sous type LDD (88,2% LDD vs. 58,9% TLA/LBD, $p=0,007$), aux tumeurs non localisées au niveau des membres ainsi qu'au grade 3. Nous confirmons également que l'amplification de *CDK4* est associée à une survie globale (survie globale à 2 ans: 79,8% vs 94,7%, $p=0.07$) et une survie sans récurrence (survie sans récurrence à 2 ans: 67% vs 93%, $p=0,05$) plus courtes.

Pour *HMGA2*, nous retrouvons une amplification différentielle des trois premiers exons du gène par rapport aux exons 4-5 et l'extrémité 3'UTR. Nous montrons pour la première fois que l'amplification des trois premiers exons du gène est associée à des facteurs de bon pronostic tels que le sous-type TLA/LBD (75% des LDD vs. 95,3% des TLA/LBD, $p=0,01$), le grade 1, l'absence d'envahissement ganglionnaire et le caractère non récidivant de la tumeur. Nous montrons aussi pour la première fois que l'amplification des trois premiers exons de *HMGA2* ainsi que de son extrémité 3'UTR sont associés à une survie sans récurrence plus longues (respectivement : survie sans récurrence à 2 ans: 69% vs 40%, $p=0,08$ et survie sans récurrence à 2 ans: 84% vs 52%, $p=0,01$). Ces résultats soulignent un rôle spécifique de *HMGA2* dans la biologie des TLA/LBD et LDD. En effet, la surexpression et /ou l'amplification de *HMGA2* est classiquement associée à un pronostic plus péjoratif dans d'autres modèles tumoraux (Abe, Watanabe et al. 2003, Miyazawa, Mito et al. 2004, Meyer, Loeschke et al. 2007, Raskin, Fullen et al. 2013, Califano, Pignata et al. 2014). Les TLA/LBD et LDD semblent ainsi être des modèles tumoraux particuliers où les propriétés inductrices de différenciation adipocytaire (Battista, Fidanza et al. 1999, Sun, Fu et al. 2009 et de stabilisation du génome (Young and Narita 2007, Cleynen and Van de Ven 2008) (Schoenmakers, Wanschura et al. 1995, Fedele, Berlingieri et al. 1998) (Narita, Krizhanovsky et al. 2006) de *HMGA2* pourraient prédominer.

Nous avons confirmé que l'amplification de *JUN* était significativement associée au sous-type LDD mais qu'il existait d'authentiques TLA/LBD avec amplification de *JUN* (60,5% des LDD vs. 16,7% des TLA/LBD, $p=0,005$). Nous montrons également que l'amplification de *JUN* est associée à des facteurs de mauvais pronostic tels que le grade 3. Nous montrons pour la première fois que l'amplification de *JUN* est associée à une survie sans récurrence plus courte (survie sans récurrence à 2 ans: 38% vs 64,2%, $p=0,07$). Ces résultats sont à rapprocher des données préalablement publiées par Snyder et al. (Snyder, Sandstrom et al. 2009) qui montrent que *JUN* n'a probablement pas de rôle propre dans le processus de dédifférenciation des LBD mais plutôt un rôle favorisant la prolifération tumorale.

Lors de l'étude de cette série, nous avons analysé le prélèvement d'une récurrence de LDD chez une patiente dont les prélèvements antérieurs et les récurrences ultérieures avaient également été adressées à notre laboratoire. Nous avons saisi l'opportunité de disposer de ce suivi cytogénétique et

moléculaire depuis le LBD rétropéritonéal diagnostiqué en 1999 et de ses quatre récurrences successives sous forme de LDD sur une période de 15 ans (successivement en 2008, 2009, 2011 et 2014) pour nous aider à comprendre la succession des mécanismes de dérégulation génétique impliquée dans la différenciation des LBD. Une telle étude exhaustive portant sur les multiples récurrences aux décours des opérations chirurgicales et du suivi d'un même patient n'avait, à notre connaissance, jamais été rapportée.

En utilisant la technique de CGH, nous avons observé que le fil conducteur dans la tumeur primitive LBD et les récurrences LDD était, comme attendu, la présence d'un amplicon 12q13-15 comportant l'amplification du gène *MDM2*. Toutefois les différents prélèvements comportaient outre des points communs, des différences notables. Alors que *MDM2* était le seul gène constamment amplifié dès le diagnostic et dans toutes les récurrences, *CDK4* était amplifié dans toutes les tumeurs sauf dans la récurrence de 2011 où seul un gain modéré était détecté (cependant un artefact technique ne peut être complètement exclu quant à cette variation quantitative dans un seul des prélèvements ; il est possible que *CDK4* ait été constamment amplifié). *HMGA2* présentait seulement un gain dans le LBD et la récurrence de 2009 puis était amplifié dans la dernière récurrence en 2014. L'amplification de *JUN* apparaissait dès la première récurrence sous forme de LDD et persistait dans les récurrences ultérieures. L'amplification de *MAP3K5* n'était présente que dans la dernière récurrence. Nous avons également constaté une plus grande complexité génomique au fur et à mesure des récurrences successives qui impliquaient des régions plus grandes du génome. Ceci souligne le rôle fondateur des amplicons avec amplification de *MDM2* dans ces tumeurs (Taylor, DeCarolis et al. 2011, Nord, Macchia et al. 2014). L'apparition d'une amplification de *JUN* dans la première récurrence, corrélée au basculement vers le phénotype différencié soulève l'hypothèse de la coexistence très précoce de différents clones cellulaires. Bien qu'aucun foyer de différenciation n'ait été identifié dans les multiples blocs d'inclusion du LBD primitif, il ne peut être exclu la présence de quelques cellules différenciées comportant déjà l'amplification de *JUN* et ayant proliféré de façon exclusive après la première exérèse. Toutefois une apparition progressive *de novo* d'un gain puis d'une amplification de *JUN* conférant un avantage sélectif peut aussi être envisagée. Ces deux types de mécanismes peuvent également être discutés concernant l'apparition de l'amplification de *MAP3K5* dans l'ultime récurrence de 2014. De plus, notre observation démontre que les amplifications de *JUN* et *MAP3K5* ne sont pas mutuellement exclusives, peuvent co-exister et possiblement agir en synergie.

Quant au profil de l'amplification de *HMGA2* dans ces tumeurs, il peut être remarqué plusieurs éléments. Son absence d'amplification dans la tumeur primitive et les premières récurrences a pu être favorable à l'apparition, dès la première récurrence, d'un phénotype totalement différencié. En revanche il peut être surprenant de la voir apparaître dans la dernière récurrence, également totalement différenciée. Il peut s'agir uniquement d'un phénomène « mécanique » reflétant

l'extension de taille de l'amplicon 12q. *A contrario*, il pourrait éventuellement s'agir aussi d'un déterminisme fonctionnel cherchant à contrebalancer l'effet synergique de la co-amplification de *JUN* et *MAP3K5* pour une meilleure croissance des cellules tumorales.

Prognostic value of *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas.

Esma Saâda^{1,2,3}, Fanny Burel-Vandenbos⁴, Dominique Ranchère-Vince⁵, Isabelle Birtwisle-Peyrottes⁶, Bruno Chetaille⁷, Corinne Bouvier⁸, Marie-Christine Château⁹, Michel Peoc'h¹⁰, Maxime Battistella¹¹, Audrey Bazin¹, Jocelyn Gal¹³, Jean-François Michiels⁴, Jean-Michel Coindre¹², Florence Pedeutour^{1,2,14}, Laurence Bianchini^{1,2, 14}

1-Laboratory of Solid Tumors Genetics, Nice University Hospital, Nice, France

2-Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS UMR 7284/INSERM U1081, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France

3-Medical Oncology Department, Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

4-Central Laboratory of Pathology, Nice University Hospital, Nice, France

5-Biopathology Department, Centre Léon-Bérard, Lyon, France

6-Laboratory of Cytology and Pathology, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

7-Biopathology Department, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

8-Pathology Department, Marseille University Hospital La Timone, Marseille, France

9-Laboratory of Cytology and Pathology, Centre Val d'Aurelle, Montpellier, France

10-Laboratory of Pathology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

11-Laboratory of Pathology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Louis Hospital, Paris, France

12-Laboratory of Pathology, Bergonie Institute, Bordeaux, France

13-Department of Biostatistics, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

14- These authors contributed equally to this work.

Correspondence:

Esma Saâda

Laboratory of Solid Tumors Genetics, Nice University Hospital, Nice, France; 28 avenue de Valombrose 06107 Nice cedex 2

Email: esma.saada-bouزيد@nice.unicancer.fr;

Tel: +33 (0)492 031 514

Running Title:

HMGA2: a biomarker in liposarcomas

Abstract

HMGA2, *CDK4* and *JUN* genes have been described as frequently co-amplified with *MDM2* in Atypical Lipomatous Tumours, Well-Differentiated Liposarcoma and Dedifferentiated Liposarcoma. We studied the frequency of amplification of these genes in a series of 48 Dedifferentiated Liposarcoma and 68 Atypical Lipomatous Tumours/Well-Differentiated Liposarcoma. We correlated their amplification status with clinico-pathological features and outcomes. Histologically, both *CDK4* ($p=0.007$) and *JUN* ($p=0.005$) amplifications were associated with Dedifferentiated Liposarcoma, whereas amplification of the proximal parts of *HMGA2* (5'UTR-exon 1-3) was associated with Atypical Lipomatous Tumours/Well-Differentiated Liposarcoma ($p=0.01$). *CDK4* amplification was associated with axial tumors. Amplification of 5'UTR-exons 1-3 of *HMGA2* was associated with primary status and grade 1. Shorter overall survival was correlated with: age >64 y ($p=0.03$), chemotherapy used in first intent ($p<0.001$), no surgery ($p=0.003$), grade 3 ($p<0.001$), distant metastasis ($p<0.001$), node involvement ($p=0.006$), *CDK4* amplification ($p=0.07$). In multivariate analysis, distant metastasis (HR=8.8) and grade 3 (HR=18.2) were associated with shorter overall survival. A shorter relapse-free survival was associated with Dedifferentiated liposarcoma ($p<0.001$), grade 3 ($p<0.001$), node involvement ($p<0.001$), distant metastasis ($p=0.02$), recurrent status ($p=0.009$), axial location ($p=0.001$) and to molecular features such as *CDK4* ($p=0.05$) and *JUN* amplification ($p=0.07$). Amplification of 5'UTR-exons 1-3 ($p=0.08$) and 3'UTR ($p=0.01$) of *HMGA2* were associated with longer recurrence free survival. Distant metastasis was associated with shorter recurrence free survival (HR=5.8) in multivariate analysis. Dedifferentiated Liposarcoma type was associated with axial location, grade 3 and recurrent status. In conclusion, we showed that the amplification of *HMGA2* was associated with the Atypical Lipomatous Tumours/Well-Differentiated Liposarcoma histological type and a good prognosis whereas *CDK4* and *JUN* amplification were associated with Dedifferentiated Liposarcoma histology and a bad prognosis. In addition, we also provided the first description of the molecular evolution of a Well-Differentiated Liposarcoma into four successive Dedifferentiated Liposarcoma relapses, which was consistent with our general observations.

Introduction

Atypical lipomatous tumors (ALT), well-differentiated liposarcomas (WDLPS) and dedifferentiated liposarcomas (DDLPS) are the most frequent types of liposarcomas (LPS)(1) . ALT refers to surgically amenable tumors located in the limbs or the trunk while WDLPS are intra-abdominal or retroperitoneal lesions. Those tumors are locally aggressive but do not show potential for metastasis unless they undergo dedifferentiation. “Dedifferentiation”, defined as the transition from ALT/WDLPS to a non-lipogenic and often high-grade LPS, occurs in approximately 10% of ALT/WDLPS. Cytogenetically, ALT/WDLPS and DDLPS are characterized by supernumerary ring or giant chromosomes made up of 12q14-15 amplification including the *MDM2* gene. Other variable chromosomal regions are generally co-amplified (2). DDLPS may carry additional genetic abnormalities when compared to ALT/WDLPS (3), suggesting that ALT/WDLPS and DDLPS represent an original model of sarcoma transformation (4).

MDM2 is considered as the driver gene of the 12q amplicon since it is amplified and expressed in 100% of cases (5, 6). The detection of *MDM2* amplification helps to distinguish ALT/WDLPS from benign lipomatous tumors and DDLPS from other pleomorphic malignant proliferations, though *MDM2* amplification can be observed in other malignant tumors (7). *MDM2* amplification leads to the inactivation of TP53, which is rarely mutated in those tumors (8). The pathogenesis of ALT/WDLPS and DDLPS might also be linked to several molecular events in addition to the inactivation of TP53 such as the frequent amplification of *HMGA2* (5, 6), *CDK4* (6, 9) and *FRS2* (10) as well as other genes located nearby *MDM2* in ALT/WDLPS and DDLPS. These genes are probably not only passive passengers of the amplicons and may play a crucial role in the genesis and progression of these tumors. *HMGA2* is expressed during embryogenesis but not in normal adult tissues. It regulates transcription through DNA architectural modifications and interacts with other proteins of the enhanceosome. Its overexpression in benign and malignant tumors indicates oncogenic properties (11). *CDK4* phosphorylates RB1 (Retinoblastoma protein 1) and is implicated in

the G1-S checkpoint of the cell cycle (12). *CDK4* is frequently but not systematically co-amplified with *MDM2* in ALT/WDLPS and DDLPS (9).

Among the mechanisms that have been reported to be involved in ALT/WDLPS dedifferentiation, the amplification of *JUN* (1p32) or *MAP3K5* (6q23.3) (that encodes a kinase acting upstream of JUN) has been suggested because of a correlation between *JUN* amplification and DDLPS histotype (13, 14). Remarkably, JUN can regulate the activity of transcription factors involved in adipogenesis. However, a systematic link between inhibition of adipocytic differentiation and *JUN* amplification was not confirmed (15, 16).

Our aim was to assess the frequencies of *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* amplification as well as the prognostic value of these amplifications in a large series of LPS. In particular, we explored the quantitative status of intra- and extra-exonic parts of the *HMGA2* gene. In addition, we provided the detailed evolution of the amplification of these genes over a 15-year dedifferentiation process in the primary WDLPS and recurrent DDLPS from the same patient.

Materials and methods

Patients and samples

We have identified 116 *MDM2*-amplified cases among 210 formalin-fixed and paraffin embedded samples of LPS (Supplementary Table 1). These tumors had been submitted to our laboratory between July 2006 and January 2012 for molecular cytogenetic analyses because they were suspected to be ALT/WDLPS/DDLPS. Pathological evaluation had been made by pathologists expert in sarcomas from 13 French centers. Differentiation of tumors and surgical margins were defined according to the French Sarcoma Group grading (17) and the surgical staging system of Enneking et al. (18), respectively. Anatomico-clinical data were collected from medical records and from the European sarcoma database and tumor bank “SarcomaBCB Conticabase” (<https://conticabase.sarcomabcb.org/>). Tumors located in the limbs were designed as peripheral, the others as axial. This study was approved by the boards of the participating institutions. For simplification, ALT and WDLPS were grouped under the abbreviation ALT/WDLPS.

Molecular cytogenetic analysis

Bacterial Artificial Chromosomes were prepared as FISH probes for *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* (Table 1) according to standard procedures (19). Genomic amplification was defined as the presence of at least 10 fluorescent signals (grouped in clusters) per cell in $\geq 1\%$ of cells. Microscopic analysis was performed using a DM6000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) by two independent observers in a blinded manner. FISH images were processed using the ISIS software (Metasystems, Altussheim, Germany).

Comparative Genomic Hybridization on arrays (a-CGH) was performed in 7 cases (07T082, 09T033, 09T098, 10T542, 10T543, 11T1030, 11T1024) in order to complete the FISH data and in the primary and four successive recurrences of case 74. Male and female human genomic DNA (Promega Corp, Madison, WI) was used as the control DNA. Following hybridization, washing and drying steps, the microarray slides were scanned at 3 μ m resolution, using the Agilent SureScan (Agilent Technologies). Features were extracted from the scanned images and analyzed using Cytogenomics software (version 2.5.8.11; Agilent Technologies) using the aberration detection method 2 (ADM-2) algorithm. Thresholds were set at a minimum of 3 probes and 0.25 average log ratios. Raw data have been submitted to Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the reference GSE64597.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical (IHC) analysis was done in 44 cases for CDK4 (clone DCS 31, Biosource International, Camarillo, CA), 57 cases for MDM2 (clone IF2, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) and 30 cases for HMGA2 (clone HMGA2-P1, Biocheck, Foster City, CA) according to standard procedures (19, 20). The staining was considered as positive when at least one cell nucleus per high power field was strongly stained.

Statistical analysis

Date of histological diagnosis was used for date of diagnosis. Statistical comparisons were performed by using Chi2 or Fisher's exact tests for categorical data. Kaplan–Meier method was used

to estimate the time to survival rates which were compared by the log rank test. p values ≤ 0.05 was significant. For analysis of factors influencing survival, the variables tested were gender, age at diagnosis, history of cancer, histological subtype, the French Sarcoma Group grading, complete remission after first treatment, node involvement, metastatic status, *CDK4* amplification, *HMGA2* amplification, *JUN* amplification. If variables were significantly associated with survival in the univariate analysis, a multivariate analysis using Cox proportional hazards regression was performed. The R-3.1.1 statistical software for Windows was used.

Results

Clinical and histological features (Table 2)

The 116 *MDM2*-amplified samples included 48 DDLPS and 68 ALT/WDLPS. Median age was 64 years [38-88] for ALT/WDLPS and 69 years [42-90] for DDLPS. There were 72 men and 44 women. Median tumor sizes and ranges were 160mm [35-400] for ALT/WDLPS and 150 mm [27-410] for DDLPS. When compared to ALT/WDLPS, DDLPS were associated with: -i) axial location ($p < 0.001$), -ii) grade 3 ($p < 0.001$), -iii) prescription of chemotherapy ($p = 0.02$), -iv) recurrent status ($p = 0.07$), -v) lack of complete remission after the first treatment ($p = 0.02$).

Expression and amplification of *MDM2*, *CDK4*, *JUN* and *HMGA2* in ALT/WDLPS and DDLPS

A positive *MDM2* staining using IHC was observed in 49 of the 57 analyzed cases (86%): the 8 negative cases were ALT/WDLPS; all the DDLPS showed a positive expression for *MDM2* ($p = 0.02$). *CDK4* amplification was significantly correlated with DDLPS histotype (88.2% DDLPS vs. 58.9% ALT/WDLPS, $p = 0.007$, figure 2C). A positive *CDK4* staining using IHC was observed in 15 (60%) ALT/WDLPS and 16 (84%) DDLPS. The amplification of the 5'UTR and exon 1-3 of *HMGA2* was correlated with ALT/WDLPS histotype: 95.3% of ALT/WDLPS vs. 75% of DDLPS ($p = 0.01$) (figure 2B; Table 3) and *HMGA2* was expressed in 12 (93%) ALT/WDLPS and 15 (88%) DDLPS. *JUN* amplification was also significantly correlated with DDLPS (60.5% DDLPS vs. 16.7% ALT/WDLPS, $p = 0.005$) (figure 2C).

Molecular markers and clinical correlations

CDK4 amplification was associated with an axial tumor location (66% vs. 39%, $p=0.05$). Amplification of 5'UTR and exons 1-3 of *HMGA2* was associated with a tumor size larger than 150mm (57% vs. 17%, $p=0.05$), primary status (82% vs. 33%, $p=0.02$) and grade 1 (68% vs. 0%, $p=0.004$). *JUN* amplification was associated with grade 3 (35% vs. 12%, $p=0.07$) and use of radiotherapy (44 vs. 12%, $p=0.06$).

Survival and prognosis data

Median follow-up duration was 40.7 months (CI95% [32.0-45.5]). Median overall survival (OS) was not reached at the time of analysis for the ALT/WDLPS group and was equal to 27.7 months for DDLPS. The 2-year (2y) OS rate was 98% for ALT/WDLPS and 55.3% for DDLPS ($p<0.001$) (figure 3A). Patients for whom a complete remission was initially obtained had a better prognosis than those with residual tumors (2y OS: 95.7% vs. 45%, $p<0.001$). Shorter OS was observed in patients aged >64 y (2y: 74.5% vs. 87.3%, $p=0.03$), patients treated by chemotherapy in first intent (2y OS: 42.4% vs. 93.8%, $p<0.001$) and absence of surgery (2y: 33.3% vs. 86.2%, $p=0.003$). Shorter OS was correlated with grade 3 (2y OS: 41% vs. 100% for grade 1, $p<0.001$)(figure 3B), distant metastasis (2y OS: 40% vs. 87.3%, $p<0.001$)(figure 3C), node involvement (1y OS: 75% vs. 88.7%, $p=0.006$). Shorter OS was associated with *CDK4* amplification (2y: 79.8% vs. 94.7%, $p=0.07$)(figure 3D) and *CDK4* positive IHC staining (2y: 79.7% vs. 100%, $p=0.03$) but neither with *JUN* amplification ($p=0.2$) nor 5'UTR-exons 1-3 exons *HMGA2* amplification ($p=0.3$). Multivariate analysis confirmed the prognostic role of distant metastasis (HR=8.8; CI95% [1.6-49.2]) and grade 3 (HR=18.2, CI95% [1.8-182.7]).

A shorter relapse-free survival (RFS) was associated with histology of DDLPS (2y RFS: 38.5% vs. 92%, $p<0.0001$)(figure 4A), grade 3 (2y RFS: 44% vs. 97%, $p<0.0001$)(figure 4B), node involvement (1y RFS: 0 vs. 82%, $p<0.0001$), distant metastasis (1y RFS: 0 vs. 83%, $p=0.02$), recurrent status ($p=0.009$), axial location ($p=0.001$), and absence of complete remission after first treatment (2y RFS: 25% vs. 73%, $p=0.0002$). *CDK4* amplification (2y RFS: 67% vs. 93%, $p=0.05$)(figure 4C) and *JUN* amplification (2y RFS: 38% vs. 64.2%, $p=0.07$) (figure 4D) were associated with shorter RFS. Amplification of 5'UTR-exons1-3 (2y RFS: 69% vs. 40%, $p=0.08$)(figure 4E), and 3'UTR (2y RFS: 84% vs.

52%, $p=0.01$) (figure 4F) of *HMGA2* were associated with longer RFS. Multivariate analysis confirmed a shorter RFS for metastatic patients (HR=5.8, CI95% [1.1-30]).

Detailed medical history and molecular data of case 74

The tumor sample of case 74 was a DDLPS analyzed in 2009. Because we had studied several anterior and posterior samples from this patient (from 1999 to 2014), we compared the histological and genomic features of these successive samples. The patient was 53-year-old when she was diagnosed with a retroperitoneal grade 1 WDLPS in 1999. Molecular cytogenetic analyses of the tumor after complete resection showed ring chromosomes containing amplified sequences from the chromosomes 12 and 1 (Table 5). In particular, *MDM2* and *CDK4* were amplified. Only a moderate gain of *HMGA2* was detected. *JUN* and *MAP3K5* were not amplified. A second enlarged surgery of intra-abdominal and retroperitoneal relapse was performed in 2008 and followed by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. The recurrent tumor was an undifferentiated grade III sarcoma. The presence of amplification of *MDM2* and *CDK4* and absence of *HMGA2* amplification detected by FISH was associated with a dedifferentiation of the previous WDLPS. CGH showed more complex anomalies than the initial WDLPS (Supplementary Table 2), including the occurrence of *JUN* amplification (Table 4). In July 2009, a lytic lesion of the 11th right rib and a mass of the right flank were both completely resected. Histological analyses indicated a relapse of the DDLPS. FISH and CGH analyses showed amplification of *MDM2*, *CDK4*, *JUN* and gain of *HMGA2*. A macroscopically complete resection was performed and a regular follow-up was resumed. In 2011, a mass of the right thoracic wall was resected. Margins were microscopically involved; histological and molecular analyses confirmed a third relapse of the known DDLPS with amplification of *MDM2* and *JUN*, a gain of *CDK4* and absence of amplification of *HMGA2*. An external radiotherapy was delivered in January and February 2012. In 2014, a fourth relapse of the DDLPS was resected with microscopical clear margins. The CGH and FISH analyses showed an amplification of the regions including *CDK4*, *WIF1*, *HMGA2*, *MDM2* and *JUN*, and the occurrence of *MAP3K5* amplification.

Discussion

The role of *HMGA2* in adipose tumors is intriguing and not elucidated yet. When we started this study, information about the genomic status of *HMGA2* in LPS was scarce. A high frequency of the amplification of *HMGA2* in WDLPS had indeed been reported by our group (5, 19) and by others (6, 10, 21). Altogether, the available data had been obtained by heterogeneous methods including FISH, (5, 19, 22), qRT-PCR (19), Southern-Blotting(21) or CGH(6) and the total number of patients studied was small. Here, we used FISH in a large series of 116 ALT/WDLPS and DDLPS and we demonstrated that amplification of *HMGA2* was significantly associated with ALT/WDLPS whereas the absence of amplification of *HMGA2* was correlated to DDLPS. We chose FISH analysis because we believed that it was a more appropriate and more sensitive method than array-CGH to detect amplifications either concerning only a segment of a gene (in particular, various segments of *HMGA2*) or only a fraction of the cell population. Our conclusions are in agreement with those of Dreux et al. (23) who observed a positive HMGA2 protein expression using IHC in 86% of 43 ALT/WDLPS and 67% of 69 DDLPS ($p=0.02$) and with those of Tap et al. (6) who found *HMGA2* amplified in 100% of 21 ALT/WDLPS whereas it was amplified only in 15 of 17 DDLPS (88%). *HMGA2* amplification was associated with favorable features such as absence of node involvement, primary status and grade 1 as well as longer RFS in both ALT/WDLPS and DDLPS patients. This better prognosis seems specific to adipose tumors since alterations of *HMGA2* have been associated with bad prognosis in several other tumor types, mainly carcinomas (24-26). Our observations are reminiscent of the positive role of HMGA2 in adipocytic differentiation. Indeed, *hmga2*^{-/-} mice show a *pygmy* phenotype characterized by a small size and a deficiency in fat tissue (27) whereas overexpression of a truncated *hmga2* gene induces gigantism and lipomatosis in murine models (28). Moreover, HMGA2 is involved in cell differentiation (29). For instance, HMGA2 is expressed in yolk sac testicular germ cell tumors and in embryonal carcinomas but not in intratubular germ cell tumor and seminomas (30); it is expressed in low grade gliomas but not in glioblastomas (31). Altogether,

these observations suggest that HMGA2 also interferes with cell proliferation by promoting cell differentiation.

We also confirmed that the exons 1-3 of *HMGA2* -that encode the three DNA AT-hook binding domains- were more frequently amplified than exons 4-5 (88% *versus* 76%) (5, 19). Noteworthy, it has been previously shown (32) that the expression of a truncated form of HMGA2 that retained only the three DNA-binding domains was sufficient to induce malignant transformation of fibroblasts. More recently, Taylor et al. (33) studied the genome, exome, transcriptome and methylome of primary and recurrent cases of DDLPS and showed that *HMGA2* was deleted of its 3'UTR in both tumors. Altogether, those results support the notion that *HMGA2* oncogenicity is mediated by its three first exons and the loss of its regulatory negative 3'UTR.

HMGA2 is rearranged and overexpressed in a majority of lipomas (19), amplified, rearranged and overexpressed in most ALT/WDLPS (5) and in a significant proportion of DDLPS. This suggests that *HMGA2* may be the cornerstone of a genetic continuum among the lineage of differentiated adipocytic tumors. The expression of HMGA2 may maintain a degree of adipocytic differentiation (28, 34). Conversely, lack of HMGA2 expression when *MDM2* is amplified may favor dedifferentiation (27). The role of HMGA2 in tumorigenesis might therefore be alternately pro- or anti-oncogenic (35) according to the molecular context. Indeed, HMGA2 accumulates on the chromatin of senescent fibroblasts and cooperates with p16^{INK4a} to stop proliferation and contribute to oncogenes repression. This antiproliferative action was overpassed by an overexpression of MDM2 or CDK4 (35), which is the particular cellular context of ALT/WDLPS and DDLPS. This may explain how HMGA2 might be the lever arm of the proliferation/dedifferentiation in MDM2/CDK4-amplified adipocytic tumors.

In the present series *CDK4* was not amplified in 24% of ALT/WDLPS and 14% of DDLPS. This confirms that the co-amplification of *CDK4* is not necessary in *MDM2*-amplified ALT/WDLPS and DDLPS (6, 9). *CDK4* amplification was significantly associated with axial location, DDLPS phenotype, shorter RFS and OS. Altogether, the amplification of *CDK4* appears as a pejorative event in LPS (9).

Moreover, some of the genes located within the sequence targeted by the BAC clone RP11-571M6 containing *CDK4* may also play a role. In this setting, Tap et al.(6) studied the amplification status of genes in the vicinity of *CDK4* in WDLPS/DDLPS. They found a frequent amplification of genes involved in cell growth, motility and proliferation.

JUN amplification was significantly associated with DDLPS subtype, as suggested in smaller series (6, 15, 33). This correlation would suggest a role of *JUN* in dedifferentiation (15). However, *JUN* amplification is also observed in some ALT/WDLPS without any sign of dedifferentiation. In previous reports, a majority of DDLPS did not show any amplification of *JUN* (6, 15, 36, 37). Moreover, Chibon et al (13) showed that neither *JUN* nor *MAP3K5* (*ASK1*) were overexpressed or amplified in one third of DDLPS cases. *In vitro* and *in vivo* analyses showed that overexpression and amplification of *JUN* did not influence adipocytic differentiation but had oncogenic properties in DDLPS (15). This oncogenicity might better explain the worse RFS associated with *JUN* amplification in our series. Recently, Aplidine, a drug that requires an activation of the *JUN* pathway, to induce apoptosis, was evaluated in a phase 2 trial in advanced DDLPS and failed to demonstrate any benefit (38).

To the best of our knowledge, we describe for the first time the comprehensive genomic analysis of several tumors from a same patient, including a primary WDLPS and the four successive DDLPS recurrences. This analysis gives some clues on WDLPS-DDLPS genesis. Besides the early and constant amplification of *MDM2*, several additional features are of interest: -i) *CDK4* was amplified in all tumors (except the third recurrence where a gain was noted which could be explained by a technical artifact) ; -ii) *JUN* amplification was not initially detectable but occurred concomitantly with the dedifferentiation of the tumor and persisted in all of the successive relapses; -iii) *MAP3K5* amplification was detected only in the fourth recurrence, demonstrating that *MAP3K5* and *JUN* amplification are not mutually exclusive events; -iv) *HMG2* showed only a moderate gain in the primary tumor and first recurrences. This absence of amplification may have favored the dedifferentiation process. Remarkably, *HMG2* was amplified in the fourth relapse (2014). This late amplification is perhaps to be related with a functional determinism in order to counteract the

synergistic effect of the co-amplification of *JUN* and *MAP3K5* in this last relapse; -v) we observed both variability and an increasing complexity of the additional genomic abnormalities throughout the successive recurrences. The genomic profile of the primary WDLPS was quite simple which underlines the predominance of the 12q13-15 region amplification. In this setting, Taylor et al. (33) confirmed that the 12q amplicon structure was organized around the *MDM2* amplification. Those specific amplicons follow progressive rearrangements and amplifications that lead to distinct clustering rearrangements between primary and recurrent DDLPS. On the other hand, one cannot exclude the existence of a potential minority dedifferentiated clone preexisting in the initial WDLPS. For their part, Nord et al. (16) showed that *HMGA2*, *JUN*, *CDK4* or *MAP3K5* are among other oncogenes amplified in sarcomas with *MDM2*-positive rings. In contrast with the genetic complexity of the ring chromosome, the karyotype of the *MDM2*-positive ring chromosomes was quite simple suggesting that their formation was an early genetic event and that the content of these rings were sufficient for tumor development (16).

In summary, we have shown that, among ALT/WDLPS/DDLPS, the amplification of *HMGA2* was associated with the ALT/WDLPS subtype and a good prognosis whereas *CDK4* and *JUN* amplification were associated with DDLPS histology and a poor outcome. While *HMGA2* and *MDM2* might be implicated in the early process of the ALT/WDLPS and DDLPS genesis, *CDK4* and *JUN* may have a secondary role of in the genesis of those tumors but a pejorative oncogenic effect.

Disclosure/Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Authors warmly thank Dr Agnès Leroux (Centre Alexis Vautrin, Nancy), Dr Françoise Collin (Centre Georges Francois Leclerc, Dijon), Dr Florence Dupré (Princesse Grace Hospital Center, Monaco), Dr Hélène Perrochia (University Hospital of Montpellier), Dr Philippe Rochaix (Claudius Régaud Institute, Toulouse), Dr Nicolas Weinbreck (Medipath, Frejus) and Dr Philippe Terrier (Gustave Roussy, Villejuif)

for providing some of the tumor samples, and Dr Olivier Collard for providing clinical data. We thank Frédérique Keslair and Roger Grattery for helpful assistance.

Figure legends

Figure 1 Schematic representation of the structure of the *HMGA2* gene (12q14.3) and matching FISH probes: blue solid rectangles represent the 5 exons. The upper part indicates the locations of BAC clones RP11-30I11 (upstream region of 5'UTR of *HMGA2*), RP11-299L9 (5'UTR and exons 1 and 2 of *HMGA2*), RP11-23C9 (5'UTR and the exons 1, 2 and 3 of *HMGA2*), CTC282-I9 (third intron and the exon 4 of *HMGA2*), CTD2240K5 (exons 4 and 5 and 3'UTR of *HMGA2*) and RP11-118B13 3'UTR of *HMGA2*), according to (<http://genome.ucsc.edu/>; February 2009 release).

Figure 2 Histograms representing (A) the proportion of *HMGA2*'s domains amplification according to histological subtype and (B) the proportion of amplification of *HMGA2* (5'UTR and exons1-3), *CDK4* and *JUN* according to histological subtype.* means statistical significance ($p \leq 0.05$).

Figure 3 Overall survival (OS) according to (A) Histological subtype, (B) Differentiation, (C) Distant metastasis and (D) *CDK4* amplification.

Figure 4 Recurrence Free Survival (RFS) according to (A) Histological subtype (B) Differentiation (C) *CDK4* amplification (D) *JUN* amplification (E) *HMGA2* 5'UTR-exons1-3 amplification and (F) *HMGA2* 3'UTR amplification.

References

1. Fletcher D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W., F. M. WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone, In: 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon; 2013. pp 19-44.
2. Pedeutour F, Forus A, Coindre JM, *et al.* Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:30-41.
3. Crago AM, Socci ND, DeCarolis P, *et al.* Copy number losses define subgroups of dedifferentiated liposarcoma with poor prognosis and genomic instability. *Clin Cancer Res* 2012;18:1334-40.
4. Crago AM, Singer S. Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Curr Opin Oncol* 2011;23:373-8.
5. Italiano A, Bianchini L, Keslair F, *et al.* HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer* 2008;122:2233-41.
6. Tap WD, Eilber FC, Ginther C, *et al.* Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:95-112.
7. Ragazzini P, Gamberi G, Pazzaglia L, *et al.* Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histol Histopathol* 2004;19:401-11.
8. Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, *et al.* Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol* 2012;13:1133-40.
9. Italiano A, Bianchini L, Gjernes E, *et al.* Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Clin Cancer Res* 2009;15:5696-703.
10. Wang X, Asmann YW, Erickson-Johnson MR, *et al.* High-resolution genomic mapping reveals consistent amplification of the fibroblast growth factor receptor substrate 2 gene in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:849-58.
11. Cleyne I, Van de Ven WJ. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 2008;32:289-305.
12. Brown VD, Phillips RA, Gallie BL. Cumulative effect of phosphorylation of pRB on regulation of E2F activity. *Mol Cell Biol* 1999;19:3246-56.
13. Chibon F, Mariani O, Derre J, *et al.* ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:32-7.
14. Mariani O, Brennetot C, Coindre JM, *et al.* JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in. *Cancer Cell* 2007;11:361-74.
15. Snyder EL, Sandstrom DJ, Law K, *et al.* c-Jun amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme. *J Pathol* 2009;218:292-300.
16. Nord KH, Macchia G, Tayebwa J, *et al.* Integrative genome and transcriptome analyses reveal two distinct types of ring chromosome in soft tissue sarcomas. *Hum Mol Genet* 2014;23:878-88.
17. Coindre JM. Histologic grading of adult soft tissue sarcomas. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998;82:59-63.
18. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 1980:106-20.

19. Bianchini L, Saada E, Gjernes E, *et al.* Let-7 microRNA and HMGA2 levels of expression are not inversely linked in adipocytic tumors: analysis of 56 lipomas and liposarcomas with molecular cytogenetic data. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:442-55.
20. Binh MB, Sastre-Garau X, Guillou L, *et al.* 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, In: *Am J Surg Pathol*. Vol. 29. United States; 2005. pp 1340-7.
21. Dei Tos AP, Doglioni C, Piccinin S, *et al.* Coordinated expression and amplification of the MDM2, CDK4, and HMGI-C genes in atypical lipomatous tumours. *J Pathol* 2000;190:531-6.
22. Marino-Enriquez A, Fletcher CD, Dal Cin P, Hornick JL. Dedifferentiated liposarcoma with "homologous" lipoblastic (pleomorphic liposarcoma-like) differentiation: clinicopathologic and molecular analysis of a series suggesting revised diagnostic criteria. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1122-31.
23. Dreux N, Marty M, Chibon F, *et al.* Value and limitation of immunohistochemical expression of HMGA2 in mesenchymal tumors: about a series of 1052 cases. *Mod Pathol* 2010.
24. Meyer B, Loeschke S, Schultze A, *et al.* HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 2007;46:503-11.
25. Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 2004;64:2024-9.
26. Califano D, Pignata S, Losito NS, *et al.* High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer. *J Cell Physiol* 2014;229:53-9.
27. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 1995;376:771-4.
28. Battista S, Fidanza V, Fedele M, *et al.* The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 1999;59:4793-7.
29. Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H. The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23:350-7.
30. Franco R, Esposito F, Fedele M, *et al.* Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2008;214:58-64.
31. Akai T, Ueda Y, Sasagawa Y, *et al.* High mobility group I-C protein in astrocytoma and glioblastoma. *Pathol Res Pract* 2004;200:619-24.
32. Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, *et al.* Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 1998;17:413-8.
33. Taylor BS, DeCarolis PL, Angeles CV, *et al.* Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas. *Cancer Discov* 2011;1:587-97.
34. Sun T, Fu M, Bookout AL, Klier SA, Mangelsdorf DJ. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2009;23:925-31.
35. Narita M, Krizhanovsky V, Nunez S, *et al.* A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 2006;126:503-14.
36. Horvai AE, DeVries S, Roy R, O'Donnell RJ, Waldman F. Similarity in genetic alterations between paired well-differentiated and dedifferentiated components of dedifferentiated liposarcoma. *Mod Pathol* 2009;22:1477-88.
37. Chibon F, Mariani O, Derre J, *et al.* A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;139:24-9.
38. Oncol JC, (ed). Aplidine in patients with dedifferentiated liposarcomas: A French Sarcoma Group (FSG) study. *Proceedings of the ASCO*; 2014.

Tables

Table 1 Description of the FISH probes used to characterize *MDM2*, *HMGA2*, *CDK4* and *JUN* amplification

BAC clone ¹	Locus	Chromosomal location ¹	Position ¹	Origin
RP11-797C20	<i>MDM2</i>	12q15	69,161,511-69,340,249	CHORI ²
RP11-30I11	Telomeric to 5' region of <i>HMGA2</i>	12q14.3	65,89,238-66,063,441	CHORI ²
RP11-299L9	5' region- exons 1, 2 of <i>HMGA2</i>		66,049,805-66,225,867	CHORI ²
RP11-23C9	5' region- exons 1, 2, 3 of <i>HMGA2</i>		66,093,846-66,246,663	CHORI ²
CTC-782I9	Intron 3 and exon 4 of <i>HMGA2</i>		66,235,316-66,355,707	Invitrogen ³
CTD-2240K5	Exons 4, 5 and region 3' of <i>HMGA2</i>		66,325,027-66,457,979	Invitrogen ³
RP11-118B13	Region 3' of <i>HMGA2</i>		66,358,701-66,502,988	CHORI ²
RP11-571M6	<i>CDK4</i>	12q14.1	57,999,870-58,211,408	CHORI ²
RP11-63G10	<i>JUN</i>	1p32.1	59.246.463-59.249.785	CHORI ²

¹<http://www.genome.ucsc.edu>; UCSC Genome Browser on Human, Feb. 2009.²CHORI: Children's Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org/>)³Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

Table 2 Clinical and histological features of a series of 116 ALT/WDLPS and DDLPS.

		ALT/WDLPS N=68 (%)	DDLPS N=48(%)	P Pearson exact test
Tumor size				0.6
	<150 mm	17(25)	16(33)	
	≥150 mm	32(47)	19(40)	
N				0.2
	N0	37(97)	27(87)	
	N1	1(2)	4(13)	
M				0.2
	M0	35(97)	26(87)	
	M1	1(3)	4(13)	
Multifocality				0.4
	No	32(84)	19(73)	
	Yes	6(16)	7(27)	
Primary/recurrence				0.07
	Primary	36(82)	22(61)	
	Recurrence	8(18)	14(39)	
Site of tumor				<0.001
	Peripheral	33(56)	8(19)	
	Axial	26(44)	33(80)	
Grade¹				<0.001
	1	46(96)	3(9)	
	2	1(2)	19(57)	
	3	0(0)	11(33)	
Surgery type				0.1
	Absence of surgery	2(6)	4(13)	
	Excision	19(54)	10(32)	
	Wide resection	14(40)	17(55)	
Margins				0.7
	R0	5(13)	6(21)	
	R1	23(60)	15(53)	
	R2	10(26)	7(25)	
Radiotherapy				0.2
	No	30(86)	22(69)	
	Yes	5(14)	10(31)	
Chemotherapy				0.02
	No	34(94)	22(71)	
	Yes	2(6)	9(29)	
Complete remission after treatment				0.02
	No	4(9)	11(33)	
	Yes	39(91)	22(67)	

ALT/WDLPS: Atypical Lipomatous Tumour/ Well Differentiated LPS; DDLPS: DeDifferentiated LPS; y: years; N0: absence of node involvement; N1: positive node involvement; M0: absence of distant metastasis; M1: distant metastasis; R0: microscopically complete resection; R1: macroscopically complete resection; R2: macroscopically uncomplete resection.

¹ : French Sarcoma Grading.

Table 3 Differential oncogenes expression and amplification.

		ALT/WDLPS N=68 (%)	DDLPS N=48 (%)	P Pearson exact test
IHC CDK4				0.2
	Nul	10 (40)	3 (16)	
	Positive	15 (60)	16 (84)	
IHC MDM2				0.02
	Nul	8 (22)	0 (0)	
	Positive	28 (78)	21 (100)	
IHC HMGA2				1
	Nul	1 (7)	2 (12)	
	Positive	12 (93)	15(88)	
FISH <i>CDK4</i>				0.007
	Not amplified	23 (41)	4 (12)	
	Amplified	33 (59)	30 (88)	
Region upstream to 5'UTR of <i>HMGA2</i>				0.1
	Not amplified	29 (50)	10 (30)	
	Amplified	29 (50)	23 (70)	
5'UTR and exons 1-2 of <i>HMGA2</i>				0.8
	Not amplified	6 (12)	6 (16)	
	Amplified	43 (88)	31(84)	
5'UTR and exons 1-3 of <i>HMGA2</i>				0.01
	Not amplified	2 (5)	8 (25)	
	Amplified	41 (95)	24(75)	
Intron 3 and exon 4 of <i>HMGA2</i>				0.2
	Not amplified	6 (14)	9 (28)	
	Amplified	38 (86)	23(72)	
Exons 4-5 and 3'UTR of <i>HMGA2</i>				0.15
	Not amplified	7 (35)	3 (14)	
	Amplified	13 (65)	19 (86)	
3'UTR of <i>HMGA2</i>				0.3
	Not amplified	14 (24)	12 (36)	
	Amplified	44 (76)	21 (64)	
FISH <i>JUN</i>				0.005
	Not amplified	15 (83)	15 (39)	
	Amplified	3 (17)	23 (60)	

Table 4 Amplification status assessed by CGH of *MDM2*, *HMGA2*, *CDK4*, *JUN* and *MAP3K5* in the primary tumor and the four recurrences of case 74.

	<i>MDM2</i>	<i>HMGA2</i>	<i>CDK4</i>	<i>JUN</i>	<i>MAP3K5</i>
Primary WDLPS 1999	Amplified	Gained	Amplified	Not Amplified	Not Amplified
First recurrence DDLPS 2008	Amplified	Not Gained	Amplified	Amplified	Not Amplified
Second recurrence DDLPS 2009	Amplified	Gained	Amplified	Amplified	Not amplified
Third recurrence DDLPS 2011	Amplified	Not Gained	Gained	Amplified	Not Amplified
Forth recurrence DDLPS 2014	Amplified	Amplified	Amplified	Amplified	Amplified

Figure 1

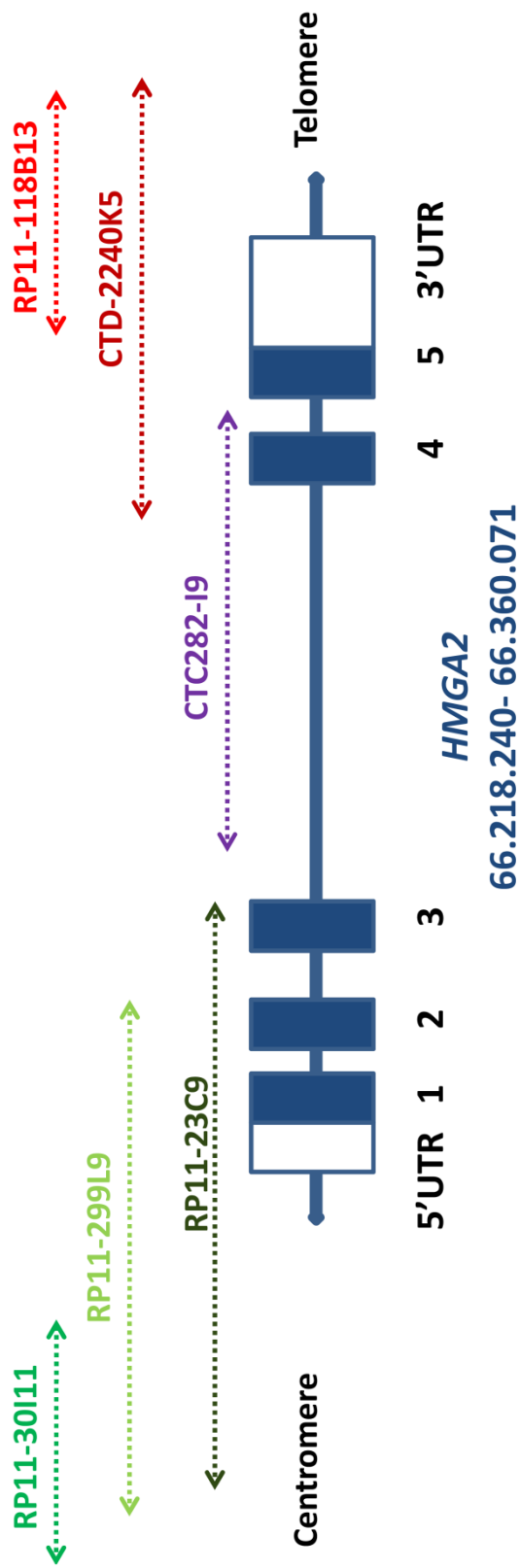


Figure 2

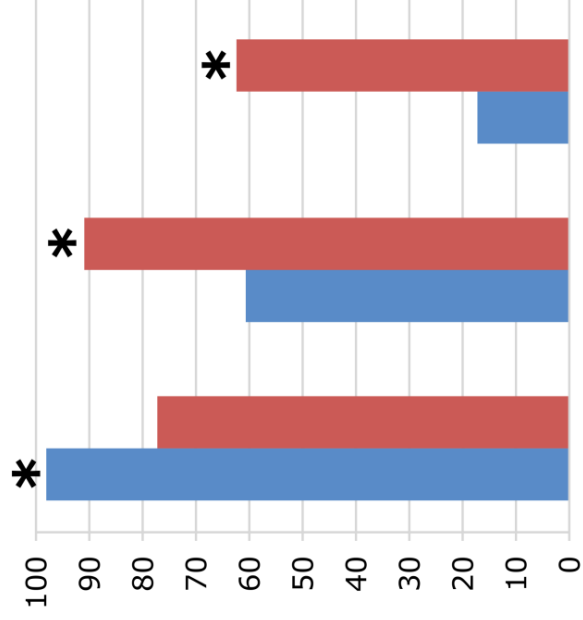
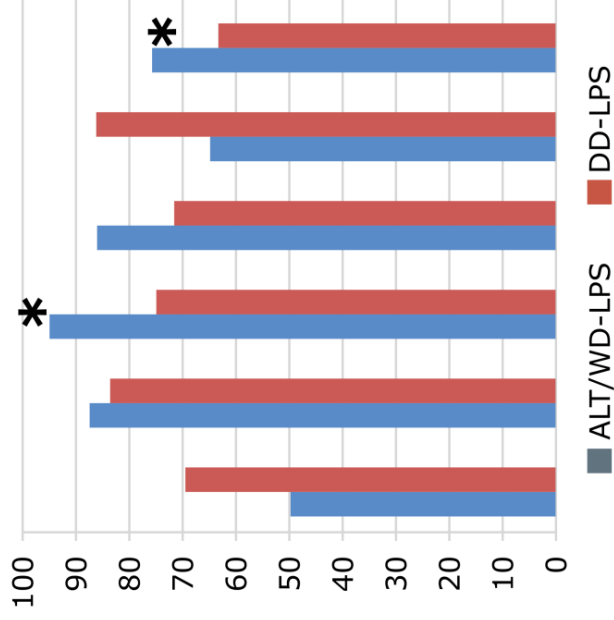


Figure 3

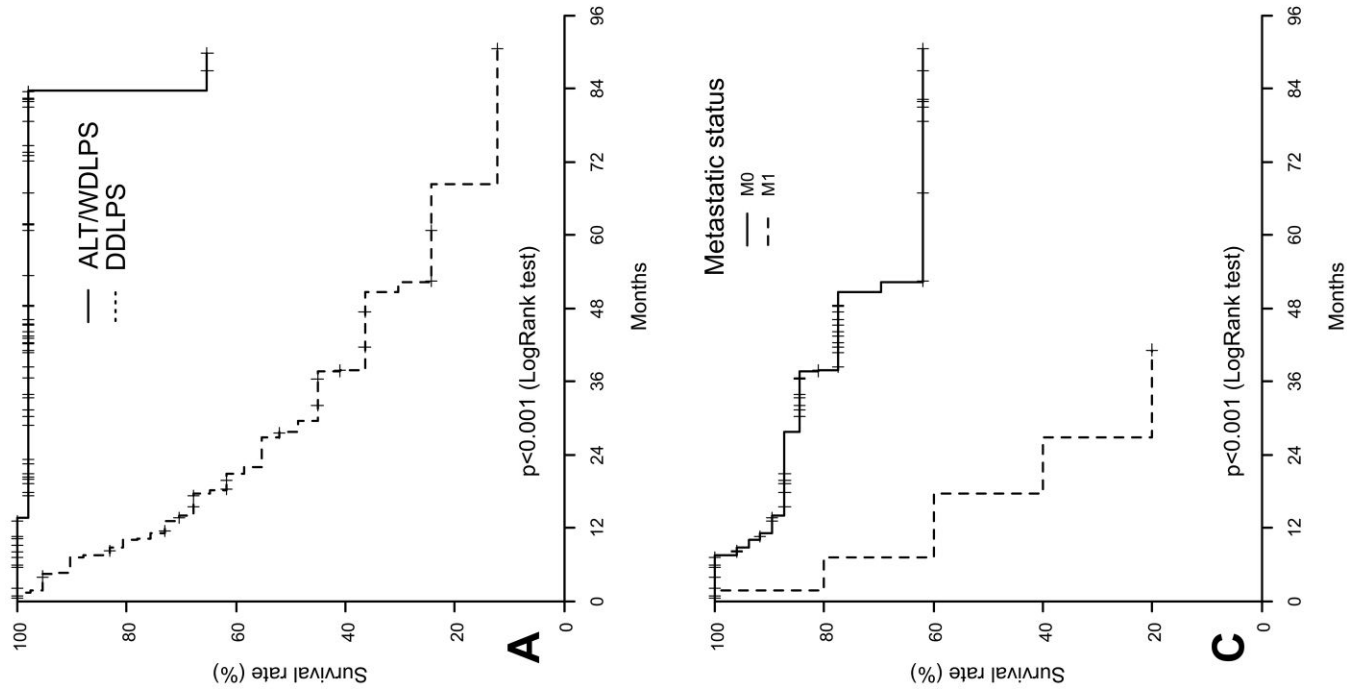
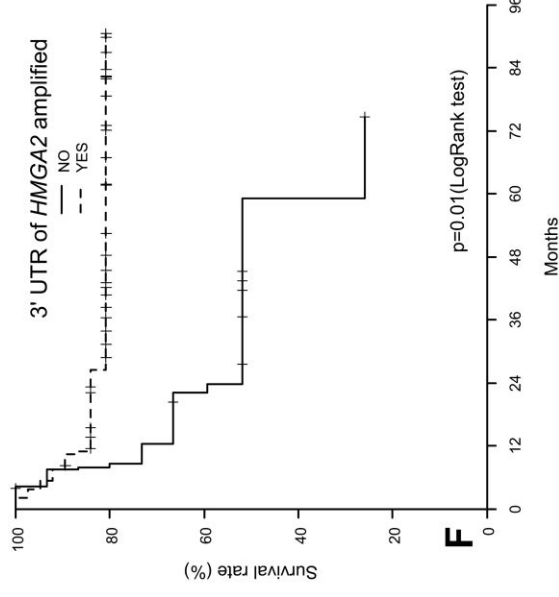
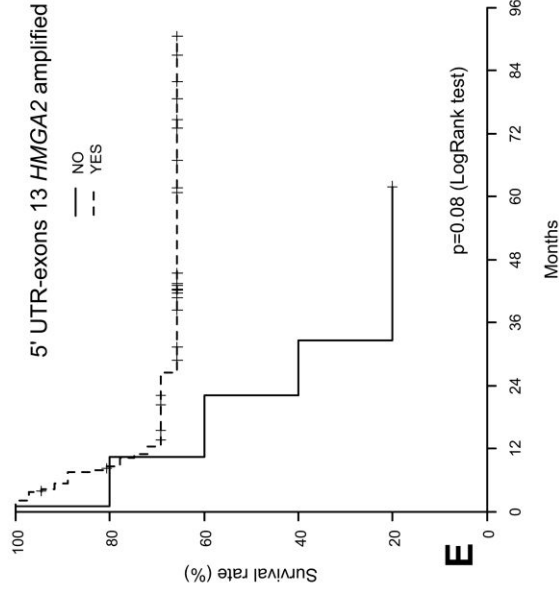
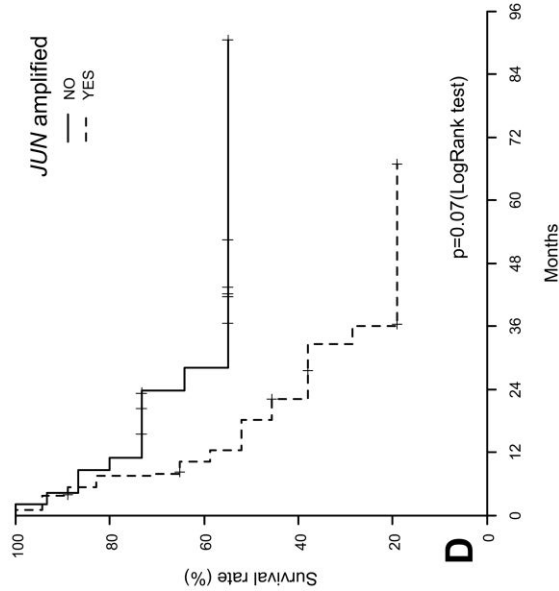
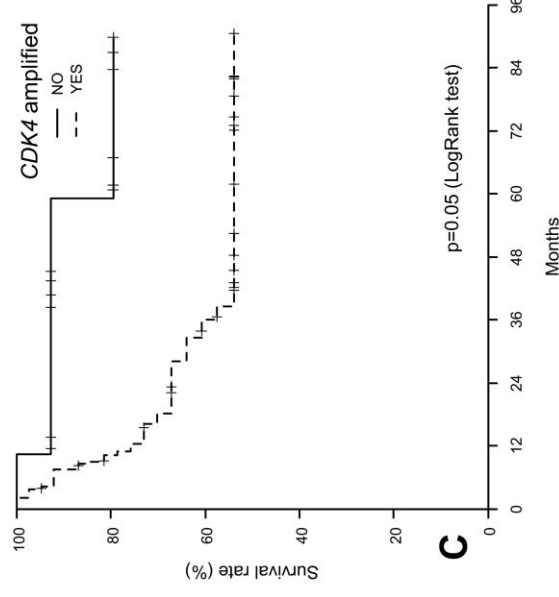
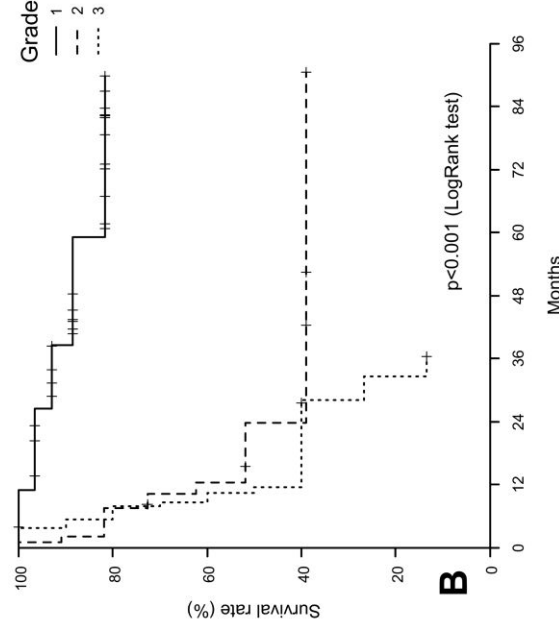
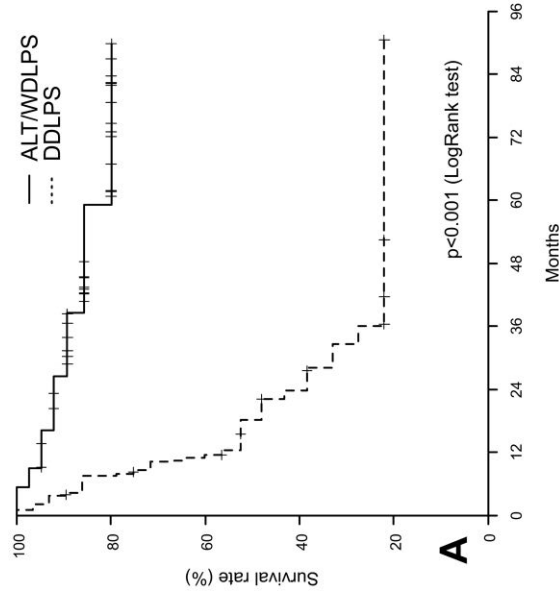


Figure 4



Supplementary Table 1. Clinical and histological features of 116 ALT/WDLPS and DDLPS.

Case	Reference	Gender	Age (y)	Histology	Morphology	Tumor Site	Tumor Site
1	10T002	M	63	DDLPS	spindle cell	Deep	Nose
2	10T067	M	67	ALT/WDLPS	lipoma-like		
3	10T092	F	84	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
4	10T136	M	65	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
5	10T163	M	72	DDLPS	pleomorphic	Superficial	Retroperitoneal
6	10T164	F	60	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Head
7	10T232	F	81	ALT/WDLPS		Deep	Retroperitoneal
8	10T237	M	54	DDLPS		Deep	Triceps
9	10T277	F	58	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
10	06T218	M	73	DDLPS	pleomorphic	Superficial	Retroperitoneal
11	10T286	M	63	DDLPS	pleomorphic	Deep	Retroperitoneal
12	10T336	M	85	DDLPS	spindle cell	Deep	Retroperitoneal
13	10T373	F	60	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
14	10T380	F	54	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
15	10T382	M	44	ALT/WDLPS			
16	10T396	M	64	ALT/WDLPS	sclerosing	Superficial	Scrotum
17	10T435	M	72	ALT/WDLPS	lipoma-like		
18	10T457	M	79	DDLPS		Superficial	Scrotum
19	10T497	F	55	DDLPS	pleomorphic	Deep	Retroperitoneal
20	09T033	M	65	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
21	09T150	F	60	DDLPS			
22	09T288	M	65	DDLPS		Superficial	Inguinal
23	09T471	M	66	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
24	09T764	F	76	DDLPS	spindle cell	Deep	Retroperitoneal
25	09T772	M	42	DDLPS	spindle cell	Superficial	Hand
26	08T018	F	70	ALT/WDLPS		Superficial	Arm
27*	08T063	F	41	ALT/WDLPS			
29	08T236	M	70	DDLPS		Deep	Abdominal
30	08T295	M	74	ALT/WDLPS		Superficial	Chest
31	08T310	M	76	DDLPS		Superficial	Testicle
32	08T329	M	53	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
33	08T331	F	86	DDLPS			
34	08T372	M	80	DDLPS			
35	08T435	M	76	ALT/WDLPS			
36	08T436	M	68	ALT/WDLPS			
37	08T456	F	53	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
38	08T506	F	66	DDLPS		Superficial	sus-clavicular
39	08T522	F	59	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
40	08T528	M	84	ALT/WDLPS			
41	08T530	F	64	ALT/WDLPS			
42	07T021	F	70	ALT/WDLPS			
43*	07T071	M	38	ALT/WDLPS			

44	07T082	M	48	DDLPS		Deep	Thigh
45*	07T235	M	75	ALT/WDLPS		Deep	Thigh
46*	07T247	M	67	ALT/WDLPS	lipoma-like and sclerosing	Deep	Thigh
47	07T260	M	80	DDLPS	pleomorphic	Deep	Retroperitoneal
48*	07T288	F	61	ALT/WDLPS	lipoma-like and sclerosing	Deep	Thigh
49*	07T344	F	48	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
50	07T444	M	77	ALT/WDLPS	lipoma-like and sclerosing	Superficial	Thigh
51	07T476	F	77	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
53	07T516	M	59	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
54	07T533	F	45	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Shoulder
55	07T539	F	79	DDLPS			
56	07T557	F	44	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
57	07T565	F	58	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
58	07T604	F	55	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Buttock
59	07T611	F	76	ALT/WDLPS	lipoma-like and sclerosing	Superficial	Buttock
60	10T635	M	78	ALT/WDLPS		Superficial	Thigh
61	09T098	M	73	DDLPS		Superficial	Abdominal
62	10T542	M	57	DDLPS	pleomorphic	Superficial	Iliac crest
63	10T543	F	79	DDLPS	pleomorphic	Deep	Thigh
64	10T562	M	51	ALT/WDLPS			
65	10T580	F	71	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Arm
66	10T768	M	69	DDLPS	spindle cell	Deep	Shoulder
67	10T775	M	65	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
68	10T631	F	55	ALT/WDLPS	lipoma-like and sclerosing	Superficial	Thigh
69	10T791	M	49	ALT/WDLPS			
70	10T712	M	70	DDLPS	spindle cell	Deep	Abdominal
71	10T680	M	79	DDLPS			
72	12T032	F	47	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Retroperitoneal
73	12T102	M	75	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Shoulder
74	09T555	F	63	DDLPS			
75	10T852	F	69	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Buttock
76	10T865	M	80	DDLPS	spindle cell	Deep	Retroperitoneal
77	10T949	M	49	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
78	10T919	M	49	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Scrotum
80	10T960	M	63	DDLPS	pleomorphic	Deep	Retroperitoneal
81	10T989	M	73	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Shoulder
82	10T1007	M	80	DDLPS		Superficial	Chest
83	10T1049	F	52	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Thigh
84	10T1061	M	66	ALT/WDLPS			
85	11T002	M	86	TLA/WDLPS	lipoma-like and	Superficial	Inguinal

sclerosing							
86	11T038	M	77	DDLPS			
87	11T071	M	67	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Neck
88	11T091	M	66	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Retroperitoneal
89	11T149	M	85	ALT/WDLPS		Superficial	Thigh
90	11T257	M	61	ALT/WDLPS			
91	11T301	F	38	ALT/WDLPS		Deep	Thigh
93	11T342	M	71	ALT/WDLPS			
96	11T382	F	59	ALT/WDLPS			
97	11T479	M	82	DDLPS			
98	11T507	M	88	ALT/WDLPS	sclerosing	Deep	Buttock
99	11T528	F	66	ALT/WDLPS		Deep	Retroperitoneal
100	11T544	M	49	ALT/WDLPS			
101	11T326	M	39	ALT/WDLPS	sclerosing	Deep	Retroperitoneal
102	11T642	M	53	DDLPS	spindle cell		
103	11T647	M	62	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
104	11T661	M	89	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
105	11T769	M	67	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Leg
106	11T795	F	40	ALT/WDLPS			
108	11T850	F	90	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
109	11T900	F	86	DDLPS	pleomorphic	Deep	Thigh
111	11T942	F	69	DDLPS			
112	11T946	M	85	DDLPS		Deep	Retroperitoneal
113	11T951	F	52	ALT/WDLPS			
114	11T1024	F	47	DDLPS		Deep	Thigh
115	11T1030	F	65	DDLPS		Superficial	Thoracic wall
117	11T373	F	53	ALT/WDLPS			
118	11T1074	M	61	ALT/WDLPS			
119	11T1150	M	66	ALT/WDLPS			
120	11T1154	M	43	ALT/WDLPS			
121	11T1183	M	73	ALT/WDLPS		Deep	Buttock
122	11T1292	M	71	DDLPS			
123	11T1305	M	68	ALT/WDLPS	lipoma-like	Superficial	Thigh
124	12T006	M	63	ALT/WDLPS	lipoma-like	Deep	Retroperitoneal
126	12T033	M	62	DDLPS	spindle cell	Deep	Abdominal

Y: years; M: Male; F: Female; ALT/WDLPS: Atypical Lipomatous Tumour/ Well Differentiated LPS; DDLPS: DeDifferentiated LPS.

*: Partial cytogenetic data of those cases have been previously described in (12, 23).

Supplementary Table 2. Summary of the chromosomal quantitative abnormalities assessed by CGH in the primary tumor and the four recurrences of Ms B.

	Discontinuous amplification of 12q region	Other amplified regions	Deleted regions
Primary WDLPS 1999	12q13.13-q24.21	1q21.2-q21.3 1q24.2-q24.3 7q22.1-q31.1 9q21.11-q34.3 12q24.23-q24.31 14q32.13-q32.31 22q11.22-q12.3	1q24.3-q25.1 1q25.2-q44
First recurrence DDLPS 2008	12q13.3-q14.1	1p32.2-p32.1 2q37.3 12q13.2-q21.31 12q21.31	1q21.1-q21.3 1q32.1 2p11.2-p11.1 16q22.1-q22.2
Second recurrence DDLPS 2009	12q13.3-q23.1	1p32.2-p32.1 1p31.3 2q37.3	2p16.3-p16.2 3p12.3-p12.1 8p23.3-p23.1
Third recurrence DDLPS 2011	12q13.3-q14.1	1p32.1 1p31.3 2q37.3 5q34 7p14.2 7q32.2-7q34 12q13.2 12q21.2-q21.31 12q21.32 12q21.33-q23.1 12q24.21 16p11.2-p11.1 20q13.2	7q11.21-q11.23 16p13.12-p12.3 16q22.1-q22.2 17q21.31
Forth recurrence DDLPS 2014	12 q13.3-12q24.21	1p36.21-p31.1 6q16.3-q21 6q23.3-q25.2,including <i>MAP3K5</i> 7p22.3-p11.2 8p23.3-q21.13 8q24.12-q24.3 9q31.1-q34.3 X p22.33-p22.32 X p21.1-p11.4 X p11.22-p11.21 X q13.3-q21.1 X q21.2-q21.31	14 q22.3 - q24.2

3. Conclusions et Perspectives

La caractérisation génétique, cytogénétique et moléculaire des TA qui a débuté dans les années 90 et qui s'est poursuivie au sein d'équipes spécialisées dont la nôtre a permis de résoudre une majorité des difficultés diagnostiques survenant dans la prise en charge initiale du patient.

Cette information est devenue d'autant plus nécessaire que les techniques d'étude de l'ADN sont devenues plus performantes, avec des niveaux de résolution toujours plus précis, en passant du caryotype, aux techniques d'hybridation *in situ* et de PCR ou de séquençage et plus récemment aux techniques de séquençage à haut débit. Cette information est devenue également beaucoup plus disponible avec une démocratisation des techniques les plus anciennes (FISH, CISH, PCRs) au sein même de certains laboratoires d'anatomopathologie dont certains sont devenus des laboratoires de « biopathologie » ou encore de « pathologie moléculaire ». Cette évolution a été accompagnée par l'intégration des caractéristiques génétiques, cytogénétiques et moléculaires au sein même des classifications de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs, et notamment celles des TM. Suivant le modèle des protocoles utilisés dans les néoplasies hématologiques, qui avaient pris en considération depuis plus d'une vingtaine d'année les résultats cytogénétiques puis moléculaires dans la stratégie thérapeutique adaptée à chaque patient, les cliniciens et pathologistes du Groupe Sarcomes Français ont été des précurseurs dans leur démarche d'intégration des analyses génétiques dans leurs arbres décisionnels.

Conclusions associées à nos travaux.

Nos conclusions sont en faveur d'un rôle majeur du gène *HMGA2* (12q14.3) dans la genèse particulière des TA. Les travaux réalisés à l'occasion de mon travail de thèse ont permis de montrer une surexpression très fréquente de la protéine HMGA2 dans les lipomes y compris en l'absence de remaniement structural du gène. L'inhibition de l'expression des microARN *let-7* ne semble pas être à l'origine de cette surexpression dans les lipomes qui conservent ces sites de fixation. Nous avons également décrit pour la première fois un cas de lipomatose où l'ARNm et la protéine de HMGA2 étaient surexprimés indépendamment d'un remaniement du gène. Il s'agit de la première démonstration de la surexpression de HMGA2 dans cette pathologie, renforçant l'hypothèse d'un rôle précoce de sa dérégulation au sein de pathologies bien différenciées du tissu adipeux. De manière intéressante, l'expression de nombreux microARN *let-7* était inhibée dans cette lipomatose, suggérant une possible dérégulation de l'expression de *HMGA2* par les microARN *let-7* dans les lipomatoses. Nous avons également identifié le gène *PPAP2B* comme nouveau partenaire de fusion de *HMGA2* dans les lipomes avec t(1;12). L'implication connue de *PPAP2B* dans l'adipogenèse nous a ainsi permis de rediscuter du rôle du gène partenaire de fusion dans la genèse de ces lipomes. Nous

décrivons de même un nouveau cas avec gène de fusion *HMGA2-NFIB* dans un rare cas de lipome profond pédiatrique. Enfin nous démontrons sur une série de 116 TLA/LBD et LDD avec amplification de *MDM2* que l'amplification des trois premiers exons de *HMGA2* est significativement plus fréquente dans les TLA/LBD que dans les LDD. Cette donnée renforce l'hypothèse d'un rôle très précoce de *HMGA2* dans la genèse des TLA/LBD et LDD.

En tant qu'oncologue médicale, j'ai été intéressée par les implications cliniques de l'amplification du gène *HMGA2*. Nous démontrons pour la première fois le rôle pronostic favorable de l'amplification de *HMGA2* ce qui suggère un rôle particulier de cet oncogène dans les TLA/LBD et LDD. Une hypothèse serait la possible influence des CMS caractéristiques des TLA/LBD et LDD et la possible régulation différente de l'architecture chromatinienne par la protéine tronquée HMGA2 dans ce contexte cellulaire particulier. La surexpression de HMGA2 est en effet classiquement associée à un pronostic plus péjoratif dans d'autres tumeurs malignes au sein desquelles la surexpression de HMGA2 n'est pas associée à une amplification et une troncation du gène. Nous confirmons également dans cette série indépendante le caractère non constant de l'amplification de *CDK4*, et l'association significative de celle-ci avec le sous-type peu différencié (LDD) ainsi qu'un pronostic plus péjoratif. Nous montrons également que l'amplification de *JUN*, qui est significativement plus fréquente dans les LDD, est associée à un pronostic plus péjoratif et une survie sans récurrence plus courte. Enfin, nous décrivons pour la première fois l'analyse génétique et cytogénétique d'un cas de LBD rétro-péritonéal et de ses quatre récurrences successives sous forme de LDD. Nous illustrons avec ce cas plusieurs points caractéristiques de la génomique des LBD-LDD : i) l'amplification précoce et constante de *MDM2* ii) la complexité génomique croissante de ces récurrences iii) l'apparition de l'amplification de *JUN* avec la dédifférenciation de ces tumeurs ; l'amplification de *MAP3K5* n'apparaît qu'au niveau de la dernière récurrence. Pour aller plus loin, une analyse FISH couplant les sondes *HMGA2* et *JUN*, *JUN-MAP3K5* et *MAP3K5-HMGA2* permettrait d'établir si ces co-amplifications surviennent bien au sein des mêmes cellules ou s'il existe des clones différents avec des profils spécifiques d'amplification. Nos travaux ont ainsi pu apporter un éclairage supplémentaire et renforcé l'hypothèse d'un rôle particulier et précoce de la dérégulation du gène *HMGA2* dans les lipomes, les lipomatoses et les TLA/LBD et LDD.

Perspectives thérapeutiques permises par la connaissance de la biologie des TA.

Si l'analyse moléculaire des TA est désormais utilisée en routine pour l'aide au diagnostic, l'étape suivante est la poursuite de la caractérisation génétique de ces tumeurs en vue d'identifier des cibles thérapeutiques et des molécules efficaces. Les chimiothérapies classiques, essentiellement

les anthracyclines, ne permettent en effet que des taux de réponses objective (de l'ordre de 12%) et une médiane de survie sans progression de l'ordre de 4,6 mois chez les patients suivis pour un LBD ou LDD localement évolué ou métastatique (Italiano, Toulmonde et al. 2012).

Ainsi, les implications thérapeutiques des anomalies observées dans les TA sont l'objet d'une recherche thérapeutique active. Barretina et al. (Barretina, Taylor et al. 2010) ont proposé une carte des altérations moléculaires récurrentes dans une série de 207 sarcomes des tissus mous, dont des LDD, pour lesquels une analyse moléculaire exhaustive a été réalisée (séquençage de l'ADN, altérations du nombre de copies et expression de l'ARNm). Après avoir procédé à l'inactivation de 385 gènes au sein de trois lignées de LDD, ils ont mis en évidence 99 gènes dont l'inactivation est associée à une diminution significative de la prolifération dans au moins l'une de ces lignées cellulaires. Parmi ces gènes, *CDK4* était le plus intensément surexprimé. L'inhibition de l'expression de *CDK4* dans ces lignées, par *short hairpin RNA* ou avec un inhibiteur pharmacologique PD0332991, était significativement associée à une décroissance de la prolifération cellulaire. Le PD0332991 a été testé chez 30 patients atteints de LBD-LDD (5 LBD/25 LDD) avec amplification de *CDK4* dans un essai de phase II (Dickson, Tap et al. 2013). Si les résultats de survie sans progression à 12 semaines étaient encourageants (66%, IC90%[51% ;100%]), une seule réponse partielle (3%) a été constatée. Le profil de toxicité, notamment hématologique, de cette molécule était au moins comparable à celui de cytotoxiques classiques. Ces résultats doivent être confirmés dans un essai randomisé d'autant plus nécessaire que l'histoire naturelle et la cinétique de progression de ces tumeurs sont hautement variables d'un individu à l'autre.

Ciblage thérapeutique de MDM2.

Des approches de ciblage de MDM2 ont également été suggérées par le rôle prépondérant et unique de ce gène dans la biologie des LBD-LDD. Des données précliniques *in vitro* sont en effet disponibles. L'effet de la Nutlin-3A, qui est un agent antagoniste de MDM2, a été testé dans deux lignées cellulaires de TLA/LBD et une lignée de LDD (Muller, Paulsen et al. 2007). Dans cette publication, l'administration de Nutlin-3A entraînait l'apoptose des cellules de LBD et LDD de même que dans deux lignées d'ostéosarcomes avec amplification de *MDM2*. La Nutlin-3A n'avait pas d'effet sur des lignées de sarcomes sans amplification de *MDM2*. De même Singer et al. (Singer, Socci et al. 2007) confirment cet effet antitumoral de la Nutlin-3A sur des lignées de LDD. Le RG7112, un inhibiteur de MDM2, a été testé en préopératoire chez 20 patients atteints de LBD ou LDD (Ray-Coquard, Blay et al. 2012) sur la base de ce rationnel. Une seule réponse partielle et 14 stabilisations ont été constatées au prix d'une toxicité hématologique et digestive qui a été considérée comme sérieuse pour 8 patients (40%). In fine, cette approche, bien que basée sur des données précliniques solides et un rationnel biologique fort, s'est avérée décevante. Ceci a par ailleurs conforté les travaux

d'autres équipes dans le ciblage thérapeutique d'autres molécules impliquées dans la genèse des TLA/ LBD et LDD.

Ciblage thérapeutique de JUN.

L'inhibition de *JUN* et de sa voie de signalisation dans les LDD est une option thérapeutique qui a été suggérée par des données précliniques (Chibon, Mariani et al. 2004, Mariani, Brennetot et al. 2007). L'aplidine, un inhibiteur de JUN a ainsi été évalué chez 24 patients atteints de LDD avancés (Italiano, Le Cesne et al. 2014) à l'occasion d'un essai de phase II. L'essai a été clos prématurément car l'analyse intermédiaire prévue par le protocole objectivait une seule stabilisation sur 17 patients évaluables. Par ailleurs, le statut d'amplification de *JUN* n'était pas corrélé au pronostic des patients ni à la réponse thérapeutique.

D'autres oncogènes sont des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes pour les LBD-LDD telles que *YEATS4* (Barretina, Taylor et al. 2010) ou encore la voie de signalisation de *FGFR* et *Syndecan1* (Zhang, Chu et al. 2013, Zaragosi, Dadone et al. 2014). En effet, des travaux récemment réalisés dans notre laboratoire (Zaragosi, Dadone et al. 2014) ont permis de montrer que le *Syndecan-1*, un protéoglycan de la membrane cellulaire, jouait non seulement un rôle dans la régulation de l'adipogenèse mais était également surexprimé dans les LDD. L'inhibition de l'expression du *Syndecan-1* dans des lignées de LDD altérerait la viabilité cellulaire ainsi que la prolifération.

Ciblage thérapeutique de HMGA2.

L'intérêt d'un ciblage thérapeutique de *HMGA2* dans les LBD et LDD est à débattre. Les arguments qui défendent une telle approche sont ses propriétés pro-oncogéniques prouvées par les études fonctionnelles réalisées sur des modèles in vitro et in vivo variés (Fedele, Berlingieri et al. 1998, Morishita, Zaidi et al. 2013). Un autre argument est la survenue précoce des anomalies structurales et de nombre du gène *HMGA2* dans la genèse des TLA/LBD et LDD. La protéine *HMGA2*, y compris sa forme tronquée, est surexprimée de manière quasi constante dans les TLA/LBD et très fréquemment dans les LDD. Elle conserve les domaines fonctionnels de liaison à l'ADN (AT hook) et donc son action de modulation de la transcription de l'ADN. Cependant le rôle de *HMGA2* dans la tumorigénèse des TLA/LBD et LDD apparaît complexe. En effet, le moins bon pronostic associé à l'absence d'amplification de *HMGA2* dans notre série suggérerait un effet « protecteur » de l'amplification de *HMGA2* en favorisant la différenciation adipocytaire et probablement la stabilité génomique de ces tumeurs. Ceci est à mettre en lien avec les propriétés de gène suppresseur de tumeurs qui ont été évoquées plus haut ainsi que le pouvoir transformant plus limité de la forme tronquée de *HMGA2* sur une lignée de fibroblastes lorsqu'on la compare à d'autres oncogènes plus

classiques (Fedele, Berlingieri et al. 1998). Ainsi, les modèles animaux avec anomalies isolées de *HMGA2* ne développent que des tumeurs bénignes (Fedele, Battista et al. 2002, Zaidi, Okada et al. 2006). Chez l'homme également les anomalies isolées du gène *HMGA2* sont associées uniquement à la formation de tumeurs bénignes. Par ailleurs, il n'existe à notre connaissance pas de molécule à vocation thérapeutique ciblant *HMGA2* qui soit disponible chez l'homme.

Poursuite de la caractérisation des TA dans notre laboratoire.

Pour étoffer le rationnel d'un ciblage thérapeutique de *HMGA2* dans les TLA-LBD/LDD, les perspectives de travaux qui seront entrepris dans le laboratoire à la suite de nos résultats sont l'étude de l'invalidation de l'expression de *HMGA2* par infection lentivirale de *short hairpin RNA* dans des lignées de LBD établies dans notre laboratoire. Ceci aura l'intérêt d'étudier le rôle exact de cette inactivation dans le contexte génomique très particulier des LBD. Les efforts seront probablement poursuivis dans l'étude de la région 3'UTR de *HMGA2* avec à terme un séquençage de celle-ci notamment dans les lipomes sans remaniement structurel du gène. La recherche et l'identification de nouveaux gènes partenaires de fusion seront poursuivies. Enfin, notre laboratoire participera à un projet collaboratif coordonné par Florence Pedeutour qui a pour objectif l'analyse exhaustive des anomalies de la voie de signalisation qui implique le syndecan 1 et FGFR, la mesure de l'inhibition de FGFR sur des modèles précliniques in vitro et in vivo de LBD et LDD pour à terme proposer un essai thérapeutique clinique avec la molécule qui aura démontré les meilleures propriétés antiprolifératives.

Perspectives personnelles.

D'un point de vue plus personnel, ce travail de thèse constitue l'une des étapes essentielles de ma formation professionnelle d'oncologue. Je souhaite en effet me spécialiser dans l'élaboration et la supervision d'essais de phase précoce ainsi que dans la prise en charge des sarcomes. Ce bagage me sera également précieux pour l'exercice d'une médecine personnalisée. Celle-ci se concrétise notamment sous la forme de participation à des réunions de concertation pluridisciplinaire moléculaires au sein desquelles les cliniciens et les biologistes discutent du meilleur traitement possible à la lumière des anomalies moléculaires mises en évidence pour chaque cas particulier. Mon intégration dans ce groupe de travail a été notamment légitimée par la réalisation de ce travail de thèse. Celui-ci m'aura entre autres permis l'apprentissage de la rigueur de la lecture scientifique, ainsi que les difficiles et multiples finesses de l'écriture scientifique. Cette étape aura surtout été une expérience humaine enrichissante pendant laquelle j'ai pu mesurer l'engagement de mes interlocuteurs dans la compréhension de la complexité des mécanismes génétiques qui sous tendent l'oncogenèse.

4-Résumé

Les tumeurs adipocytaires (TA) bénignes sont majoritairement constituées par les lipomes, alors que les TA malignes sont principalement des Tumeurs Lipomateuses Atypiques (TLA)/ liposarcome (LPS) bien différenciés (LBD) et les LPS dédifférenciés (LDD). Le gène *HMGA2* (*High Mobility Group A2*) est remanié dans certains lipomes et amplifié dans les TLA/LBD et LDD. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que *HMGA2* jouait un rôle fondamental dans la genèse des TA bénignes et malignes.

En faveur de cette hypothèse, nous avons observé une surexpression constante de *HMGA2* dans les TLA/LBD et LDD avec amplification de *HMGA2* et les lipomes avec remaniement de *HMGA2*. Dans un cas de lipomatose, hypertrophie pathologique du tissu adipeux sans anomalie du gène *HMGA2*, une surexpression de *HMGA2* était associée à une inhibition de l'expression de plusieurs microARN *let-7*. En revanche, nos travaux ne sont pas en faveur d'un rôle prépondérant des microARN *let7* dans la surexpression de *HMGA2* dans les TA.

Nous nous sommes également intéressés aux gènes partenaires de fusion avec *HMGA2* dans les lipomes et avons notamment identifié une nouvelle fusion impliquant *PPAP2B* (*Phosphatidic Acid Phosphatase type 2B*) localisé en 1p32. Nous avons aussi confirmé le rôle du gène *NFIB* (9p22) dans les lipomes.

Enfin, nous avons établi des corrélations pronostiques dans une grande série de 116 TLA/LBD et LDD : l'amplification de *HMGA2* était associée à l'histotype TLA/LBD et à une survie longue alors que les amplifications de *CDK4* et *JUN* sont associées au type LDD et une survie courte.

Ainsi, nos données confortent l'hypothèse d'un rôle précoce et majeur de *HMGA2* dans la genèse des TA bien différenciées.

Références

. "http://www.genome.ucsc.edu;".

Abe, N., T. Watanabe, T. Masaki, T. Mori, M. Sugiyama, H. Uchimura, Y. Fujioka, G. Chiappetta, A. Fusco and Y. Atomi (2000). "Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins." *Cancer Res* **60**(12): 3117-3122.

Abe, N., T. Watanabe, M. Sugiyama, H. Uchimura, G. Chiappetta, A. Fusco and Y. Atomi (1999). "Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker." *Cancer Res* **59**(6): 1169-1174.

Abe, N., T. Watanabe, Y. Suzuki, N. Matsumoto, T. Masaki, T. Mori, M. Sugiyama, G. Chiappetta, A. Fusco and Y. Atomi (2003). "An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue." *Br J Cancer* **89**(11): 2104-2109.

Akai, T., Y. Ueda, Y. Sasagawa, T. Hamada, T. Date, S. Katsuda, H. Iizuka, Y. Okada and K. Chada (2004). "High mobility group I-C protein in astrocytoma and glioblastoma." *Pathol Res Pract* **200**(9): 619-624.

Alam, M., R. Ahmad, H. Rajabi and D. Kufe (2014). "MUC1-C INDUCES THE LIN28B-->LET-7-->HMGA2 AXIS TO REGULATE SELF-RENEWAL IN NSCLC." *Mol Cancer Res*.

Amirand, C., A. Viari, J. P. Ballini, H. Rezaei, N. Beaujean, D. Jullien, E. Kas and P. Debey (1998). "Three distinct sub-nuclear populations of HMG-I protein of different properties revealed by co-localization image analysis." *J Cell Sci* **111** (Pt 23): 3551-3561.

Anand, A. and K. Chada (2000). "In vivo modulation of Hmgic reduces obesity." *Nat Genet* **24**(4): 377-380.

Antonescu, C. R., A. Elahi, J. H. Healey, M. F. Brennan, M. Y. Lui, J. Lewis, S. C. Jhanwar, J. M. Woodruff and M. Ladanyi (2000). "Monoclonality of multifocal myxoid liposarcoma: confirmation by analysis of TLS-CHOP or EWS-CHOP rearrangements." *Clin Cancer Res* **6**(7): 2788-2793.

Antonescu, C. R., A. Elahi, M. Humphrey, M. Y. Lui, J. H. Healey, M. F. Brennan, J. M. Woodruff, S. C. Jhanwar and M. Ladanyi (2000). "Specificity of TLS-CHOP rearrangement for classic myxoid/round cell liposarcoma: absence in predominantly myxoid well-differentiated liposarcomas." *J Mol Diagn* **2**(3): 132-138.

Antonescu, C. R., S. J. Tschernyavsky, R. Decuseara, D. H. Leung, J. M. Woodruff, M. F. Brennan, J. A. Bridge, J. R. Neff, J. R. Goldblum and M. Ladanyi (2001). "Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases." *Clin Cancer Res* **7**(12): 3977-3987.

Antonescu, C. R., L. Zhang, S. Y. Shao, J. M. Mosquera, I. Weinreb, N. Katabi and C. D. Fletcher (2013). "Frequent PLAG1 gene rearrangements in skin and soft tissue myoepithelioma with ductal differentiation." *Genes Chromosomes Cancer* **52**(7): 675-682.

Arlotta, P., A. K. Tai, G. Manfioletti, C. Clifford, G. Jay and S. J. Ono (2000). "Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas." *J Biol Chem* **275**(19): 14394-14400.

Ashar, H. R., R. A. Chouinard, Jr., M. Dokur and K. Chada (2010). "In vivo modulation of HMGA2 expression." *Biochim Biophys Acta* **1799**(1-2): 55-61.

Ashar, H. R., M. S. Fejzo, A. Tkachenko, X. Zhou, J. A. Fletcher, S. Weremowicz, C. C. Morton and K. Chada (1995). "Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains." *Cell* **82**(1): 57-65.

Aurias, A., C. Rimbaut, D. Buffe, J. M. Zucker and A. Mazabraud (1984). "Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A cytogenetic study of four fresh tumors." *Cancer Genet Cytogenet* **12**(1): 21-25.

Austin, S. A., F. J. Vriesendorp, F. T. Thandroyen, J. T. Hecht, O. T. Jones and D. R. Johns (1998). "Expanding the phenotype of the 8344 transfer RNAlysine mitochondrial DNA mutation." *Neurology* **51**(5): 1447-1450.

Ayoubi, T. A., E. Jansen, S. M. Meulemans and W. J. Van de Ven (1999). "Regulation of HMGI(C) expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development." Oncogene **18**(36): 5076-5087.

Azumi, N., J. Curtis, R. L. Kempson and M. R. Hendrickson (1987). "Atypical and malignant neoplasms showing lipomatous differentiation. A study of 111 cases." Am J Surg Pathol **11**(3): 161-183.

Bahrami, A., J. D. Dalton, B. Shivakumar and J. F. Krane (2012). "PLAG1 alteration in carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies of 22 cases." Head Neck Pathol **6**(3): 328-335.

Bahrami, A., B. Perez-Ordóñez, J. D. Dalton and I. Weinreb (2013). "An analysis of PLAG1 and HMGA2 rearrangements in salivary duct carcinoma and examination of the role of precursor lesions." Histopathology **63**(2): 250-262.

Balcerczak, M., G. Pasz-Walczak, E. Balcerczak, M. Wojtylak, R. Kordek and M. Mirowski (2003). "HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging." Pathol Res Pract **199**(10): 641-646.

Baldassarre, G., S. Battista, B. Belletti, S. Thakur, F. Pentimalli, F. Trapasso, M. Fedele, G. Pierantoni, C. M. Croce and A. Fusco (2003). "Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma." Mol Cell Biol **23**(7): 2225-2238.

Baldassarre, G., M. Fedele, S. Battista, A. Vecchione, A. J. Klein-Szanto, M. Santoro, T. A. Waldmann, N. Azimi, C. M. Croce and A. Fusco (2001). "Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7970-7975.

Balestreire, E., J. M. Haught and J. C. English, 3rd (2007). Multiple subcutaneous lipomas induced by HAART in the absence of protease inhibitors. Arch Dermatol. United States. **143**: 1596-1597.

Bandiera, A., D. Bonifacio, G. Manfioletti, F. Mantovani, A. Rustighi, F. Zanconati, A. Fusco, L. Di Bonito and V. Giancotti (1998). "Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix." Cancer Res **58**(3): 426-431.

Barh, D., R. Malhotra, B. Ravi and P. Sindhurani (2010). "MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic." Curr Oncol **17**(1): 70-80.

Barretina, J., B. S. Taylor, S. Banerji, A. H. Ramos, M. Lagos-Quintana, P. L. Decarolis, K. Shah, N. D. Socci, B. A. Weir, A. Ho, D. Y. Chiang, B. Reva, C. H. Mermel, G. Getz, Y. Antipin, R. Beroukhim, J. E. Major, C. Hatton, R. Nicoletti, M. Hanna, T. Sharpe, T. J. Fennell, K. Cibulskis, R. C. Onofrio, T. Saito, N. Shukla, C. Lau, S. Nelander, S. J. Silver, C. Sougnez, A. Viale, W. Winckler, R. G. Maki, L. A. Garraway, A. Lash, H. Greulich, D. E. Root, W. R. Sellers, G. K. Schwartz, C. R. Antonescu, E. S. Lander, H. E. Varmus, M. Ladanyi, C. Sander, M. Meyerson and S. Singer (2010). "Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy." Nat Genet **42**(8): 715-721.

Barretina, J., B. S. Taylor, S. Banerji, A. H. Ramos, M. Lagos-Quintana, P. L. Decarolis, K. Shah, N. D. Socci, B. A. Weir, A. Ho, D. Y. Chiang, B. Reva, C. H. Mermel, G. Getz, Y. Antipin, R. Beroukhim, J. E. Major, C. Hatton, R. Nicoletti, M. Hanna, T. Sharpe, T. J. Fennell, K. Cibulskis, R. C. Onofrio, T. Saito, N. Shukla, C. Lau, S. Nelander, S. J. Silver, C. Sougnez, A. Viale, W. Winckler, R. G. Maki, L. A. Garraway, A. Lash, H. Greulich, D. E. Root, W. R. Sellers, G. K. Schwartz, C. R. Antonescu, E. S. Lander, H. E. Varmus, M. Ladanyi, C. Sander, M. Meyerson and S. Singer (2010). "Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy." Nat Genet.

Bartuma, H., H. A. Domanski, F. V. Von Steyern, C. M. Kullendorff, N. Mandahl and F. Mertens (2008). "Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in lipoblastoma." Cancer Genet Cytogenet **183**(1): 60-63.

Bartuma, H., K. H. Hallor, I. Panagopoulos, A. Collin, A. Rydholm, P. Gustafson, H. C. Bauer, O. Brosjo, H. A. Domanski, N. Mandahl and F. Mertens (2007). "Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype." Genes Chromosomes Cancer **46**(6): 594-606.

Bartuma, H., K. H. Nord, G. Macchia, M. Isaksson, J. Nilsson, H. A. Domanski, N. Mandahl and F. Mertens (2011). "Gene expression and single nucleotide polymorphism array analyses of spindle cell

lipomas and conventional lipomas with 13q14 deletion." *Genes Chromosomes Cancer* **50**(8): 619-632.

Bartuma, H., I. Panagopoulos, A. Collin, D. Trombetta, H. A. Domanski, N. Mandahl and F. Mertens (2009). "Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups." *Mol Cancer* **8**: 36.

Battista, S., V. Fidanza, M. Fedele, A. J. Klein-Szanto, E. Outwater, H. Brunner, M. Santoro, C. M. Croce and A. Fusco (1999). "The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis." *Cancer Res* **59**(19): 4793-4797.

Berkovic, S. F., F. Andermann, E. A. Shoubbridge, S. Carpenter, Y. Robitaille, E. Andermann, C. Melmed and G. Karpati (1991). "Mitochondrial dysfunction in multiple symmetrical lipomatosis." *Ann Neurol* **29**(5): 566-569.

Berlingieri, M. T., G. M. Pierantoni, V. Giancotti, M. Santoro and A. Fusco (2002). "Thyroid cell transformation requires the expression of the HMGA1 proteins." *Oncogene* **21**(19): 2971-2980.

Billing, V., F. Mertens, H. A. Domanski and A. Rydholm (2008). "Deep-seated ordinary and atypical lipomas: histopathology, cytogenetics, clinical features, and outcome in 215 tumours of the extremity and trunk wall." *J Bone Joint Surg Br* **90**(7): 929-933.

Binh, M. B., X. Sastre-Garau, L. Guillou, G. de Pinieux, P. Terrier, R. Lagace, A. Aurias, I. Hostein and J. M. Coindre (2005). 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. *Am J Surg Pathol*. United States. **29**: 1340-1347.

Bode-Lesniewska, B., S. Frigerio, U. Exner, M. T. Abdou, H. Moch and D. R. Zimmermann (2007). "Relevance of translocation type in myxoid liposarcoma and identification of a novel EWSR1-DDIT3 fusion." *Genes Chromosomes Cancer* **46**(11): 961-971.

Boland, J. M., S. W. Weiss, A. M. Oliveira, M. L. Erickson-Johnson and A. L. Folpe (2010). "Liposarcomas With Mixed Well-differentiated and Pleomorphic Features: A Clinicopathologic Study of 12 Cases." *Am J Surg Pathol*.

Bonvalot, S., R. Miceli, M. Berselli, S. Causeret, C. Colombo, L. Mariani, H. Bouzaiene, C. Le Pechoux, P. G. Casali, A. Le Cesne, M. Fiore and A. Gronchi (2010). "Aggressive surgery in retroperitoneal soft tissue sarcoma carried out at high-volume centers is safe and is associated with improved local control." *Ann Surg Oncol* **17**(6): 1507-1514.

Bonvalot, S., M. Rivoire, M. Castaing, E. Stoeckle, A. Le Cesne, J. Y. Blay and A. Laplanche (2009). "Primary retroperitoneal sarcomas: a multivariate analysis of surgical factors associated with local control." *J Clin Oncol* **27**(1): 31-37.

Borrmann, L., R. Schwanbeck, T. Heyduk, B. Seebeck, P. Rogalla, J. Bullerdiek and J. R. Wisniewski (2003). "High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity." *Nucleic Acids Res* **31**(23): 6841-6851.

Borrmann, L., S. Wilkening and J. Bullerdiek (2001). "The expression of HMGA genes is regulated by their 3'UTR." *Oncogene* **20**(33): 4537-4541.

Bouron-Dal Soglio, D., A. L. Rougemont, R. Absi, S. Barrette, A. Montpetit, R. Fetni and J. C. Fournet (2009). "SNP genotyping of a sclerosing rhabdomyosarcoma: reveals highly aneuploid profile and a specific MDM2/HMGA2 amplification." *Hum Pathol* **40**(9): 1347-1352.

Bracaglia, R., M. D'Ettorre, S. Gentileschi, G. Mingrone and D. Tambasco (2014). "Multiple lipomatosis after stem cell trasplant and chemotherapy: a case report." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **18**(3): 413-415.

Broberg, K., M. Zhang, B. Strombeck, M. Isaksson, M. Nilsson, F. Mertens, N. Mandahl and I. Panagopoulos (2002). "Fusion of RDC1 with HMGA2 in lipomas as the result of chromosome aberrations." *Int J Oncol* **21**(2): 321-326.

Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. England. **26**: 152-153.

Bustin, M. and R. Reeves (1996). "High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **54**: 35-100.

Buyse, K., W. Reardon, L. Mehta, T. Costa, C. Fagerstrom, D. J. Kingsbury, G. Anadiotis, B. C. McGillivray, J. Hellemans, N. de Leeuw, B. B. de Vries, F. Speleman, B. Menten and G. Mortier (2009). "The 12q14 microdeletion syndrome: additional patients and further evidence that HMGA2 is an important genetic determinant for human height." *Eur J Med Genet* **52**(2-3): 101-107.

Califano, D., S. Pignata, N. S. Losito, A. Ottaiano, S. Greggi, V. De Simone, S. Cecere, C. Aiello, F. Esposito, A. Fusco and G. Chiappetta (2014). "High HMGA2 expression and high body mass index negatively affect the prognosis of patients with ovarian cancer." *J Cell Physiol* **229**(1): 53-59.

Carty, C. L., N. A. Johnson, C. M. Hutter, A. P. Reiner, U. Peters, H. Tang and C. Kooperberg (2012). "Genome-wide association study of body height in African Americans: the Women's Health Initiative SNP Health Association Resource (SHARe)." *Hum Mol Genet* **21**(3): 711-720.

Catez, F. and R. Hock (2010). "Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging." *Biochim Biophys Acta* **1799**(1-2): 15-27.

Chatterjee, I., J. O. Humtsoe, E. E. Kohler, C. Sorio and K. K. Wary (2011). "Lipid phosphate phosphatase-3 regulates tumor growth via beta-catenin and." *Mol Cancer* **10**: 51.

Chen, K. J., Y. Hou, K. Wang, J. Li, Y. Xia, X. Y. Yang, G. Lv, X. L. Xing and F. Shen (2014). "Reexpression of Let-7g microRNA inhibits the proliferation and migration via K-Ras/HMGA2/snail axis in hepatocellular carcinoma." *Biomed Res Int* **2014**: 742417.

Chiappetta, G., V. Avantiaggiato, R. Visconti, M. Fedele, S. Battista, F. Trapasso, B. M. Merciai, V. Fidanza, V. Giacotti, M. Santoro, A. Simeone and A. Fusco (1996). "High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development." *Oncogene* **13**(11): 2439-2446.

Chiappetta, G., G. Manfioletti, F. Pentimalli, N. Abe, M. Di Bonito, M. T. Vento, A. Giuliano, M. Fedele, G. Viglietto, M. Santoro, T. Watanabe, V. Giacotti and A. Fusco (2001). "High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases." *Int J Cancer* **91**(2): 147-151.

Chiappetta, G., G. Tallini, M. C. De Biasio, G. Manfioletti, F. J. Martinez-Tello, F. Pentimalli, F. de Nigris, A. Mastro, G. Botti, M. Fedele, N. Berger, M. Santoro, V. Giacotti and A. Fusco (1998). "Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma." *Cancer Res* **58**(18): 4193-4198.

Chibon, F., O. Mariani, J. Derre, A. Mairal, J. M. Coindre, L. Guillou, X. Sastre, F. Pedeutour and A. Aurias (2004). "ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications." *Genes Chromosomes Cancer* **40**(1): 32-37.

Chibon, F., O. Mariani, J. Derre, S. Malinge, J. M. Coindre, L. Guillou, R. Lagace and A. Aurias (2002). "A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas." *Cancer Genet Cytogenet* **139**(1): 24-29.

Chieffi, P., S. Battista, M. Barchi, S. Di Agostino, G. M. Pierantoni, M. Fedele, L. Chiariotti, D. Tramontano and A. Fusco (2002). "HMGA1 and HMGA2 protein expression in mouse spermatogenesis." *Oncogene* **21**(22): 3644-3650.

Cleynen, I., C. Huysmans, T. Sasazuki, S. Shirasawa, W. Van de Ven and K. Peeters (2007). "Transcriptional control of the human high mobility group A1 gene: basal and oncogenic Ras-regulated expression." *Cancer Res* **67**(10): 4620-4629.

Cleynen, I. and W. J. Van de Ven (2008). "The HMGA proteins: a myriad of functions (Review)." *Int J Oncol* **32**(2): 289-305.

Coffin, C. M., A. Lowichik and A. Putnam (2009). "Lipoblastoma (LPB): a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 59 cases." *Am J Surg Pathol* **33**(11): 1705-1712.

Coindre, J. M. (1998). "Histologic grading of adult soft tissue sarcomas." *Verh Dtsch Ges Pathol* **82**: 59-63.

Coindre, J. M., I. Hostein, G. Maire, J. Derre, L. Guillou, A. Leroux, J. P. Ghnassia, F. Collin, F. Pedeutour and A. Aurias (2004). "Inflammatory malignant fibrous histiocytomas and dedifferentiated liposarcomas: histological review, genomic profile, and MDM2 and CDK4 status favour a single entity." *J Pathol* **203**(3): 822-830.

Copley, M. R., S. Babovic, C. Benz, D. J. Knapp, P. A. Beer, D. G. Kent, S. Wohrer, D. Q. Treloar, C. Day, K. Rowe, H. Mader, F. Kuchenbauer, R. K. Humphries and C. J. Eaves (2013). "The Lin28b-let-7-Hmga2

axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells." Nat Cell Biol **15**(8): 916-925.

Cordon-Cardo, C., E. Latres, M. Drobnjak, M. R. Oliva, D. Pollack, J. M. Woodruff, V. Marechal, J. Chen, M. F. Brennan and A. J. Levine (1994). "Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas." Cancer Res **54**(3): 794-799.

Craig, W. D., J. C. Fanburg-Smith, L. R. Henry, R. Guerrero and J. H. Barton (2009). "Fat-containing lesions of the retroperitoneum: radiologic-pathologic correlation." Radiographics **29**(1): 261-290.

Cronin, P. A., E. Myers, H. P. Redmond, S. O'Reilly and W. O. Kirwan (2010). "Lipomatosis: an unusual side-effect of cytotoxic chemotherapy?" Acta Derm Venereol **90**(3): 303-304.

Crozat, A., P. Aman, N. Mandahl and D. Ron (1993). "Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma." Nature **363**(6430): 640-644.

Dahlen, A., M. Debiec-Rychter, F. Pedetour, H. A. Domanski, M. Hoglund, H. C. Bauer, A. Rydholm, R. Sciot, N. Mandahl and F. Mertens (2003). "Clustering of deletions on chromosome 13 in benign and low-malignant lipomatous tumors." Int J Cancer **103**(5): 616-623.

Dahlen, A., F. Mertens, A. Rydholm, O. Brosjo, J. Wejde, N. Mandahl and I. Panagopoulos (2003). "Fusion, disruption, and expression of HMGA2 in bone and soft tissue chondromas." Mod Pathol **16**(11): 1132-1140.

Dal Cin, P., S. Wanschura, B. Kazmierczak, G. Tallini, A. Dei Tos, J. Bullerdiek, I. Van den Berghe, P. Moerman and H. Van den Berghe (1998). "Amplification and expression of the HMGI-C gene in a benign endometrial polyp." Genes Chromosomes Cancer **22**(2): 95-99.

De Martino, I., R. Visone, A. Wierinckx, D. Palmieri, A. Ferraro, P. Cappabianca, G. Chiappetta, F. Forzati, G. Lombardi, A. Colao, J. Trouillas, M. Fedele and A. Fusco (2009). "HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas." Cancer Res **69**(5): 1844-1850.

Debelenko, L. V., A. R. Perez-Atayde, S. G. Dubois, H. E. Grier, S. Y. Pai, R. C. Shamberger and H. P. Kozakewich (2010). "p53+/mdm2- atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma in young children: an early expression of Li-Fraumeni syndrome." Pediatr Dev Pathol **13**(3): 218-224.

Deen, M., S. Ebrahim, D. Schloff and A. N. Mohamed (2013). "A novel PLAG1-RAD51L1 gene fusion resulting from a t(8;14)(q12;q24) in a case of lipoblastoma." Cancer Genet **206**(6): 233-237.

Dei Tos, A. P., C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Mentzel, M. Barbareschi, M. Boiocchi and C. D. Fletcher (1997). "Molecular abnormalities of the p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma." J Pathol **181**(1): 8-13.

Dei Tos, A. P., C. Doglioni, S. Piccinin, R. Sciot, A. Furlanetto, M. Boiocchi, P. Dal Cin, R. Maestro, C. D. Fletcher and G. Tallini (2000). "Coordinated expression and amplification of the MDM2, CDK4, and HMGI-C genes in atypical lipomatous tumours." J Pathol **190**(5): 531-536.

Delattre, O., J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, G. Rouleau and et al. (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." Nature **359**(6391): 162-165.

Dement, G. A., S. C. Maloney and R. Reeves (2007). "Nuclear HMGA1 nonhistone chromatin proteins directly influence mitochondrial transcription, maintenance, and function." Exp Cell Res **313**(1): 77-87.

DeSantis, C. E., C. C. Lin, A. B. Mariotto, R. L. Siegel, K. D. Stein, J. L. Kramer, R. Alteri, A. S. Robbins and A. Jemal (2014). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2014." CA Cancer J Clin **64**(4): 252-271.

Dickson, M. A., W. D. Tap, M. L. Keohan, S. P. D'Angelo, M. M. Gounder, C. R. Antonescu, J. Landa, L. X. Qin, D. D. Rathbone, M. M. Condy, Y. Ustoyev, A. M. Crago, S. Singer and G. K. Schwartz (2013). "Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma." J Clin Oncol **31**(16): 2024-2028.

Ding, X., Y. Wang, X. Ma, H. Guo, X. Yan, Q. Chi, J. Li, Y. Hou and C. Wang (2014). "Expression of HMGA2 in bladder cancer and its association with epithelial-to-mesenchymal transition." Cell Prolif **47**(2): 146-151.

Disney, J. E., K. R. Johnson, N. S. Magnuson, S. R. Sylvester and R. Reeves (1989). "High-mobility group protein HMG-I localizes to G/Q- and C-bands of human and mouse chromosomes." *J Cell Biol* **109**(5): 1975-1982.

Djian, P., A. K. Roncari and C. H. Hollenberg (1983). "Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture." *J Clin Invest* **72**(4): 1200-1208.

Donato, G., J. Martinez Hoyos, A. Amorosi, L. Maltese, A. Lavano, G. Volpentesta, F. Signorelli, F. Pentimalli, P. Pallante, G. Ferraro, L. Tucci, C. D. Signorelli, G. Viglietto and A. Fusco (2004). "High mobility group A1 expression correlates with the histological grade of human glial tumors." *Oncol Rep* **11**(6): 1209-1213.

Dooley, A. L., M. M. Winslow, D. Y. Chiang, S. Banerji, N. Stransky, T. L. Dayton, E. L. Snyder, S. Senna, C. A. Whittaker, R. T. Bronson, D. Crowley, J. Barretina, L. Garraway, M. Meyerson and T. Jacks (2011). "Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer." *Genes Dev* **25**(14): 1470-1475.

Downes, K. A., J. R. Goldblum, E. A. Montgomery and C. Fisher (2001). "Pleomorphic liposarcoma: a clinicopathologic analysis of 19 cases." *Mod Pathol* **14**(3): 179-184.

Dreux, N., M. Marty, F. Chibon, V. Velasco, I. Hostein, D. Ranchere-Vince, P. Terrier and J. M. Coindre (2010). "Value and limitation of immunohistochemical expression of HMGA2 in mesenchymal tumors: about a series of 1052 cases." *Mod Pathol*.

Dumollard, J. M., D. Ranchere-Vince, F. Burel, J. M. Coindre, G. Tallini, A. H. Ligon, R. Mayaud, C. Turc-Carel, C. Martin, J. F. Mosnier and F. Pedetour (2001). "[Spindle cell lipoma and 13q deletion: diagnostic utility of cytogenetic analysis]." *Ann Pathol* **21**(4): 303-310.

Elgar, F. and J. R. Goldblum (1997). "Well-differentiated liposarcoma of the retroperitoneum: a clinicopathologic analysis of 20 cases, with particular attention to the extent of low-grade dedifferentiation." *Mod Pathol* **10**(2): 113-120.

Esposito, F., G. M. Pierantoni, S. Battista, R. M. Melillo, S. Scala, P. Chieffi, M. Fedele and A. Fusco (2009). "Interaction between HMGA1 and retinoblastoma protein is required for adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **284**(38): 25993-26004.

Esposito, F., M. Tornincasa, A. Federico, G. Chiappetta, G. M. Pierantoni and A. Fusco (2012). "High-mobility group A1 protein inhibits p53-mediated intrinsic apoptosis by interacting with Bcl-2 at mitochondria." *Cell Death Dis* **3**: e383.

Evans, H. L., E. H. Soule and R. K. Winkelmann (1979). "Atypical lipoma, atypical intramuscular lipoma, and well differentiated retroperitoneal liposarcoma: a reappraisal of 30 cases formerly classified as well differentiated liposarcoma." *Cancer* **43**(2): 574-584.

Fanburg-Smith, J. C. and M. Miettinen (1998). "Liposarcoma with meningothelial-like whorls: a study of 17 cases of a distinctive histological pattern associated with dedifferentiated liposarcoma." *Histopathology* **33**(5): 414-424.

Fedele, M., A. Bandiera, G. Chiappetta, S. Battista, G. Viglietto, G. Manfioletti, A. Casamassimi, M. Santoro, V. Giancotti and A. Fusco (1996). "Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins." *Cancer Res* **56**(8): 1896-1901.

Fedele, M., S. Battista, L. Kenyon, G. Baldassarre, V. Fidanza, A. J. Klein-Szanto, A. F. Parlow, R. Visone, G. M. Pierantoni, E. Outwater, M. Santoro, C. M. Croce and A. Fusco (2002). "Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas." *Oncogene* **21**(20): 3190-3198.

Fedele, M., M. T. Berlingieri, S. Scala, L. Chiariotti, G. Viglietto, V. Rippel, J. Bullerdiek, M. Santoro and A. Fusco (1998). "Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts." *Oncogene* **17**(4): 413-418.

Fedele, M., V. Fidanza, S. Battista, F. Pentimalli, A. J. Klein-Szanto, R. Visone, I. De Martino, A. Curcio, C. Morisco, L. Del Vecchio, G. Baldassarre, C. Arra, G. Viglietto, C. Indolfi, C. M. Croce and A. Fusco (2006). "Haploinsufficiency of the Hmga1 gene causes cardiac hypertrophy and myelolymphoproliferative disorders in mice." *Cancer Res* **66**(5): 2536-2543.

Fedele, M., F. Pentimalli, G. Baldassarre, S. Battista, A. J. Klein-Szanto, L. Kenyon, R. Visone, I. De Martino, A. Ciarmiello, C. Arra, G. Viglietto, C. M. Croce and A. Fusco (2005). "Transgenic mice

overexpressing the wild-type form of the HMGA1 gene develop mixed growth hormone/prolactin cell pituitary adenomas and natural killer cell lymphomas." *Oncogene* **24**(21): 3427-3435.

Fedele, M., G. M. Pierantoni, M. T. Berlingieri, S. Battista, G. Baldassarre, N. Munshi, M. Dentice, D. Thanos, M. Santoro, G. Viglietto and A. Fusco (2001). "Overexpression of proteins HMGA1 induces cell cycle deregulation and apoptosis in normal rat thyroid cells." *Cancer Res* **61**(11): 4583-4590.

Fedele, M., G. M. Pierantoni, R. Visone and A. Fusco (2006). "E2F1 activation is responsible for pituitary adenomas induced by HMGA2 gene overexpression." *Cell Div* **1**: 17.

Federico, A., F. Forzati, F. Esposito, C. Arra, G. Palma, A. Barbieri, D. Palmieri, M. Fedele, G. M. Pierantoni, I. De Martino and A. Fusco (2014). "Hmga1/Hmga2 double knock-out mice display a "superpygmy" phenotype." *Biol Open* **3**(5): 372-378.

Finelli, P., G. M. Pierantoni, D. Giardino, M. Losa, O. Rodeschini, M. Fedele, E. Valtorta, P. Mortini, C. M. Croce, L. Larizza and A. Fusco (2002). "The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas." *Cancer Res* **62**(8): 2398-2405.

Fletcher, C. D., M. Akerman, P. Dal Cin, I. de Wever, N. Mandahl, F. Mertens, F. Mitelman, J. Rosai, A. Rydholm, R. Sciot, G. Tallini, H. van den Berghe, W. van de Ven, R. Vanni and H. Willen (1996). "Correlation between clinicopathological features and karyotype in lipomatous tumors. A report of 178 cases from the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Collaborative Study Group." *Am J Pathol* **148**(2): 623-630.

Fletcher D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W. and M. F. (2013). WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC): 19-44.

Flohr, A. M., P. Rogalla, U. Bonk, B. Puettmann, H. Buerger, G. Gohla, J. Packeisen, W. Wosniok, S. Loeschke and J. Bullerdiel (2003). "High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade." *Histol Histopathol* **18**(4): 999-1004.

Foa, C., C. Mainguene, F. Dupre, J. M. Coindre, C. Huguet, C. Kober and F. Pedetour (2002). "Rearrangement involving chromosomes 1 and 8 in a retroperitoneal lipoma." *Cancer Genet Cytogenet* **133**(2): 156-159.

Forus, A., B. Bjerkehagen, N. Sirvent, L. A. Meza-Zepeda, J. M. Coindre, J. M. Berner, O. Myklebost and F. Pedetour (2001). "A well-differentiated liposarcoma with a new type of chromosome 12-derived markers." *Cancer Genet Cytogenet* **131**(1): 13-18.

Forus, A., M. L. Larramendy, L. A. Meza-Zepeda, B. Bjerkehagen, L. H. Godager, A. B. Dahlberg, G. Saeter, S. Knuutila and O. Myklebost (2001). "Dedifferentiation of a well-differentiated liposarcoma to a highly malignant metastatic osteosarcoma: amplification of 12q14 at all stages and gain of 1q22-q24 associated with metastases." *Cancer Genet Cytogenet* **125**(2): 100-111.

Foti, D., E. Chiefari, M. Fedele, R. Iuliano, L. Brunetti, F. Paonessa, G. Manfioletti, F. Barbetti, A. Brunetti, C. M. Croce and A. Fusco (2005). "Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice." *Nat Med* **11**(7): 765-773.

Franco, R., F. Esposito, M. Fedele, G. Liguori, G. M. Pierantoni, G. Botti, D. Tramontano, A. Fusco and P. Chieffi (2008). "Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours." *J Pathol* **214**(1): 58-64.

Frasca, F., A. Rustighi, R. Malaguarnera, S. Altamura, P. Vigneri, G. Del Sal, V. Giancotti, V. Pezzino, R. Vigneri and G. Manfioletti (2006). "HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells." *Cancer Res* **66**(6): 2980-2989.

Fritz, B., F. Schubert, G. Wrobel, C. Schwaenen, S. Wessendorf, M. Nessling, C. Korz, R. J. Rieker, K. Montgomery, R. Kucherlapati, G. Mechttersheimer, R. Eils, S. Joos and P. Lichter (2002). "Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma." *Cancer Res* **62**(11): 2993-2998.

Furlong, M. A., J. C. Fanburg-Smith and M. Miettinen (2001). "The morphologic spectrum of hibernoma: a clinicopathologic study of 170 cases." *Am J Surg Pathol* **25**(6): 809-814.

Fusco, A. and M. Fedele (2007). "Roles of HMGA proteins in cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(12): 899-910.

Galea, L. A., A. J. Penington and W. A. Morrison (2009). "Post-traumatic pseudolipomas--a review and postulated mechanisms of their development." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **62**(6): 737-741.

Garsed, D. W., A. J. Holloway and D. M. Thomas (2009). "Cancer-associated neochromosomes: a novel mechanism of oncogenesis." *Bioessays* **31**(11): 1191-1200.

Garsed, D. W., O. J. Marshall, V. D. Corbin, A. Hsu, L. Di Stefano, J. Schroder, J. Li, Z. P. Feng, B. W. Kim, M. Kowarsky, B. Lansdell, R. Brookwell, O. Myklebost, L. Meza-Zepeda, A. J. Holloway, F. Pedetour, K. H. Choo, M. A. Damore, A. J. Deans, A. T. Papenfuss and D. M. Thomas (2014). "The architecture and evolution of cancer neochromosomes." *Cancer Cell* **26**(5): 653-667.

Gattas, G. J., B. J. Quade, R. A. Nowak and C. C. Morton (1999). "HMGIC expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata." *Genes Chromosomes Cancer* **25**(4): 316-322.

Gebhard, S., J. M. Coindre, J. J. Michels, P. Terrier, G. Bertrand, M. Trassard, S. Taylor, M. C. Chateau, B. Marques, V. Picot and L. Guillou (2002). "Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group." *Am J Surg Pathol* **26**(5): 601-616.

Geurts, J. M., E. F. Schoenmakers, E. Roijer, A. K. Astrom, G. Stenman and W. J. van de Ven (1998). "Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in." *Oncogene* **16**(7): 865-872.

Geurts, J. M., E. F. Schoenmakers, E. Roijer, A. K. Astrom, G. Stenman and W. J. van de Ven (1998). "Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas." *Oncogene* **16**(7): 865-872.

Geurts, J. M., E. F. Schoenmakers, E. Roijer, G. Stenman and W. J. Van de Ven (1997). "Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland." *Cancer Res* **57**(1): 13-17.

Geurts, J. M., E. F. Schoenmakers and W. J. Van de Ven (1997). "Molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in a pleomorphic salivary gland adenoma involving the 3'-UTR of HMGIC." *Cancer Genet Cytogenet* **95**(2): 198-205.

Giancotti, V., M. T. Berlingieri, P. P. DiFiore, A. Fusco, G. Vecchio and C. Crane-Robinson (1985). "Changes in nuclear proteins on transformation of rat epithelial thyroid cells by a murine sarcoma retrovirus." *Cancer Res* **45**(12 Pt 1): 6051-6057.

Giancotti, V., E. Buratti, L. Perissin, S. Zorzet, A. Balmain, G. Portella, A. Fusco and G. H. Goodwin (1989). "Analysis of the HMGI nuclear proteins in mouse neoplastic cells induced by different procedures." *Exp Cell Res* **184**(2): 538-545.

Giancotti, V., B. Pani, P. D'Andrea, M. T. Berlingieri, P. P. Di Fiore, A. Fusco, G. Vecchio, R. Philp, C. Crane-Robinson, R. H. Nicolas and et al. (1987). "Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by cotransfection with c-myc and polyoma middle T genes." *Embo j* **6**(7): 1981-1987.

Gisselsson, D., M. K. Hibbard, P. Dal Cin, R. Sciort, B. L. Hsi, H. P. Kozakewich and J. A. Fletcher (2001). "PLAG1 alterations in lipoblastoma: involvement in varied mesenchymal cell types and evidence for alternative oncogenic mechanisms." *Am J Pathol* **159**(3): 955-962.

Gisselsson, D., M. Hoglund, F. Mertens, P. Dal Cin and N. Mandahl (1999). "Hibernomas are characterized by homozygous deletions in the multiple endocrine neoplasia type I region. Metaphase fluorescence in situ hybridization reveals complex rearrangements not detected by conventional cytogenetics." *Am J Pathol* **155**(1): 61-66.

Gisselsson, D., M. Hoglund, F. Mertens, B. Johansson, P. Dal Cin, H. Van den Berghe, W. C. Earnshaw, F. Mitelman and N. Mandahl (1999). "The structure and dynamics of ring chromosomes in human neoplastic and non-neoplastic cells." *Hum Genet* **104**(4): 315-325.

Gisselsson, D., M. Hoglund, F. Mertens, F. Mitelman and N. Mandahl (1998). "Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in mesenchymal tumors detected by fluorescence in situ hybridization." *Genes Chromosomes Cancer* **23**(3): 203-212.

Gomez Garcia, E. B. and N. V. Knoers (2009). "Gardner's syndrome (familial adenomatous polyposis): a cilia-related disorder." *Lancet Oncol* **10**(7): 727-735.

Goransson, M., E. Elias, A. Stahlberg, A. Olofsson, C. Andersson and P. Aman (2005). "Myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncogene induces C/EBP beta-mediated interleukin 6 expression." *Int J Cancer* **115**(4): 556-560.

Gorbenko del Blanco, D., L. C. de Graaff, D. Posthouwer, T. J. Visser and A. C. Hokken-Koelega (2011). "Isolated GH deficiency: mutation screening and copy number analysis of HMGA2 and CDK6 genes." Eur J Endocrinol **165**(4): 537-544.

Greiss, M. E. and D. H. Williams (1991). "Macrodystrophia lipomatosis in the foot. A case report and review of the literature." Arch Orthop Trauma Surg **110**(4): 220-221.

Grimmett, G. M., M. G. Hall, Jr., C. C. Aird and L. H. Kurtz (1973). Pelvic lipomatosis. Am J Surg. United States. **125**: 347-349.

Guo, L., C. Chen, M. Shi, F. Wang, X. Chen, D. Diao, M. Hu, M. Yu, L. Qian and N. Guo (2013). "Stat3-coordinated Lin-28-let-7-HMGA2 and miR-200-ZEB1 circuits initiate and maintain oncostatin M-driven epithelial-mesenchymal transition." Oncogene **32**(45): 5272-5282.

Hameed, M. (2007). "Pathology and genetics of adipocytic tumors." Cytogenet Genome Res **118**(2-4): 138-147.

Han, W., E. M. Jung, J. Cho, J. W. Lee, K. T. Hwang, S. J. Yang, J. J. Kang, J. Y. Bae, Y. K. Jeon, I. A. Park, M. Nicolau, S. S. Jeffrey and D. Y. Noh (2008). "DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **47**(6): 490-499.

Haniball, J., V. P. Sumathi, L. G. Kindblom, A. Abudu, S. R. Carter, R. M. Tillman, L. Jeys, D. Spooner, D. Peake and R. J. Grimer (2011). "Prognostic factors and metastatic patterns in primary myxoid/round-cell liposarcoma." Sarcoma **2011**: 538085.

Harrer, M., H. Luhrs, M. Bustin, U. Scheer and R. Hock (2004). "Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3459-3471.

Hatano, H., T. Morita, A. Ogose, T. Hotta, H. Kobayashi, H. Segawa, T. Uchiyama, T. Takenouchi and T. Sato (2008). "Clinicopathological features of lipomas with gene fusions involving HMGA2." Anticancer Res **28**(1b): 535-538.

Hebert, C., K. Norris, M. A. Scheper, N. Nikitakis and J. J. Sauk (2007). "High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma." Mol Cancer **6**: 5.

Hedayati, V., K. Thway, J. M. Thomas and E. Moskovic (2014). "MEN1 Syndrome and Hibernoma: An Uncommonly Recognised Association?" Case Rep Med **2014**: 804580.

Heim, S., M. Nilbert, R. Vanni, U. M. Floderus, N. Mandahl, S. Liedgren, U. Lecca and F. Mitelman (1988). "A specific translocation, t(12;14)(q14-15;q23-24), characterizes a subgroup of uterine leiomyomas." Cancer Genet Cytogenet **32**(1): 13-17.

Hendriks, A. E., M. R. Brown, A. M. Boot, B. A. Oostra, S. L. Drop and J. S. Parks (2011). "Genetic variation in candidate genes like the HMGA2 gene in the extremely tall." Horm Res Paediatr **76**(5): 307-313.

Hennig, Y., P. Rogalla, S. Wanschura, G. Frey, U. Deichert, S. Bartnitzke and J. Bullerdiek (1997). "HMGIC expressed in a uterine leiomyoma with a deletion of the long arm of chromosome 7 along with a 12q14-15 rearrangement but not in tumors showing del(7) as the sole cytogenetic abnormality." Cancer Genet Cytogenet **96**(2): 129-133.

Hennig, Y., S. Wanschura, U. Deichert, S. Bartnitzke and J. Bullerdiek (1996). "Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps." Mol Hum Reprod **2**(4): 277-283.

Henricks, W. H., Y. C. Chu, J. R. Goldblum and S. W. Weiss (1997). "Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation." Am J Surg Pathol **21**(3): 271-281.

Hibbard, M. K., H. P. Kozakewich, P. Dal Cin, R. Sciot, X. Tan, S. Xiao and J. A. Fletcher (2000). "PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma." Cancer Res **60**(17): 4869-4872.

Himes, S. R., L. S. Coles, R. Reeves and M. F. Shannon (1996). "High mobility group protein I(Y) is required for function and for c-Rel binding to CD28 response elements within the GM-CSF and IL-2 promoters." Immunity **5**(5): 479-489.

Hirning-Folz, U., M. Wilda, V. Rippe, J. Bullerdiek and H. Hameister (1998). "The expression pattern of the Hmgic gene during development." Genes Chromosomes Cancer **23**(4): 350-357.

Hisaoka, M., S. Tsuji, Y. Morimitsu, H. Hashimoto, S. Shimajiri, S. Komiya and M. Ushijima (1999). "Molecular detection of EWS-FLI1 chimeric transcripts in Ewing family tumors by nested reverse

transcription-polymerase chain reaction: application to archival paraffin-embedded tumor tissues." *Applis* **107**(6): 577-584.

Hock, R., T. Furusawa, T. Ueda and M. Bustin (2007). "HMG chromosomal proteins in development and disease." *Trends Cell Biol* **17**(2): 72-79.

Hodge, J. C., T. C. K, K. L. Huyck, P. Somasundaram, C. I. Panhuysen, E. A. Stewart and C. C. Morton (2009). "Uterine leiomyomata and decreased height: a common HMGA2 predisposition allele." *Hum Genet* **125**(3): 257-263.

Holme, E., N. G. Larsson, A. Oldfors, M. Tulinius, P. Sahlin and G. Stenman (1993). "Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome." *Am J Hum Genet* **52**(3): 551-556.

Hornick, J. L., M. W. Bosenberg, T. Mentzel, M. E. McMenamin, A. M. Oliveira and C. D. Fletcher (2004). "Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic analysis of 57 cases." *Am J Surg Pathol* **28**(10): 1257-1267.

Horvai, A. E., S. DeVries, R. Roy, R. J. O'Donnell and F. Waldman (2009). "Similarity in genetic alterations between paired well-differentiated and dedifferentiated components of dedifferentiated liposarcoma." *Mod Pathol* **22**(11): 1477-1488.

Hostein, I., M. Pelmus, A. Aurias, F. Pedeutour, S. Mathoulin-Pelissier and J. M. Coindre (2004). "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." *J Pathol* **202**(1): 95-102.

Huang, D., J. Sumegi, P. Dal Cin, J. D. Reith, T. Yasuda, M. Nelson, D. Muirhead and J. A. Bridge (2010). "C11orf95-MKL2 is the resulting fusion oncogene of t(11;16)(q13;p13) in chondroid lipoma." *Genes Chromosomes Cancer* **49**(9): 810-818.

Huh, W. W., C. Yuen, M. Munsell, A. Hayes-Jordan, A. J. Lazar, S. Patel, W. L. Wang, N. Barahmani, M. F. Okcu, J. Hicks, L. Debelenko and S. L. Spunt (2011). "Liposarcoma in children and young adults: a multi-institutional experience." *Pediatr Blood Cancer* **57**(7): 1142-1146.

Idbaih, A., J. M. Coindre, J. Derre, O. Mariani, P. Terrier, D. Ranchere, A. Mairal and A. Aurias (2005). "Myxoid malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances." *Lab Invest* **85**(2): 176-181.

Italiano, A., L. Bianchini, E. Gjernes, F. Keslair, D. Ranchere-Vince, J. M. Dumollard, J. Haudebourg, A. Leroux, C. Mainguene, P. Terrier, F. Chibon, J. M. Coindre and F. Pedeutour (2009). "Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas." *Clin Cancer Res* **15**(18): 5696-5703.

Italiano, A., L. Bianchini, F. Keslair, S. Bonnafeous, N. Cardot-Leccia, J. M. Coindre, J. M. Dumollard, P. Hofman, A. Leroux, C. Mainguene, I. Peyrottes, D. Ranchere-Vince, P. Terrier, A. Tran, P. Gual and F. Pedeutour (2008). "HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon." *Int J Cancer* **122**(10): 2233-2241.

Italiano, A., N. Cardot, F. Dupre, I. Monticelli, F. Keslair, M. Piche, C. Mainguene, J. M. Coindre and F. Pedeutour (2007). "Gains and complex rearrangements of the 12q13-15 chromosomal region in ordinary lipomas: the "missing link" between lipomas and liposarcomas?" *Int J Cancer* **121**(2): 308-315.

Italiano, A., N. Ebran, R. Attias, A. Chevallier, I. Monticelli, C. Mainguene, D. Benchimol and F. Pedeutour (2008). "NFIB rearrangement in superficial, retroperitoneal, and colonic lipomas with aberrations involving chromosome band 9p22." *Genes Chromosomes Cancer* **47**(11): 971-977.

Italiano, A., A. Le Cesne, M. Pulido, N. Penel, S. Piperno-Neumann, C. Chevreau, F. Duffaud, O. Mir and B. B. Nguyen (2014). *Aplidine in patients with dedifferentiated liposarcomas: A French Sarcoma Group (FSG) study*. ASCO, Chicago.

Italiano, A., G. Maire, N. Sirvent, P. A. Nuin, F. Keslair, C. Foa, C. Louis, A. Aurias and F. Pedeutour (2009). "Variability of origin for the neocentromeric sequences in analphoid supernumerary marker chromosomes of well-differentiated liposarcomas." *Cancer Lett* **273**(2): 323-330.

Italiano, A., M. Toulmonde, A. Cioffi, N. Penel, N. Isambert, E. Bompas, F. Duffaud, A. Patrikidou, B. Lortal, A. Le Cesne, J. Y. Blay, R. G. Maki, G. K. Schwartz, C. R. Antonescu, S. Singer, J. M. Coindre and B. Bui (2012). "Advanced well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival." *Ann Oncol* **23**(6): 1601-1607.

Ito, M., L. Barys, T. O'Reilly, S. Young, B. Gorbacheva, J. Monahan, S. Zumstein-Mecker, P. F. Choong, I. Dickinson, P. Crowe, C. Hemmings, J. Desai, D. M. Thomas and J. Lisztwan (2011). "Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis." *Clin Cancer Res* **17**(3): 416-426.

Jaroszewski, D. E. and G. D. Petris (2013). "Giant hibernoma of the thoracic pleura and chest wall." *World J Clin Cases* **1**(4): 143-145.

Ji, Y. S., Q. Xu and J. F. Schmedtje, Jr. (1998). "Hypoxia induces high-mobility-group protein I(Y) and transcription of the cyclooxygenase-2 gene in human vascular endothelium." *Circ Res* **83**(3): 295-304.

Kandasamy, J., A. Smith, S. Diaz, B. Rose and C. O'Brien (2007). "Heterogeneity of PLAG1 gene rearrangements in pleomorphic adenoma." *Cancer Genet Cytogenet* **177**(1): 1-5.

Kazmierczak, B., J. Rosigkeit, S. Wanschura, K. Meyer-Bolte, W. J. Van de Ven, K. Kayser, B. Krieghoff, H. Kastendiek, S. Bartnitzke and J. Bullerdiek (1996). "HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors." *Oncogene* **12**(3): 515-521.

Kazmierczak, B., S. Wanschura, J. Rosigkeit, K. Meyer-Bolte, K. Uschinsky, R. Haupt, E. F. Schoenmakers, S. Bartnitzke, W. J. Van de Ven and J. Bullerdiek (1995). "Molecular characterization of 12q14-15 rearrangements in three pulmonary chondroid hamartomas." *Cancer Res* **55**(12): 2497-2499.

Keane, M. and J. P. de Magalhaes (2013). "MYCN/LIN28B/Let-7/HMGA2 pathway implicated by meta-analysis of GWAS in suppression of post-natal proliferation thereby potentially contributing to aging." *Mech Ageing Dev* **134**(7-8): 346-348.

Kidambi, T., M. J. Been and J. Maddalozzo (2012). "Congenital sialolipoma of the parotid gland: presentation, diagnosis, and management." *Am J Otolaryngol* **33**(2): 279-281.

Kim, H. P., J. Kelly and W. J. Leonard (2001). "The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements." *Immunity* **15**(1): 159-172.

Kim, J., R. Reeves, P. Rothman and M. Boothby (1995). "The non-histone chromosomal protein HMGI(Y) contributes to repression of the immunoglobulin heavy chain germ-line epsilon RNA promoter." *Eur J Immunol* **25**(3): 798-808.

Kim, S. J., J. W. Ryu and D. S. Choi (2000). "The expression of the high mobility group I(Y) mRNA in thyroid cancers: useful tool of differential diagnosis of thyroid nodules." *Korean J Intern Med* **15**(1): 71-75.

Kim, T. H., J. Y. Song, H. Park, J. Y. Jeong, A. Y. Kwon, J. H. Heo, H. Kang, G. Kim and H. J. An (2015). "miR-145, targeting high-mobility group A2, is a powerful predictor of patient outcome in ovarian carcinoma." *Cancer Lett* **356**(2 Pt B): 937-945.

Kirkby, B., N. Roman, B. Kobe, S. Kellie and J. K. Forwood (2010). "Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases." *Prog Lipid Res* **49**(4): 366-377.

Kirkland, J. L., C. H. Hollenberg and W. S. Gillon (1996). "Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes." *Int J Obes Relat Metab Disord* **20 Suppl 3**: S102-107.

Klein, F. A., M. J. Smith and I. Kasenetz (1988). "Pelvic lipomatosis: 35-year experience." *J Urol* **139**(5): 998-1001.

Klemke, M., M. H. Muller, W. Wosniok, D. N. Markowski, R. Nimzyk, B. M. Helmke and J. Bullerdiek (2014). "Correlated expression of HMGA2 and PLAG1 in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models." *PLoS One* **9**(2): e88126.

Klopstock, T., M. Naumann, B. Schalke, F. Bischof, P. Seibel, M. Kottlors, P. Eckert, K. Reiners, K. V. Toyka and H. Reichmann (1994). "Multiple symmetric lipomatosis: abnormalities in complex IV and multiple deletions in mitochondrial DNA." *Neurology* **44**(5): 862-866.

Klopstock, T., M. Naumann, P. Seibel, B. Shalke, K. Reiners and H. Reichmann (1997). "Mitochondrial DNA mutations in multiple symmetric lipomatosis." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 271-275.

Knight, J. C., P. J. Renwick, P. Dal Cin, H. Van den Berghe and C. D. Fletcher (1995). "Translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcoma and round cell liposarcoma: molecular and cytogenetic analysis." *Cancer Res* **55**(1): 24-27.

Kobayashi, J., M. Nagao, K. Miyamoto and S. Matsubara (2010). "MERRF syndrome presenting with multiple symmetric lipomatosis in a Japanese patient." *Intern Med* **49**(5): 479-482.

Kolb, S., R. Fritsch, D. Saur, M. Reichert, R. M. Schmid and G. Schneider (2007). "HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells." *Cancer Res* **67**(10): 4679-4686.

Kools, P. F. and W. J. Van de Ven (1996). "Amplification of a rearranged form of the high-mobility group protein gene HMGIC in OsA-Cl osteosarcoma cells." *Cancer Genet Cytogenet* **91**(1): 1-7.

Koukos, G., C. Polytarchou, J. L. Kaplan, A. Morley-Fletcher, B. Gras-Miralles, E. Kokkotou, M. Baril-Dore, C. Pothoulakis, H. S. Winter and D. Iliopoulos (2013). "MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis." *Gastroenterology* **145**(4): 842-852.e842.

Kumar, M. S., E. Armenteros-Monterroso, P. East, P. Chakravorty, N. Matthews, M. M. Winslow and J. Downward (2014). "HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression." *Nature* **505**(7482): 212-217.

Kumar, S., S. Pack, D. Kumar, R. Walker, M. Quezado, Z. Zhuang, P. Meltzer and M. Tsokos (1999). "Detection of EWS-FLI-1 fusion in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor by fluorescence in situ hybridization using formalin-fixed paraffin-embedded tissue." *Hum Pathol* **30**(3): 324-330.

Larsson, N. G., M. H. Tulinius, E. Holme and A. Oldfors (1995). "Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas." *Muscle Nerve Suppl* **3**: S102-106.

Lath, N., O. Familua, A. Adu and S. Oluwole (2011). "Massive abdominal wall hibernoma: case report and literature review of a rare soft-tissue tumor." *J Natl Med Assoc* **103**(4): 372-374.

Lee, C. T., T. T. Wu, C. M. Lohse and L. Zhang (2014). "High-mobility group AT-hook 2: an independent marker of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma." *Hum Pathol* **45**(11): 2334-2340.

Lee, C. T., L. Zhang, T. Mounajjed and T. T. Wu (2013). "High mobility group AT-hook 2 is overexpressed in hepatoblastoma." *Hum Pathol* **44**(5): 802-810.

Lee, Y. S. and A. Dutta (2007). "The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene." *Genes Dev* **21**(9): 1025-1030.

Lettre, G., A. U. Jackson, C. Gieger, F. R. Schumacher, S. I. Berndt, S. Sanna, S. Eyheramendy, B. F. Voight, J. L. Butler, C. Guiducci, T. Illig, R. Hackett, I. M. Heid, K. B. Jacobs, V. Lyssenko, M. Uda, M. Boehnke, S. J. Chanock, L. C. Groop, F. B. Hu, B. Isomaa, P. Kraft, L. Peltonen, V. Salomaa, D. Schlessinger, D. J. Hunter, R. B. Hayes, G. R. Abecasis, H. E. Wichmann, K. L. Mohlke and J. N. Hirschhorn (2008). "Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth." *Nat Genet* **40**(5): 584-591.

Li, A. Y., L. M. Boo, S. Y. Wang, H. H. Lin, C. C. Wang, Y. Yen, B. P. Chen, D. J. Chen and D. K. Ann (2009). "Suppression of nonhomologous end joining repair by overexpression of HMGA2." *Cancer Res* **69**(14): 5699-5706.

Li, J., L. Zeng, Y. Yang, Y. Zhan, J. Tao and B. Wu (2012). "Multiple endocrine neoplasia type 1-presenting multiple lipomas and hypoglycemia onset." *Am J Case Rep* **13**: 224-229.

Li, Y., J. Lu and E. V. Prochownik (2007). "Dual role for SUMO E2 conjugase Ubc9 in modulating the transforming and growth-promoting properties of the HMGA1b architectural transcription factor." *J Biol Chem* **282**(18): 13363-13371.

Li, Y., Z. Zhao, C. Xu, Z. Zhou, Z. Zhu and T. You (2014). "HMGA2 induces transcription factor Slug expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to colon cancer progression." *Cancer Lett* **355**(1): 130-140.

Ligon, A. H., S. D. Moore, M. A. Parisi, M. E. Mealiffe, D. J. Harris, H. L. Ferguson, B. J. Quade and C. C. Morton (2005). "Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas." *Am J Hum Genet* **76**(2): 340-348.

Liu, Q., T. Liu, S. Zheng, X. Gao, M. Lu, I. Sheyhidin and X. Lu (2014). "HMGA2 is down-regulated by microRNA let-7 and associated with epithelial-mesenchymal transition in oesophageal squamous cell carcinomas of Kazakhs." *Histopathology* **65**(3): 408-417.

Lucas, D. R., A. G. Nascimento, B. K. Sanjay and M. G. Rock (1994). "Well-differentiated liposarcoma. The Mayo Clinic experience with 58 cases." *Am J Clin Pathol* **102**(5): 677-683.

Luo, Y., W. Li and H. Liao (2013). "HMGA2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells." *Oncol Lett* **5**(4): 1353-1356.

Lynch, N. E., S. A. Lynch, J. McMenamin and D. Webb (2009). "Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome: a cause of extreme macrocephaly and neurodevelopmental delay." *Arch Dis Child* **94**(7): 553-554.

Ma, C., K. Nong, H. Zhu, W. Wang, X. Huang, Z. Yuan and K. Ai (2014). "H19 promotes pancreatic cancer metastasis by derepressing let-7's suppression on its target HMGA2-mediated EMT." *Tumour Biol* **35**(9): 9163-9169.

Macchia, G., K. H. Nord, M. Zoli, S. Purgato, P. D'Addabbo, C. W. Whelan, L. Carbone, G. Perini, F. Mertens, M. Rocchi and C. T. Storlazzi (2014). "Ring chromosomes, breakpoint clusters, and neocentromeres in sarcomas." *Genes Chromosomes Cancer*.

Mahajan, A., Z. Liu, L. Gellert, X. Zou, G. Yang, P. Lee, X. Yang and J. J. Wei (2010). "HMGA2: A biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma." *Mod Pathol*.

Mahajan, A., Z. Liu, L. Gellert, X. Zou, G. Yang, P. Lee, X. Yang and J. J. Wei (2010). "HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma." *Mod Pathol* **23**(5): 673-681.

Maire, G., A. Forus, C. Foa, B. Bjerkehagen, C. Mainguene, S. H. Kresse, O. Myklebost and F. Pedeutour (2003). "11q13 alterations in two cases of hibernoma: large heterozygous deletions and rearrangement breakpoints near GARP in 11q13.5." *Genes Chromosomes Cancer* **37**(4): 389-395.

Makvandi-Nejad, S., G. E. Hoffman, J. J. Allen, E. Chu, E. Gu, A. M. Chandler, A. I. Lored, R. R. Bellone, J. G. Mezey, S. A. Brooks and N. B. Sutter (2012). "Four loci explain 83% of size variation in the horse." *PLoS One* **7**(7): e39929.

Mandahl, N., H. Bartuma, L. Magnusson, M. Isaksson, G. Macchia and F. Mertens (2011). "HMGA2 and MDM2 expression in lipomatous tumors with partial, low-level amplification of sequences from the long arm of chromosome 12." *Cancer Genet* **204**(10): 550-556.

Mandahl, N., F. Mertens, H. Willen, A. Rydholm, A. Kreicbergs and F. Mitelman (1998). "Nonrandom pattern of telomeric associations in atypical lipomatous tumors with ring and giant marker chromosomes." *Cancer Genet Cytogenet* **103**(1): 25-34.

Mansueto, G., F. Forzati, A. Ferraro, P. Pallante, M. Bianco, F. Esposito, A. Iaccarino, G. Troncone and A. Fusco (2010). "Identification of a New Pathway for Tumor Progression: MicroRNA-181b Up-Regulation and CBX7 Down-Regulation by HMGA1 Protein." *Genes Cancer* **1**(3): 210-224.

Mantovani, F., S. Covaceuszach, A. Rustighi, R. Sgarra, C. Heath, G. H. Goodwin and G. Manfioletti (1998). "NF-kappaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C." *Nucleic Acids Res* **26**(6): 1433-1439.

Mao, L., K. J. Wertzler, S. C. Maloney, Z. Wang, N. S. Magnuson and R. Reeves (2009). "HMGA1 levels influence mitochondrial function and mitochondrial DNA repair efficiency." *Mol Cell Biol* **29**(20): 5426-5440.

Mao, X. G., M. Hutt-Cabezas, B. A. Orr, M. Weingart, I. Taylor, A. K. Rajan, Y. Odia, U. Kahlert, J. Maciaczyk, G. Nikkhah, C. G. Eberhart and E. H. Raabe (2013). "LIN28A facilitates the transformation of human neural stem cells and promotes glioblastoma tumorigenesis through a pro-invasive genetic program." *Oncotarget* **4**(7): 1050-1064.

Mariani, O., C. Brennetot, J. M. Coindre, N. Gruel, C. Ganem, O. Delattre, M. H. Stern and A. Aurias (2007). "JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in." *Cancer Cell* **11**(4): 361-374.

Mariani, O., C. Brennetot, J. M. Coindre, N. Gruel, C. Ganem, O. Delattre, M. H. Stern and A. Aurias (2007). "JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas." *Cancer Cell* **11**(4): 361-374.

Marino-Enriquez, A., C. D. Fletcher, P. Dal Cin and J. L. Hornick (2010). "Dedifferentiated liposarcoma with "homologous" lipoblastic (pleomorphic liposarcoma-like) differentiation: clinicopathologic and molecular analysis of a series suggesting revised diagnostic criteria." *Am J Surg Pathol* **34**(8): 1122-1131.

Marshall, O. J., A. C. Chueh, L. H. Wong and K. H. Choo (2008). "Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution." *Am J Hum Genet* **82**(2): 261-282.

Masciullo, V., G. Baldassarre, F. Pentimalli, M. T. Berlingieri, A. Boccia, G. Chiappetta, J. Palazzo, G. Manfioletti, V. Giancotti, G. Viglietto, G. Scambia and A. Fusco (2003). "HMGA1 protein overexpression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas." *Carcinogenesis* **24**(7): 1191-1198.

Mayr, C., M. T. Hemann and D. P. Bartel (2007). "Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation." *Science* **315**(5818): 1576-1579.

McCarthy, D. M., C. A. Dorr and C. E. Mackintosh (1969). "Unilateral localised gigantism of the extremities with lipomatosis, arthropathy and psoriasis." *J Bone Joint Surg Br* **51**(2): 348-353.

McCluggage, W. G., L. E. Connolly, H. A. McBride, S. Kalloger and C. B. Gilks (2012). "HMGA2 is commonly expressed in uterine serous carcinomas and is a useful adjunct to diagnosis." *Histopathology* **60**(4): 547-553.

McCormick, D., T. Mentzel, A. Beham and C. D. Fletcher (1994). "Dedifferentiated liposarcoma. Clinicopathologic analysis of 32 cases suggesting a better prognostic subgroup among pleomorphic sarcomas." *Am J Surg Pathol* **18**(12): 1213-1223.

Meis-Kindblom, J. M., H. Sjogren, L. G. Kindblom, A. Peydro-Mellquist, E. Roijer, P. Aman and G. Stenman (2001). "Cytogenetic and molecular genetic analyses of liposarcoma and its soft tissue simulators: recognition of new variants and differential diagnosis." *Virchows Arch* **439**(2): 141-151.

Melillo, R. M., G. M. Pierantoni, S. Scala, S. Battista, M. Fedele, A. Stella, M. C. De Biasio, G. Chiappetta, V. Fidanza, G. Condorelli, M. Santoro, C. M. Croce, G. Viglietto and A. Fusco (2001). "Critical role of the HMGI(Y) proteins in adipocytic cell growth and differentiation." *Mol Cell Biol* **21**(7): 2485-2495.

Merscher, S., I. Marondel, F. Pedetour, P. Gaudray, R. Kucherlapati and C. Turc-Carel (1997). "Identification of new translocation breakpoints at 12q13 in lipomas." *Genomics* **46**(1): 70-77.

Mertens, F., C. D. Fletcher, P. Dal Cin, I. De Wever, N. Mandahl, F. Mitelman, J. Rosai, A. Rydholm, R. Sciot, G. Tallini, H. Van den Berghe, R. Vanni and H. Willen (1998). "Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. Chromosomes and Morphology." *Genes Chromosomes Cancer* **22**(1): 16-25.

Mertens, F., A. Rydholm, O. Brosjo, H. Willen, F. Mitelman and N. Mandahl (1994). "Hibernomas are characterized by rearrangements of chromosome bands 11q13-21." *Int J Cancer* **58**(4): 503-505.

Meyer, B., S. Loeschke, A. Schultze, T. Weigel, M. Sandkamp, T. Goldmann, E. Vollmer and J. Bullerdiek (2007). "HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer." *Mol Carcinog* **46**(7): 503-511.

Meza-Zepeda, L. A., J. M. Berner, J. Henriksen, A. P. South, F. Pedetour, A. B. Dahlberg, L. H. Godager, D. Nizetic, A. Forus and O. Myklebost (2001). "Ectopic sequences from truncated HMGIc in liposarcomas are derived from various amplified chromosomal regions." *Genes Chromosomes Cancer* **31**(3): 264-273.

Miettinen, M. and F. M. Enzinger (1999). "Epithelioid variant of pleomorphic liposarcoma: a study of 12 cases of a distinctive variant of high-grade liposarcoma." *Mod Pathol* **12**(7): 722-728.

Mine, N., K. Kurose, H. Konishi, T. Araki, H. Nagai and M. Emi (2001). "Fusion of a sequence from HEI10 (14q11) to the HMGIc gene at 12q15 in a uterine leiomyoma." *Jpn J Cancer Res* **92**(2): 135-139.

Mine, N., K. Kurose, H. Nagai, D. Doi, Y. Ota, K. Yoneyama, H. Konishi, T. Araki and M. Emi (2001). "Gene fusion involving HMGC is a frequent aberration in uterine leiomyomas." *J Hum Genet* **46**(7): 408-412.

Miska, E. A., E. Alvarez-Saavedra, M. Townsend, A. Yoshii, N. Sestan, P. Rakic, M. Constantine-Paton and H. R. Horvitz (2004). "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." *Genome Biol* **5**(9): R68.

Miyai, K., M. R. Schwartz, M. K. Divatia, R. C. Anton, Y. W. Park, A. G. Ayala and J. Y. Ro (2014). "Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances." *World J Clin Cases* **2**(12): 732-741.

Miyazawa, J., A. Mitoro, S. Kawashiri, K. K. Chada and K. Imai (2004). "Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity." *Cancer Res* **64**(6): 2024-2029.

Monzen, K., Y. Ito, A. T. Naito, H. Kasai, Y. Hiroi, D. Hayashi, I. Shiojima, T. Yamazaki, K. Miyazono, M. Asashima, R. Nagai and I. Komuro (2008). "A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis." *Nat Cell Biol* **10**(5): 567-574.

Moreau, L. C., R. Turcotte, P. Ferguson, J. Wunder, P. Clarkson, B. Masri, M. Isler, N. Dion, J. Werier, M. Ghert and B. Deheshi (2012). "Myxoid\round cell liposarcoma (MRCLS) revisited: an analysis of 418 primarily managed cases." *Ann Surg Oncol* **19**(4): 1081-1088.

Morishita, A., M. R. Zaidi, A. Mitoro, D. Sankarasharma, M. Szabolcs, Y. Okada, J. D'Armiento and K. Chada (2013). "HMGA2 is a driver of tumor metastasis." *Cancer Res* **73**(14): 4289-4299.

Mu, G., H. Liu, F. Zhou, X. Xu, H. Jiang, Y. Wang and Y. Qu (2010). "Correlation of overexpression of HMGA1 and HMGA2 with poor tumor differentiation, invasion, and proliferation associated with let-7 down-regulation in retinoblastomas." *Hum Pathol* **41**(4): 493-502.

Muller, C. R., E. B. Paulsen, P. Noordhuis, F. Pedetour, G. Saeter and O. Myklebost (2007). "Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A." *Int J Cancer* **121**(1): 199-205.

Muller, S., L. Ronfani and M. E. Bianchi (2004). "Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function." *J Intern Med* **255**(3): 332-343.

Mussnich, P., D. D'Angelo, V. Leone, C. M. Croce and A. Fusco (2013). "The High Mobility Group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression." *Mol Oncol* **7**(3): 531-542.

Narita, M., V. Krizhanovsky, S. Nunez, A. Chicas, S. A. Hearn, M. P. Myers and S. W. Lowe (2006). "A novel role for high-mobility group proteins in cellular senescence and heterochromatin formation." *Cell* **126**(3): 503-514.

Nascimento, A. F., M. E. McMenamin and C. D. Fletcher (2002). "Liposarcomas/atypical lipomatous tumors of the oral cavity: a clinicopathologic study of 23 cases." *Ann Diagn Pathol* **6**(2): 83-93.

Nascimento, A. G., P. J. Kurtin, L. Guillou and C. D. Fletcher (1998). "Dedifferentiated liposarcoma: a report of nine cases with a peculiar neurallike whorling pattern associated with metaplastic bone formation." *Am J Surg Pathol* **22**(8): 945-955.

Natarajan, S., S. Hombach-Klonisch, P. Droge and T. Klonisch (2013). "HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-Chk1 signaling complex in human cancer cells." *Neoplasia* **15**(3): 263-280.

Naumann, M., R. Kiefer, K. V. Toyka, C. Sommer, P. Seibel and H. Reichmann (1997). "Mitochondrial dysfunction with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers point mutation in nerve, muscle, and adipose tissue of a patient with multiple symmetric lipomatosis." *Muscle Nerve* **20**(7): 833-839.

Nguyen, D., J. T. Turner, C. Olsen, L. G. Biesecker and T. N. Darling (2004). "Cutaneous manifestations of proteus syndrome: correlations with general clinical severity." *Arch Dermatol* **140**(8): 947-953.

Nie, K., T. Zhang, H. Allawi, M. Gomez, Y. Liu, A. Chadburn, Y. L. Wang, D. M. Knowles and W. Tam (2010). "Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: a potential role of the microRNA let-7." *Am J Pathol* **177**(3): 1470-1479.

Nilsson, M., F. Mertens, M. Hoglund, N. Mandahl and I. Panagopoulos (2006). "Truncation and fusion of HMGA2 in lipomas with rearrangements of 5q32-->q33 and 12q14-->q15." *Cytogenet Genome Res* **112**(1-2): 60-66.

Nilsson, M., I. Panagopoulos, F. Mertens and N. Mandahl (2005). "Fusion of the HMGA2 and NFIB genes in lipoma." *Virchows Arch* **447**(5): 855-858.

Nishino, J., I. Kim, K. Chada and S. J. Morrison (2008). "Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression." *Cell* **135**(2): 227-239.

Nissen, M. S. and R. Reeves (1995). "Changes in superhelicity are introduced into closed circular DNA by binding of high mobility group protein I/Y." *J Biol Chem* **270**(9): 4355-4360.

Nord, K. H., G. Macchia, J. Tayebwa, J. Nilsson, F. Vult von Steyern, O. Brosjo, N. Mandahl and F. Mertens (2014). "Integrative genome and transcriptome analyses reveal two distinct types of ring chromosome in soft tissue sarcomas." *Hum Mol Genet* **23**(4): 878-888.

Nord, K. H., L. Magnusson, M. Isaksson, J. Nilsson, H. Lilljebjorn, H. A. Domanski, L. G. Kindblom, N. Mandahl and F. Mertens (2010). "Concomitant deletions of tumor suppressor genes MEN1 and AIP are essential for the pathogenesis of the brown fat tumor hibernoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(49): 21122-21127.

Oda, Y., H. Yamamoto, T. Takahira, C. Kobayashi, K. Kawaguchi, N. Tateishi, Y. Nozuka, S. Tamiya, K. Tanaka, S. Matsuda, R. Yokoyama, Y. Iwamoto and M. Tsuneyoshi (2005). "Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis." *J Pathol* **207**(4): 410-421.

Odero, M. D., F. H. Grand, S. Iqbal, F. Ross, J. P. Roman, J. L. Vizmanos, J. Andrieux, J. L. Lai, M. J. Calasanz and N. C. Cross (2005). "Disruption and aberrant expression of HMGA2 as a consequence of diverse chromosomal translocations in myeloid malignancies." *Leukemia* **19**(2): 245-252.

Oliveira, A. M. and A. G. Nascimento (2001). "Pleomorphic liposarcoma." *Semin Diagn Pathol* **18**(4): 274-285.

Palmieri, D., T. Valentino, I. De Martino, F. Esposito, P. Cappabianca, A. Wierinckx, M. Vitiello, G. Lombardi, A. Colao, J. Trouillas, G. M. Pierantoni, A. Fusco and M. Fedele (2012). "PIT1 upregulation by HMGA proteins has a role in pituitary tumorigenesis." *Endocr Relat Cancer* **19**(2): 123-135.

Panagopoulos, I., M. Hoglund, F. Mertens, N. Mandahl, F. Mitelman and P. Aman (1996). "Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma." *Oncogene* **12**(3): 489-494.

Panagopoulos, I., N. Mandahl, D. Ron, M. Hoglund, M. Nilbert, F. Mertens, F. Mitelman and P. Aman (1994). "Characterization of the CHOP breakpoints and fusion transcripts in myxoid liposarcomas with the 12;16 translocation." *Cancer Res* **54**(24): 6500-6503.

Pasini, B., L. Matyakhina, T. Bei, M. Muchow, S. Boikos, B. Ferrando, J. A. Carney and C. A. Stratakis (2007). "Multiple gastrointestinal stromal and other tumors caused by platelet-derived growth factor receptor alpha gene mutations: a case associated with a germline V561D defect." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(9): 3728-3732.

Pedeutour, F., A. Deville, H. Steyaert, D. Ranchere-Vince, D. Ambrosetti and N. Sirvent (2012). "Rearrangement of HMGA2 in a case of infantile lipoblastoma without Plag1 alteration." *Pediatr Blood Cancer* **58**(5): 798-800.

Pedeutour, F., A. Forus, J. M. Coindre, J. M. Berner, G. Nicolo, J. F. Michiels, P. Terrier, D. Ranchere-Vince, F. Collin, O. Myklebost and C. Turc-Carel (1999). "Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors." *Genes Chromosomes Cancer* **24**(1): 30-41.

Pedeutour, F., S. Merscher, E. Durieux, K. Montgomery, K. Krauter, J. P. Cleve, G. Barcelo, R. Kucherlapati, P. Gaudray and C. Turc-Carel (1994). "Mapping of the 12q12-q22 region with respect to tumor translocation breakpoints." *Genomics* **22**(3): 512-518.

Pedeutour, F., R. F. Suijkerbuijk, A. Forus, J. Van Gaal, W. Van de Klundert, J. M. Coindre, G. Nicolo, F. Collin, U. Van Haelst, K. Huffermann and et al. (1994). "Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma." *Genes Chromosomes Cancer* **10**(2): 85-94.

Pedeutour, F., R. F. Suijkerbuijk, J. Van Gaal, W. Van de Klundert, J. M. Coindre, A. Van Haelst, F. Collin, K. Huffermann and C. Turc-Carel (1993). "Chromosome 12 origin in rings and giant markers in well-differentiated liposarcoma." *Cancer Genet Cytogenet* **66**(2): 133-134.

Pegoraro, S., G. Ros, S. Piazza, R. Sommaggio, Y. Ciani, A. Rosato, R. Sgarra, G. Del Sal and G. Manfioletti (2013). "HMGA1 promotes metastatic processes in basal-like breast cancer regulating EMT and stemness." *Oncotarget* **4**(8): 1293-1308.

Perez-Losada, J., B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, T. Flores, B. Banares-Gonzalez, J. C. del Campo, J. F. Martin-Martin, E. Battaner and I. Sanchez-Garcia (2000). "The chimeric FUS/TLS-CHOP fusion protein specifically induces liposarcomas in transgenic mice." *Oncogene* **19**(20): 2413-2422.

Perrella, M. A., A. Pellacani, P. Wiesel, M. T. Chin, L. C. Foster, M. Ibanez, C. M. Hsieh, R. Reeves, S. F. Yet and M. E. Lee (1999). "High mobility group-I(Y) protein facilitates nuclear factor-kappaB binding and transactivation of the inducible nitric-oxide synthase promoter/enhancer." *J Biol Chem* **274**(13): 9045-9052.

Persson, F., Y. Andren, M. Winnes, B. Wedell, A. Nordkvist, G. Gudnadottir, R. Dahlenfors, H. Sjogren, J. Mark and G. Stenman (2009). "High-resolution genomic profiling of adenomas and carcinomas of the salivary glands reveals amplification, rearrangement, and fusion of HMGA2." *Genes Chromosomes Cancer* **48**(1): 69-82.

Petit, M. M., R. Mols, E. F. Schoenmakers, N. Mandahl and W. J. Van de Ven (1996). "LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIc in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family." *Genomics* **36**(1): 118-129.

Petit, M. M., E. F. Schoenmakers, C. Huysmans, J. M. Geurts, N. Mandahl and W. J. Van de Ven (1999). "LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIc in a lipoma, is a member of a." *Genomics* **57**(3): 438-441.

Pierantoni, G. M., V. Agosti, M. Fedele, H. Bond, I. Caliendo, G. Chiappetta, F. Lo Coco, F. Pane, M. C. Turco, G. Morrone, S. Venuta and A. Fusco (2003). "High-mobility group A1 proteins are overexpressed in human leukaemias." *Biochem J* **372**(Pt 1): 145-150.

Pierantoni, G. M., S. Battista, F. Pentimalli, M. Fedele, R. Visone, A. Federico, M. Santoro, G. Viglietto and A. Fusco (2003). "A truncated HMGA1 gene induces proliferation of the 3T3-L1 pre-adipocytic cells: a model of human lipomas." *Carcinogenesis* **24**(12): 1861-1869.

Pierantoni, G. M., P. Finelli, E. Valtorta, D. Giardino, O. Rodeschini, F. Esposito, M. Losa, A. Fusco and L. Larizza (2005). "High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), even in the absence of chromosome 12 polysomy." *Endocr Relat Cancer* **12**(4): 867-874.

Pierron, A., C. Fernandez, E. Saada, F. Keslair, G. Hery, H. Zattara and F. Pedetour (2009). "HMGA2-NFIB fusion in a pediatric intramuscular lipoma: a novel case of NFIB alteration in a large deep-seated adipocytic tumor." *Cancer Genet Cytogenet* **195**(1): 66-70.

Pilotti, S., G. Della Torre, C. Lavarino, S. Di Palma, G. Sozzi, F. Minoletti, S. Rao, G. Pasquini, A. Azzarelli, F. Rilke and M. A. Pierotti (1997). "Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms." *J Pathol* **181**(1): 14-24.

Rabban, J. T., P. Dal Cin and E. Oliva (2006). "HMGA2 rearrangement in a case of vulvar aggressive angiosarcoma." *Int J Gynecol Pathol* **25**(4): 403-407.

Rabbitts, T. H., A. Forster, R. Larson and P. Nathan (1993). "Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma." *Nat Genet* **4**(2): 175-180.

Raskin, L., D. R. Fullen, T. J. Giordano, D. G. Thomas, M. L. Frohm, K. B. Cha, J. Ahn, B. Mukherjee, T. M. Johnson and S. B. Gruber (2013). "Transcriptome profiling identifies HMGA2 as a biomarker of melanoma progression and prognosis." *J Invest Dermatol* **133**(11): 2585-2592.

Ray-Coquard, I., J. Y. Blay, A. Italiano, A. Le Cesne, N. Penel, J. Zhi, F. Heil, R. Rueger, B. Graves, M. Ding, D. Geho, S. A. Middleton, L. T. Vassilev, G. L. Nichols and B. N. Bui (2012). "Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study." *Lancet Oncol* **13**(11): 1133-1140.

Reeves, R. (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function." *Gene* **277**(1-2): 63-81.

Reeves, R. and J. E. Adair (2005). "Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair." *DNA Repair (Amst)* **4**(8): 926-938.

Reeves, R., D. D. Edberg and Y. Li (2001). "Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells." *Mol Cell Biol* **21**(2): 575-594.

Rho, Y. S., Y. C. Lim, I. S. Park, J. H. Kim, H. Y. Ahn, S. J. Cho and H. S. Shin (2007). "High mobility group HMGI(Y) protein expression in head and neck squamous cell carcinoma." Acta Otolaryngol **127**(1): 76-81.

Rice, K. L., X. Lin, K. Wolniak, B. L. Ebert, W. Berkofsky-Fessler, M. Buzzai, Y. Sun, C. Xi, P. Elkin, R. Levine, T. Golub, D. G. Gilliland, J. D. Crispino, J. D. Licht and W. Zhang (2011). "Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms." Blood Cancer J **1**(11): e40.

Rieker, R. J., S. Joos, C. Bartsch, F. Willeke, M. Schwarzbach, M. Otano-Joos, S. Ohl, J. Hogel, T. Lehnert, P. Lichter, H. F. Otto and G. Mechttersheimer (2002). "Distinct chromosomal imbalances in pleomorphic and in high-grade dedifferentiated liposarcomas." Int J Cancer **99**(1): 68-73.

Rogalla, P., K. Drechsler, G. Frey, Y. Hennig, B. Helmke, U. Bonk and J. Bullerdiek (1996). "HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors." Am J Pathol **149**(3): 775-779.

Rogalla, P., B. Kazmierczak, K. Meyer-Bolte, K. H. Tran and J. Bullerdiek (1998). "The t(3;12)(q27;q14-q15) with underlying HMGIC-LPP fusion is not determining an." Genes Chromosomes Cancer **22**(2): 100-104.

Roijer, E., A. Nordkvist, A. K. Strom, W. Ryd, M. Behrendt, J. Bullerdiek, J. Mark and G. Stenman (2002). "Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma." Am J Pathol **160**(2): 433-440.

Romero-Perez, L., M. A. Castilla, M. A. Lopez-Garcia, J. Diaz-Martin, M. Biscuola, S. Ramiro-Fuentes, E. Oliva, X. Matias-Guiu, J. Prat, A. Cano, G. Moreno-Bueno and J. Palacios (2013). "Molecular events in endometrial carcinosarcomas and the role of high mobility group AT-hook 2 in endometrial carcinogenesis." Hum Pathol **44**(2): 244-254.

Rommel, B., P. Rogalla, A. Jox, C. V. Kalle, B. Kazmierczak, J. Wolf and J. Bullerdiek (1997). "HMGI-C, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells." Leuk Lymphoma **26**(5-6): 603-607.

Ronan, S. J. and T. Broderick (2000). "Minimally invasive approach to familial multiple lipomatosis." Plast Reconstr Surg **106**(4): 878-880.

Rusconi, D., E. Valtorta, O. Rodeschini, D. Giardino, I. Lorenzo, B. Predieri, M. Losa, L. Larizza and P. Finelli (2011). "Combined characterization of a pituitary adenoma and a subcutaneous lipoma in a MEN1 patient with a whole gene deletion." Cancer Genet **204**(6): 309-315.

Salam, G. A. (2002). "Lipoma excision." Am Fam Physician **65**(5): 901-904.

Sandberg, A. A. (2004). "Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma." Cancer Genet Cytogenet **155**(1): 1-24.

Sanna, S., A. U. Jackson, R. Nagaraja, C. J. Willer, W. M. Chen, L. L. Bonnycastle, H. Shen, N. Timpson, G. Lettre, G. Usala, P. S. Chines, H. M. Stringham, L. J. Scott, M. Dei, S. Lai, G. Albai, L. Crisponi, S. Naitza, K. F. Doheny, E. W. Pugh, Y. Ben-Shlomo, S. Ebrahim, D. A. Lawlor, R. N. Bergman, R. M. Watanabe, M. Uda, J. Tuomilehto, J. Coresh, J. N. Hirschhorn, A. R. Shuldiner, D. Schlessinger, F. S. Collins, G. Davey Smith, E. Boerwinkle, A. Cao, M. Boehnke, G. R. Abecasis and K. L. Mohlke (2008). "Common variants in the GDF5-UQCC region are associated with variation in human height." Nat Genet **40**(2): 198-203.

Sarhadi, V. K., H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila and S. Anttila (2006). "Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer." J Pathol **209**(2): 206-212.

Scala, S., G. Portella, M. Fedele, G. Chiappetta and A. Fusco (2000). "Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4256-4261.

Schmidt, H., F. Bartel, M. Kappler, P. Wurl, H. Lange, M. Bache, H. J. Holzhausen and H. Taubert (2005). "Gains of 13q are correlated with a poor prognosis in liposarcoma." Mod Pathol **18**(5): 638-644.

Schneider-Stock, R., H. Walter, K. Radig, J. Rys, A. Bosse, C. Kuhnen, C. Hoang-Vu and A. Roessner (1998). "MDM2 amplification and loss of heterozygosity at Rb and p53 genes: no simultaneous alterations in the oncogenesis of liposarcomas." *J Cancer Res Clin Oncol* **124**(10): 532-540.

Schoenmakers, E. F., C. Huysmans and W. J. Van de Ven (1999). "Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas." *Cancer Res* **59**(1): 19-23.

Schoenmakers, E. F., S. Wanschura, R. Mols, J. Bullerdiek, H. Van den Berghe and W. J. Van de Ven (1995). "Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours." *Nat Genet* **10**(4): 436-444.

Sgarra, R., E. Maurizio, S. Zammitti, A. Lo Sardo, V. Giancotti and G. Manfioletti (2009). "Macroscopic differences in HMGA oncoproteins post-translational modifications: C-terminal phosphorylation of HMGA2 affects its DNA binding properties." *J Proteome Res* **8**(6): 2978-2989.

Shadan, F. F., J. T. Mascarello, R. O. Newbury, T. Dennis, P. Spallone and A. D. Stock (2000). "Supernumerary ring chromosomes derived from the long arm of chromosome 12 as the primary cytogenetic anomaly in a rare soft tissue chondroma." *Cancer Genet Cytogenet* **118**(2): 144-147.

Shi, G., M. A. Perle, K. Mittal, H. Chen, X. Zou, M. Narita, E. Hernando, P. Lee and J. J. Wei (2009). "Let-7 repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma." *J Cell Mol Med* **13**(9B): 3898-3905.

Shi, X., B. Tian, L. Liu, Y. Gao, C. Ma, N. Mwichie, W. Ma, L. Han, B. Huang, J. Lu and Y. Zhang (2013). "Rb protein is essential to the senescence-associated heterochromatic foci formation induced by HMGA2 in primary WI38 cells." *J Genet Genomics* **40**(8): 391-398.

Shi, X., B. Tian, W. L. Ma, N. Zhang, Y. H. Qiao, X. X. Li, Y. Zhang, B. Huang and J. Lu (2014). "A novel anti-proliferative role of HMGA2 in induction of apoptosis through Caspase-2 in primary human fibroblast cells." *Biosci Rep*.

Simon, M. F., A. Rey, I. Castan-Laurel, S. Gres, D. Sibrac, P. Valet and J. S. Saulnier-Blache (2002). "Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and." *J Biol Chem* **277**(26): 23131-23136.

Singer, S., N. D. Socci, G. Ambrosini, E. Sambol, P. Decarolis, Y. Wu, R. O'Connor, R. Maki, A. Viale, C. Sander, G. K. Schwartz and C. R. Antonescu (2007). "Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma." *Cancer Res* **67**(14): 6626-6636.

Sirvent, N., J. M. Coindre, G. Maire, I. Hostein, F. Keslair, L. Guillou, D. Ranchere-Vince, P. Terrier and F. Pedeutour (2007). "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* **31**(10): 1476-1489.

Sirvent, N., A. Forus, W. Lescaut, F. Burel, S. Benzaken, M. Chazal, A. Bourgeon, J. R. Vermeesch, O. Myklebost, C. Turc-Carel, N. Ayraud, J. M. Coindre and F. Pedeutour (2000). "Characterization of centromere alterations in liposarcomas." *Genes Chromosomes Cancer* **29**(2): 117-129.

Smeti, I., I. Watabe, E. Savary, A. Fontbonne and A. Zine (2014). "HMGA2, the architectural transcription factor high mobility group, is expressed in the developing and mature mouse cochlea." *PLoS One* **9**(2): e88757.

Smith, C. S., J. Teruya-Feldstein, J. F. Caravelli and H. W. Yeung (2008). "False-positive findings on 18F-FDG PET/CT: differentiation of hibernoma and malignant fatty tumor on the basis of fluctuating standardized uptake values." *AJR Am J Roentgenol* **190**(4): 1091-1096.

Snyder, E. L., D. J. Sandstrom, K. Law, C. Fiore, E. Sicinska, J. Brito, D. Bailey, J. A. Fletcher, M. Loda, S. J. Rodig, P. Dal Cin and C. D. Fletcher (2009). "c-Jun amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme." *J Pathol* **218**(3): 292-300.

Sreekantaiah, C., C. P. Karakousis, S. P. Leong and A. A. Sandberg (1992). "Cytogenetic findings in liposarcoma correlate with histopathologic subtypes." *Cancer* **69**(10): 2484-2495.

Sreekantaiah, C., S. P. Leong, C. P. Karakousis, D. L. McGee, W. D. Rappaport, H. V. Villar, D. Neal, S. Fleming, A. Wankel, P. N. Herrington and et al. (1991). "Cytogenetic profile of 109 lipomas." Cancer Res **51**(1): 422-433.

Staats, B., U. Bonk, S. Wanschura, P. Hanisch, E. F. Schoenmakers, W. J. Van de Ven, S. Bartnitzke and J. Bullerdiel (1996). "A fibroadenoma with a t(4;12) (q27;q15) affecting the HMGI-C gene, a member of the high mobility group protein gene family." Breast Cancer Res Treat **38**(3): 299-303.

Stenman, G. (2013). "Fusion oncogenes in salivary gland tumors: molecular and clinical consequences." Head Neck Pathol **7 Suppl 1**: S12-19.

Sterenczak, K. A., A. Eckardt, A. Kampmann, S. Willenbrock, N. Eberle, F. Langer, S. Kleinschmidt, M. Hewicker-Trautwein, H. Kreipe, I. Nolte, H. Murua Escobar and N. C. Gellrich (2014). "HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin28 and let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma." BMC Cancer **14**: 694.

Storlazzi, C. T., F. Mertens, H. Domanski, C. D. Fletcher, J. Wiegant and N. Mandahl (2003). "Ring chromosomes and low-grade gene amplification in an atypical lipomatous tumor with minimal nuclear atypia." Int J Oncol **23**(1): 67-71.

Subramanian, D. and J. D. Griffith (2002). "Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases." Nucleic Acids Res **30**(11): 2427-2434.

Suh, S. S., J. Y. Yoo, R. Cui, B. Kaur, K. Huebner, T. K. Lee, R. I. Aqeilan and C. M. Croce (2014). "FHIT Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis in Lung Cancer through Modulation of MicroRNAs." PLoS Genet **10**(10): e1004652.

Sun, M., C. X. Song, H. Huang, C. A. Frankenberger, D. Sankarasharma, S. Gomes, P. Chen, J. Chen, K. K. Chada, C. He and M. R. Rosner (2013). "HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(24): 9920-9925.

Sun, T., M. Fu, A. L. Bookout, S. A. Klierer and D. J. Mangelsdorf (2009). "MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis." Mol Endocrinol **23**(6): 925-931.

Szymanska, J., M. Tarkkanen, T. Wiklund, M. Virolainen, C. Blomqvist, S. Asko-Seljavaara, E. Tukiainen, I. Elomaa and S. Knuutila (1996). "Gains and losses of DNA sequences in liposarcomas evaluated by comparative genomic hybridization." Genes Chromosomes Cancer **15**(2): 89-94.

Tallini, G., R. Vanni, G. Manfioletti, B. Kazmierczak, G. Faa, P. Pauwels, J. Bullerdiel, V. Giancotti, H. Van Den Berghe and P. Dal Cin (2000). "HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes." Lab Invest **80**(3): 359-369.

Tan, E. J., S. Thuault, L. Caja, T. Carletti, C. H. Heldin and A. Moustakas (2012). "Regulation of transcription factor Twist expression by the DNA architectural protein high mobility group A2 during epithelial-to-mesenchymal transition." J Biol Chem **287**(10): 7134-7145.

Tanyi, J. L., A. J. Morris, J. K. Wolf, X. Fang, Y. Hasegawa, R. Lapushin, N. Auersperg, Y. J. Sigal, R. A. Newman, E. A. Felix, E. N. Atkinson and G. B. Mills (2003). "The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer." Cancer Res **63**(5): 1073-1082.

Taylor, B. S., J. Barretina, N. D. Socci, P. Decarolis, M. Ladanyi, M. Meyerson, S. Singer and C. Sander (2008). "Functional copy-number alterations in cancer." PLoS One **3**(9): e3179.

Taylor, B. S., P. L. DeCarolis, C. V. Angeles, F. Brenet, N. Schultz, C. R. Antonescu, J. M. Scandura, C. Sander, A. J. Viale, N. D. Socci and S. Singer (2011). "Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas." Cancer Discov **1**(7): 587-597.

Tessari, M. A., M. Gostissa, S. Altamura, R. Sgarra, A. Rustighi, C. Salvagno, G. Caretti, C. Imbriano, R. Mantovani, G. Del Sal, V. Giancotti and G. Manfioletti (2003). "Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2." Mol Cell Biol **23**(24): 9104-9116.

Thakker, R. V., P. J. Newey, G. V. Walls, J. Bilezikian, H. Dralle, P. R. Ebeling, S. Melmed, A. Sakurai, F. Tonelli and M. L. Brandi (2012). "Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)." J Clin Endocrinol Metab **97**(9): 2990-3011.

Thomas, G. P., K. Hemmrich, K. M. Abberton, D. McCombe, A. J. Penington, E. W. Thompson and W. A. Morrison (2008). "Zymosan-induced inflammation stimulates neo-adipogenesis." Int J Obes (Lond) **32**(2): 239-248.

Thuaud, S., U. Valcourt, M. Petersen, G. Manfioletti, C. H. Heldin and A. Moustakas (2006). "Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition." J Cell Biol **174**(2): 175-183.

Tichomirowa, M. A., A. F. Daly and A. Beckers (2009). "Familial pituitary adenomas." J Intern Med **266**(1): 5-18.

Torres-Martin, M., C. Pena-Granero, F. Carceller, M. Gutierrez, R. R. Burbano, G. R. Pinto, J. S. Castresana, B. Melendez and J. A. Rey (2014). "Homozygous deletion of TNFRSF4, TP73, PPAP2B and DPYD at 1p and PDCD5 at 19q identified by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis in pediatric anaplastic glioma with questionable oligodendroglial component." Mol Cytogenet **7**(1): 1.

Toulmonde, M., S. Bonvalot, P. Meeus, E. Stoeckle, O. Riou, N. Isambert, E. Bompas, M. Jafari, C. Delcambre-Lair, E. Saada, A. Le Cesne, C. Le Pechoux, J. Y. Blay, S. Piperno-Neumann, C. Chevreau, J. O. Bay, V. Brouste, P. Terrier, D. Ranchere-Vince, A. Neuville and A. Italiano (2014). "Retroperitoneal sarcomas: patterns of care at diagnosis, prognostic factors and focus on main histological subtypes: a multicenter analysis of the French Sarcoma Group." Ann Oncol **25**(3): 735-742.

Touqan, N., C. P. Diggle, E. T. Verghese, S. Perry, K. Horgan, W. Merchant, R. Anwar, A. F. Markham, I. M. Carr and R. Achuthan (2013). "An observational study on the expression levels of MDM2 and MDMX proteins, and associated effects on P53 in a series of human liposarcomas." BMC Clin Pathol **13**(1): 32.

Tummala, R., N. Nadiminty, W. Lou, Y. Zhu, R. Gandour-Edwards, H. W. Chen, C. P. Evans and A. C. Gao (2013). "Lin28 promotes growth of prostate cancer cells and activates the androgen receptor." Am J Pathol **183**(1): 288-295.

Turc-Carel, C., J. Limon, P. Dal Cin, U. Rao, C. Karakousis and A. A. Sandberg (1986). "Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas." Cancer Genet Cytogenet **23**(4): 291-299.

Turc-Carel, C., I. Philip, M. P. Berger, T. Philip and G. M. Lenoir (1984). "Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12)." Cancer Genet Cytogenet **12**(1): 1-19.

Vallone, D., S. Battista, G. M. Pierantoni, M. Fedele, L. Casalino, M. Santoro, G. Viglietto, A. Fusco and P. Verde (1997). "Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product." EMBO J **16**(17): 5310-5321.

Vantyghem, M. C., A. S. Balavoine, C. Douillard, F. Defrance, L. Dieudonne, F. Mouton, C. Lemaire, N. Bertrand-Escoufflaire, M. F. Bourdelle-Hego, F. Devemy, A. Evrard, D. Gheerbrand, C. Girardot, S. Gumuche, C. Hober, H. Topolinski, B. Lamblin, B. Mycinski, A. Ryndak, W. Karrouz, E. Duvivier, E. Merlen, C. Cortet, J. Weill, D. Lacroix and J. L. Wemeau (2012). "How to diagnose a lipodystrophy syndrome." Ann Endocrinol (Paris) **73**(3): 170-189.

Vashi, N., R. Hunt, M. Fischer, S. Meehan and M. K. Pomeranz (2012). "Angiofibromas in multiple endocrine neoplasia type 1." Dermatol Online J **18**(12): 20.

Waki, H., M. Nakamura, T. Yamauchi, K. Wakabayashi, J. Yu, L. Hirose-Yotsuya, K. Take, W. Sun, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, T. Fujita, T. Aoyama, S. Tsutsumi, K. Ueki, T. Kodama, J. Sakai, H. Aburatani and T. Kadowaki (2011). "Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the." PLoS Genet **7**(10): e1002311.

Walter, T. A., S. X. Fan, M. T. Medchill, C. S. Berger, H. J. Decker and A. A. Sandberg (1989). "inv(12)(p11.2q13) in an endometrial polyp." Cancer Genet Cytogenet **41**(1): 99-103.

Wang, E. L., Z. R. Qian, M. M. Rahman, K. Yoshimoto, S. Yamada, E. Kudo and T. Sano (2010). "Increased expression of HMGA1 correlates with tumour invasiveness and proliferation in human pituitary adenomas." Histopathology **56**(4): 501-509.

Wang, T., X. Zhang, L. Obijuru, J. Laser, V. Aris, P. Lee, K. Mittal, P. Soteropoulos and J. J. Wei (2007). "A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas." *Genes Chromosomes Cancer* **46**(4): 336-347.

Wang, X., Y. W. Asmann, M. R. Erickson-Johnson, J. L. Oliveira, H. Zhang, R. D. Moura, A. J. Lazar, D. Lev, K. Bill, R. V. Lloyd, M. J. Yaszemski, A. Maran and A. M. Oliveira (2011). "High-resolution genomic mapping reveals consistent amplification of the fibroblast growth factor receptor substrate 2 gene in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma." *Genes Chromosomes Cancer* **50**(11): 849-858.

Wang, X., R. Q. Zamolyi, H. Zhang, V. L. Pannain, F. Medeiros, M. Erickson-Johnson, R. B. Jenkins and A. M. Oliveira (2010). "Fusion of HMGA1 to the LPP/TPRG1 intergenic region in a lipoma identified by mapping paraffin-embedded tissues." *Cancer Genet Cytogenet* **196**(1): 64-67.

Wanschura, S., P. Dal Cin, B. Kazmierczak, S. Bartnitzke, H. Van den Berghe and J. Bullerdiek (1997). "Hidden paracentric inversions of chromosome arm 12q affecting the HMGIc gene." *Genes Chromosomes Cancer* **18**(4): 322-323.

Watanabe, S., Y. Ueda, S. Akaboshi, Y. Hino, Y. Sekita and M. Nakao (2009). "HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells." *Am J Pathol* **174**(3): 854-868.

Weedon, M. N., H. Lango, C. M. Lindgren, C. Wallace, D. M. Evans, M. Mangino, R. M. Freathy, J. R. Perry, S. Stevens, A. S. Hall, N. J. Samani, B. Shields, I. Prokopenko, M. Farrall, A. Dominiczak, T. Johnson, S. Bergmann, J. S. Beckmann, P. Vollenweider, D. M. Waterworth, V. Mooser, C. N. Palmer, A. D. Morris, W. H. Ouwehand, J. H. Zhao, S. Li, R. J. Loos, I. Barroso, P. Deloukas, M. S. Sandhu, E. Wheeler, N. Soranzo, M. Inouye, N. J. Wareham, M. Caulfield, P. B. Munroe, A. T. Hattersley, M. I. McCarthy and T. M. Frayling (2008). "Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height." *Nat Genet* **40**(5): 575-583.

Weedon, M. N., G. Lettre, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, B. F. Voight, J. R. Perry, K. S. Elliott, R. Hackett, C. Guiducci, B. Shields, E. Zeggini, H. Lango, V. Lyssenko, N. J. Timpson, N. P. Burt, N. W. Rayner, R. Saxena, K. Ardlie, J. H. Tobias, A. R. Ness, S. M. Ring, C. N. Palmer, A. D. Morris, L. Peltonen, V. Salomaa, G. Davey Smith, L. C. Groop, A. T. Hattersley, M. I. McCarthy, J. N. Hirschhorn and T. M. Frayling (2007). "A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population." *Nat Genet* **39**(10): 1245-1250.

Wei, G., F. Lonardo, T. Ueda, T. Kim, A. G. Huvos, J. H. Healey and M. Ladanyi (1999). "CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons." *Int J Cancer* **80**(2): 199-204.

Wei, J., H. Li, S. Wang, T. Li, J. Fan, X. Liang, J. Li, Q. Han, L. Zhu, L. Fan and R. C. Zhao (2014). "let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2." *Stem Cells Dev* **23**(13): 1452-1463.

Weiss, E. a. Soft tissue tumors: pages 681-702.

Weiss, S. W. and V. K. Rao (1992). "Well-differentiated liposarcoma (atypical lipoma) of deep soft tissue of the extremities, retroperitoneum, and miscellaneous sites. A follow-up study of 92 cases with analysis of the incidence of "dedifferentiation"." *Am J Surg Pathol* **16**(11): 1051-1058.

Woo, K. I. and J. W. Harbour (2010). "Review of 676 second primary tumors in patients with retinoblastoma: association between age at onset and tumor type." *Arch Ophthalmol* **128**(7): 865-870.

Wood, L. J., J. F. Maher, T. E. Bunton and L. M. Resar (2000). "The oncogenic properties of the HMGI gene family." *Cancer Res* **60**(15): 4256-4261.

Wu, J., Z. Liu, C. Shao, Y. Gong, E. Hernando, P. Lee, M. Narita, W. Muller, J. Liu and J. J. Wei (2011). "HMGA2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes." *Cancer Res* **71**(2): 349-359.

Xu, X., B. Ayub, Z. Liu, V. A. Serna, W. Qiang, Y. Liu, E. Hernando, S. Zabludoff, T. Kurita, B. Kong and J. J. Wei (2014). "Anti-miR182 reduces ovarian cancer burden, invasion, and metastasis: an in vivo study in orthotopic xenografts of nude mice." *Mol Cancer Ther* **13**(7): 1729-1739.

Yang, M. Y., M. T. Chen, P. I. Huang, C. Y. Wang, Y. C. Chang, Y. P. Yang, W. L. Lo, W. H. Sung, Y. W. Liao, Y. Y. Lee, Y. L. Chang, L. M. Tseng, Y. W. Chen and H. I. Ma (2014). "Nuclear Localization Signal-

enhanced Polyurethane-Short Branch Polyethylenimine-mediated Delivery of Let-7a Inhibited Cancer Stem-like Properties by Targeting the 3'UTR of HMGA2 in Anaplastic Astrocytoma." Cell Transplant.

Yang, T. L., Y. Guo, L. S. Zhang, Q. Tian, H. Yan, Y. F. Guo and H. W. Deng (2010). "HMGA2 is confirmed to be associated with human adult height." Ann Hum Genet **74**(1): 11-16.

Yee, J. K., S. A. Phillips, K. Allamehzadeh and K. L. Herbst (2012). "Subcutaneous adipose tissue fatty acid desaturation in adults with and without rare adipose disorders." Lipids Health Dis **11**: 19.

Yongjun Zhang, M. M., A. Zhang, M. M. Hua Shi and M. M. Xiangming Kong (2013). "Association between TGM5, PPAP2B and PSMA4 polymorphisms and NSCLC in never-smoking Chinese population." J Cancer Res Ther **9**(4): 660-663.

Yoshida, H., M. Miyachi, K. Ouchi, Y. Kuwahara, K. Tsuchiya, T. Iehara, E. Konishi, A. Yanagisawa and H. Hosoi (2014). "Identification of COL3A1 and RAB2A as novel translocation partner genes of PLAG1 in lipoblastoma." Genes Chromosomes Cancer **53**(7): 606-611.

Young, A. R. and M. Narita (2007). "Oncogenic HMGA2: short or small?" Genes Dev **21**(9): 1005-1009.

Zaidi, M. R., Y. Okada and K. K. Chada (2006). "Misexpression of full-length HMGA2 induces benign mesenchymal tumors in mice." Cancer Res **66**(15): 7453-7459.

Zaragosi, L. E., B. Dadone, J. F. Michiels, M. Marty, F. Pedetour, C. Dani and L. Bianchini (2014). "Syndecan-1 regulates adipogenesis: new insights in dedifferentiated liposarcoma tumorigenesis." Carcinogenesis.

Zha, L., J. Zhang, W. Tang, N. Zhang, M. He, Y. Guo and Z. Wang (2013). "HMGA2 elicits EMT by activating the Wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer." Dig Dis Sci **58**(3): 724-733.

Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb and T. A. Anderson (2006). "Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact." Dev Biol **289**(1): 3-16.

Zhang, K., K. Chu, X. Wu, H. Gao, J. Wang, Y. C. Yuan, S. Loera, K. Ho, Y. Wang, W. Chow, F. Un, P. Chu and Y. Yen (2013). "Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma." Cancer Res **73**(4): 1298-1307.

Zhang, K., H. Gao, X. Wu, J. Wang, W. Zhou, G. Sun, Y. Wang, B. Mu, C. Kim, P. Chu, D. M. Ho, D. K. Ann, T. T. Wong and Y. Yen (2014). "Frequent overexpression of HMGA2 in human atypical teratoid/rhabdoid tumor and its correlation with let-7a3/let-7b miRNA." Clin Cancer Res **20**(5): 1179-1189.

Zhang, Q. and Y. Wang (2008). "High mobility group proteins and their post-translational modifications." Biochim Biophys Acta **1784**(9): 1159-1166.

Zhang, X. Y., J. X. Ding, X. Tao and K. Q. Hua (2013). "FSH stimulates expression of the embryonic gene HMGA2 by downregulating let-7 in normal fimbrial epithelial cells of ovarian high-grade serous carcinomas." Exp Ther Med **5**(1): 350-354.

Zhang, Y., T. Ma, S. Yang, M. Xia, J. Xu, H. An, Y. Yang and S. Li (2011). "High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells." Mol Cell Biochem **357**(1-2): 363-371.

Zhang, Z., J. Wang and X. Lu (2014). "An integrated study of natural hydroxyapatite-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using transcriptomics, proteomics and microRNA analyses." Biomed Mater **9**(4): 045005.

Zhou, H., W. Guo, Y. Zhao, Y. Wang, R. Zha, J. Ding, L. Liang, J. Hu, H. Shen, Z. Chen, B. Yin and B. Ma (2014). "MicroRNA-26a acts as a tumor suppressor inhibiting gallbladder cancer cell proliferation by directly targeting HMGA2." Int J Oncol **44**(6): 2050-2058.

Zhou, L., D. Picard, Y. S. Ra, M. Li, P. A. Northcott, Y. Hu, D. Stearns, C. Hawkins, M. D. Taylor, J. Rutka, S. D. Der and A. Huang (2010). "Silencing of thrombospondin-1 is critical for myc-induced metastatic phenotypes." Cancer Res **70**(20): 8199-8210.

Zhou, X., K. F. Benson, H. R. Ashar and K. Chada (1995). "Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C." Nature **376**(6543): 771-774.

Zhu, C., J. Li, G. Cheng, H. Zhou, L. Tao, H. Cai, P. Li, Q. Cao, X. Ju, X. Meng, M. Wang, Z. Zhang, C. Qin, L. Hua, C. Yin and P. Shao (2013). "miR-154 inhibits EMT by targeting HMGA2 in prostate cancer cells." Mol Cell Biochem **379**(1-2): 69-75.