



HAL
open science

Le génome remanié comme oncogène des sarcomes pléomorphes ?

Lucile Delespaul

► **To cite this version:**

Lucile Delespaul. Le génome remanié comme oncogène des sarcomes pléomorphes ?. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0374 . tel-02433190

HAL Id: tel-02433190

<https://theses.hal.science/tel-02433190>

Submitted on 9 Jan 2020

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.

THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPECIALITE GENETIQUE

Par Lucile DELESPAUL

**Le génome remanié comme oncogène
des sarcomes pléomorphes ?**

Sous la direction du Dr. Christine VARON

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2018

Membres du jury :

M. GROSSET, Christophe	Directeur de recherche, Bordeaux	Président
Mme LINARES, Laetitia	Chargée de recherche, Montpellier	Rapporteur
M. DEJARDIN, Jérôme	Directeur de recherche, Montpellier	Rapporteur
Mme LEGUBE, Gaëlle	Directrice de recherche, Toulouse	Examinatrice
M. LUTZMANN, Malik	Chargé de recherche, Toulouse	Examineur
Mme VARON, Christine	Maître de conférences, Bordeaux	Directrice de thèse
M. CHIBON, Frédéric	Directeur de recherche, Toulouse	Invité

Le génome remanié comme oncogène des sarcomes pléomorphes ?

Résumé : Les sarcomes à « génétique complexe » sont des tumeurs rares du tissu mésenchymateux. Ces tumeurs sont caractérisées par un nombre important de réarrangements chromosomiques et possèdent un génome complexe dans lequel aucune altération n'avait été retrouvée de manière spécifique et récurrente. Le but de ma thèse était donc d'identifier les conséquences de cette complexité chromosomique et de comprendre comment celle-ci pouvait être générée. Dans un premier temps, le transcriptome de 112 sarcomes à « génétique complexe » a été analysé. La recherche et la validation de transcrits chimériques a conduit à l'identification de réarrangements fréquents au niveau du gène *TRIO*. Ces transcrits permettent la formation d'une protéine tronquée et seraient des événements issus du réarrangement global du génome de ces tumeurs. Dans un deuxième temps, nous avons alors recherché l'origine de la formation de ces altérations, en nous intéressant particulièrement à la fusion cellulaire comme mécanisme initiateur. Ce processus physiologique est observé dans des cellules mésenchymateuses et peut être détourné afin de permettre le développement et l'évolution tumorale. J'ai alors étudié les conséquences génomiques et phénotypiques de la fusion de fibroblastes à différents stades d'immortalisation ou à différentes phases du cycle cellulaire. Mes travaux ont alors permis de montrer que des mécanismes de fusion cellulaire conduisent à la formation d'altérations génétiques similaires à celles des sarcomes à « génétique complexe » et contribueraient à l'initiation et à la progression de ces tumeurs.

Mots clefs : Sarcomes, Génome, Altérations génétiques, Fusion cellulaire, Evolution tumorale

Rearranged genome as pleomorphic sarcomas oncogene?

Abstract: Sarcomas with a complex genetics are rare tumours from mesenchymal tissue. They are characterized by massive chromosomal rearrangements without any recurrent and specific alteration. The objective of my thesis was to identify the consequences of this chromosomal complexity and mechanisms explaining how this could be generated. First, transcriptome of 112 sarcomas with a complex genetics have been analysed. Chimeric transcripts detection and validation permitted the identification of frequent rearrangements in *TRIO* gene. These transcripts lead to the formation of a truncated protein and they would originate from a global rearrangement of the tumour genomes. Second, we have sought the origin of these alterations, with a particular interest in the cell fusion as an initiator mechanism. This physiological process is observed in mesenchymal cells and it can be hijacked to drive tumour inception and evolution. I consequently studied both genomic and phenotypic consequences of hybrids from fibroblasts at different immortalization steps or in the different cell cycle phases. This work permitted to demonstrate that cell fusion mechanism leads to the initiation of genetic alterations that mimics the ones in sarcomas with complex genetics and would contribute to their tumour initiation and progression.

Keywords: Sarcomas, Genome, Genetic alteration, Cell fusion, Tumour evolution

Unité de recherche

INSERM U1053 – BaRITOn, Université de Bordeaux
146, rue Léo Saignat
33076 Bordeaux

« L'évolution biologique est ainsi fondée sur une sorte de bricolage moléculaire, sur la réutilisation constante du vieux pour faire du neuf. »

François JACOB - Le jeu des possibles

1981 Edition Fayard

Remerciements

Je tenais tout d'abord à remercier l'ensemble de mon jury d'avoir accepté de corriger et de juger ce travail. Merci à Christophe Grosset, président, à Laetitia Linares et Jérôme Déjardin, rapporteurs, et à Gaëlle Legube et Malik Lutzman, examinateurs.

Je tenais également à remercier les Dr. Pierre Soubeyran et Dr. Gilles Favre de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans leur établissement, tout d'abord à l'Institut Bergonié, puis au Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse.

Merci à Christine Varon, d'avoir accepté de prendre le relai en tant que directrice de thèse pour cette dernière année. Je n'aurais pas pu compléter ce travail sans votre aide.

Fred, merci de m'avoir acceptée dans ton équipe il y a maintenant cinq ans (oui je sais que tu as trouvé ça long). Merci de m'avoir permis de réaliser cette aventure, qui aura été aussi bien éprouvante que passionnante. J'ai adoré le travail que j'ai réalisé pendant ces années car tu as su me guider, mais aussi me laisser la liberté de réaliser mes projets et faire des erreurs. Tu m'as poussée dans mes retranchements, et aujourd'hui je me sens grandie (au moins mentalement...). J'ai énormément appris pendant ces cinq années grâce à toi et tu as su me transmettre ta passion pour la génétique tumorale. Et maintenant je peux te le dire, tu as été et tu resteras un mentor pour moi (ça c'est fait !). Donc, pour tout ça, merci Chef ! Merci également de m'avoir fait connaître le Don Papa et la Carolus... Et pour finir, deux choses : 1/ c'est de ta faute si on a raté l'avion pour Séoul ! 2/ au Nicaragua, ils ne cultivent pas de petits pois !

Ma Gaëlle, ça va être compliqué de résumer en quelques phrases combien je te suis reconnaissante. Tu as été l'aide dont j'avais besoin pour mes manips, le pilier qui me relevait et tu m'as donnée de la force pour continuer. Tout d'abord mon encadrante, aujourd'hui tu es devenue une amie et ces quelques mois sans toi ont été très longs. Tes « râleries » vont profondément me manquer (puis moi, contrairement à toi, je ne râle JAMAIS...), ainsi que ta bonne humeur et ton humour. Je garderais toujours en mémoire nos nombreuses pauses qui m'ont toujours permis de décompresser. On se reverra autour d'une tartiflette avec Gwen et ta puce !

Ma Lyly, tu es loin maintenant mais tu as eu une place tellement importante dans cette thèse. J'ai eu la chance de pouvoir travailler avec toi et ça a été une expérience géniale. Tu seras toujours ma petite « maman de labo », celle qui rassure quand il y a des « bobos », celle qui aide et qui écoute. Ton rire, ton sourire et ta gentillesse qui te caractérisent... je venais toujours dans la bonne humeur. Ça a été génial de pouvoir être dans le même bureau que toi et j'espère vraiment qu'on se recroisera très vite.

Tom, première partie de remerciement pour toi. Car ta place dans ma vie, qui est tellement importante, fais que je vais tout d'abord parler du côté professionnel. J'ai énormément appris de ta rigueur et de ta vision de la « génétique computationnelle » (oui parce que MONSIEUR, futur docteur, aime se la péter ^^). Les longues heures où tu essayais de m'expliquer R ou encore lors du projet sur *TRIO* restent des supers souvenirs pour moi. J'ai adoré discuter de science, de manip, de la conception de la génétique tumorale avec toi, discussions presque philosophiques parfois. Bref merci, car tu as été un parfait compagnon de travail (et pas que...).

Ma petite Can-can ! On a vécu la même épreuve toi et moi, le déménagement où au tout début on était totalement désemparées. Heureusement que je t'avais. Je pense que ça sera inutile de te rappeler nos longues heures à l'azote ni même l'horreur de tout regrouper, retrouver, ranger... Tu es une fille super et cette dernière année où j'ai vraiment appris à te connaître, j'ai réellement pu apprécier la personne que tu étais. Toi et tes remarques toujours plus percutantes (même si parfois j'en ai payé les frais ^^). J'ai adoré discuter avec toi et ça a été un vrai plaisir de travailler ensemble.

Lucie, je te connais depuis seulement un an mais je tenais à beaucoup te remercier pour cette année riche en couleur grâce à toi. Toi et ton caractère bien trempé, ça s'est sûr qu'on ne s'est pas ennuyé ! Merci de m'avoir beaucoup aidée les derniers temps en reprenant le relai de certaines choses. Reste comme tu es, entière et pleine de vie.

Jess, merci pour ta bonne humeur pendant ces quelques années où on a travaillé ensemble. Tu étais le petit rayon de soleil de l'équipe, et je pense que personne n'oubliera tes nombreuses arrières-pensées...

Pauline, sans toi je n'en serais pas là. Au début, j'avoue, tu me faisais un peu peur. Mais avec le temps, j'ai appris à te connaître et tu m'as tellement appris avant de partir ! Maintenant les CGH n'ont plus de secrets pour moi !

Merci à Agnès pour les nombreux moments passés avec toi en FISH, j'ai toujours aimé venir te voir pour discuter. Merci aussi pour les nombreuses soirées en dehors du labo.

Merci à Ben et à Simon pour les soirées, la bonne humeur et les moments partagés entre thésards. Vous étiez un peu les éléments perturbateurs du labo, mais ça nous a permis de toujours décompresser dans les moments difficiles.

Merci à Jennifer pour ta gentillesse et d'avoir été ma compagne de soirée pendant plusieurs années. C'était toujours agréable de t'avoir les soirs où on travaillait tard, pouvant alors discuter tout en finissant notre journée.

Merci à Sabrina, l'électron libre ! Les réunions avec toi ont parfois été très fatigantes (en même temps, tu es une italienne pleine de vie) mais toujours passionnantes !

Merci à Martina de m'avoir appris la FISH 24 couleurs et d'avoir pris beaucoup de temps pour m'expliquer l'analyse.

Merci à toutes les personnes de l'équipe que je n'ai pas citée, que ce soit à Bordeaux ou maintenant à Toulouse, d'avoir accompagné ce travail. Vous seriez trop nombreux pour vous lister tous mais sachez qu'une thèse c'est avant tout une aventure d'équipe et que sans vous je n'en serais pas là.

Merci à toute l'équipe 13, voisins de palier sans lesquels cette installation aurait été beaucoup plus compliquée !

Merci à toute l'équipe de l'animalerie de Bordeaux, Benoit et Julien !

Merci aux Hives, à QOTSA, aux Black Angels, à Rone, à The Hives, aux Eagles of Death Metal, aux Black keys, à Them Crooked Vultures, à Red Fang, à Radiohead..... de m'avoir « accompagnée » pendant cette écriture.

Merci à ma boulette, d'avoir toujours été là pour moi. Merci de ton soutien, de m'avoir toujours aidée à me recentrer dans ma vie (même si parfois je ne le voulais pas). Merci pour tout ce que tu m'as apportée. Tu es ma meilleure amie et j'ai vraiment de la chance de pouvoir t'avoir.

Merci à mes parents, à ma sœur, mon beau-frère et à mon neveu pour tout votre soutien. Merci d'avoir compris pendant toutes ces années à quel point c'était important pour moi et de m'avoir toujours soutenue et aidée.

Merci à mon chouchou ! Tu es la plus belle découverte de cette thèse. Je ne sais comment te remercier. Tu as su m'écouter, me soutenir et m'aider pour que tout se passe au mieux pour moi. Cette aventure a été extraordinaire grâce à toi ! Merci de m'avoir supportée pendant cette écriture, pour tous les efforts et ta patience (entre mes pleurs, mes rires et mes angoisses, tu as été très courageux). J'ai enfin trouvé le compagnon pour me suivre dans le reste de mes aventures. Maintenant, l'avenir nous appartient !

Et pour finir, ma thèse, grâce à vous, pourrait se résumer ainsi :

« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie » - Confucius

Table des matières

Index des figures	4
Index des tableaux	6
Liste des abréviations	7
Partie 1 : Introduction	10
I. Altérations génétiques, instabilité et cancer	11
A. Cancer : La maladie du génome	11
B. Altérations chromosomiques	12
1. Altérations numériques	13
1.1. Aneuploïdie : définition	13
1.2. Mécanismes de l'aneuploïdisation	13
1.3. Rôle de l'aneuploïdie	17
1.3.1. Effet de l'aneuploïdie	17
1.3.2. Aneuploïdie et évolution tumorale	18
2. Altérations structurales	20
2.1. Types d'altérations structurales	20
2.2. Formation des réarrangements structuraux	21
2.3. Conséquences des réarrangements chromosomiques	22
2.3.1. Variations du nombre de copies	23
2.3.2. Activation d'oncogènes	24
2.3.3. Formation d'un gène tronqué	27
2.4. Réarrangements complexes	28
C. Mutations ponctuelles	32
1. Types d'altérations ponctuelles	32
2. Formation des altérations ponctuelles	33
D. Altérations génétiques et oncogenèse	34
1. Altérations et types tumoraux	34
2. Altérations <i>Drivers</i> et <i>Passengers</i>	36
E. Instabilité génomique et évolution	38
1. L'instabilité génomique	38
1.1. Un processus évolutif	38
1.2. Instabilité nucléotidique	39
1.3. Instabilité chromosomique	40
2. Un modèle darwinien d'évolution	42
3. Tétraploïdie : une étape intermédiaire de l'évolution tumorale ?	44
F. Conclusion	46
II. Altérations génomiques et sarcomes	48
A. Caractéristiques cliniques et pathologiques des sarcomes	48
1. Descriptions de la pathologie	48
2. Etiologie	49
3. Classification des STM	51
3.1. Classification histologique	51
3.2. Grade histologique FNCLCC	53
B. Les sarcomes : des maladies chromosomiques	54
1. Les sarcomes à « génétique simple »	54
1.1. Les sarcomes à mutation ponctuelle	55
1.2. Les sarcomes à « translocation »	55
1.3. Les <i>drivers</i> forts de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique simple »	57
2. Les sarcomes à « génétique complexe »	59
2.1. Types histologiques des sarcomes à génétique complexe	59
2.2. Le génome des sarcomes à « génétique complexe »	60
2.2.1. Caractérisation cytogénétique de leur génome	60
2.2.2. Altérations récurrentes	62

2.2.3. Les sarcomes à amplification : une altération spécifique dans un génome remanié	66
2.3. Instabilité chromosomique	67
C. L'instabilité chromosomique comme facteur d'agressivité tumorale	68
1. Progression tumorale et instabilité	68
2. Index génomique	69
3. CINSARC	71
D. Conclusion	71
III. La fusion cellulaire	73
A. Généralités	73
1. Description	73
2. Les différents produits issus de la fusion cellulaire	73
B. Fusion des membranes	75
1. Modèle de fusion des membranes	76
1.1. Etapes de pré-fusion	76
1.2. Etapes de fusion	77
2. Fusogènes	79
2.1. Fusogènes physiologiques	80
2.2. Fusogènes viraux	81
2.3. Agents fusogènes non-protéiques	82
C. Processus physiologique	83
1. Fécondation	83
2. Différenciation cellulaire	84
2.1. Placentation	84
2.2. Formation des muscles squelettiques	85
2.3. Fusion des macrophages	86
3. Régénération et restauration cellulaire	87
D. Fusion et cancer	89
1. Fusion et altérations génomiques	90
1.1. Aneuploidie et instabilité génomique des hybrides	90
1.2. Formation d'altérations dans les hybrides	91
1.2.1. Transition « hétérokaryon-synkaryon »	91
1.2.2. Cycle cellulaire et fusion	92
2. Héritage et acquisition de propriétés par les hybrides	93
2.1. Instabilité et évolution tumorale via la fusion cellulaire	93
2.2. Participation à la progression tumorale	97
2.2.1. Développement métastatique	97
2.2.2. Résistance aux drogues	99
3. Mécanisme de fusion des cellules tumorales	100
E. Conclusion	101
IV. Objectifs	103
Partie 2 : Résultats expérimentaux	104
I. Etude de transcrits chimériques dans les sarcomes à « génétique complexe »	105
A. Identification de transcrits chimériques récurrents avec conservation du cadre de lecture	105
1. Article 1 : <i>Recurrent TRIO fusion in nontranslocation-related sarcomas</i>	107
2. Conclusion	127
B. Etude de la relation entre complexité génomique et expression de transcrits chimériques	129
1. Résultats	131
2. Conclusion	135
II. Restructuration du génome : étude de la fusion cellulaire comme mécanisme initiateur	137
A. Implication de la fusion cellulaire dans l'initiation tumorale	137
1. Travaux antérieurs de l'équipe	139
2. Article 2 : <i>Human mesenchymal cell hybrid initiates genetically unstable tumors</i>	143
3. Conclusion	177

B. Implication du cycle cellulaire dans la formation d'altérations dans les hybrides	178
1. Résultats	180
1.1. Sélection des hybrides homo et hétérophasiques	180
1.2. Analyse des profils génomiques des hybrides	182
1.3. Mesure de l'agressivité des hybrides	186
2. Conclusion.....	188
C. Etude de la contribution de la fusion dans la progression tumorale	192
1. Résultats	193
1.1. Sélection des hybrides.....	193
1.2. Caractéristiques génomiques des hybrides.....	194
1.3. Acquisition et héritage de propriétés phénotypiques par les hybrides	197
1.4. Rôle des hybrides dans la dissémination métastatique.....	199
1.5. Fusion cellulaire <i>in vivo</i>	203
2. Conclusion.....	204
Partie 3 : Discussion générale et perspectives	207
I. Les sarcomes à « génétique complexe » : le génome remanié comme altération récurrente.....	209
A. Les transcrits chimériques atypiques des sarcomes à « génétique complexe »	209
1. Gènes de fusion privés	209
2. Transcrits chimériques sans conservation du cadre de lecture	210
B. Vers une nouvelle compréhension de l'oncogenèse des sarcomes ?.....	211
1. Conséquence des altérations génomiques ?.....	211
2. Une oncogenèse privée ?.....	213
3. Types d'altérations chromosomiques spécifiques ?	214
3.1. Les DDLPS : des sarcomes à « génétique complexe » indépendants	214
3.2. L'aneuploidie comme altération majeure ?.....	215
4. Autres altérations ?.....	217
C. Le remaniement du génome comme oncogène ?	217
1. La complexité génomique comme altération spécifique ?.....	217
2. Quelle est l'origine de cette instabilité ?	218
II. La fusion cellulaire : un accélérateur de l'évolution tumorale	220
A. Un nouveau regard sur l'oncogenèse des sarcomes ?	220
1. Un modèle de complexité génomique proche de celle des sarcomes à pléomorphes	220
2. Evènement oncogénique des sarcomes à « génétique complexe » ?	222
B. La fusion cellulaire est un médiateur de l'aneuploidie.....	223
1. Un générateur d'instabilité génomique	223
2. Un évènement complexe du modèle « diploidie-tétraploidie-aneuploidie »	224
C. Un nouveau modèle de l'évolution tumorale ?	226
III.Perspectives	229
Partie 4 : Matériels et méthodes	232
Références bibliographiques	244
Annexes.....	275

Index des figures

Figure 1 : Défauts mitotiques conduisant à l'activation du SAC.....	16
Figure 2 : Modèle d'haplo-insuffisance et de triplo-sensibilité.....	18
Figure 3 : Les différentes altérations chromosomiques structurales.....	21
Figure 4 : Dérégulation de l'expression d'un gène suite à la juxtaposition d'une région promotrice activatrice devant un oncogène.....	24
Figure 5 : Formation de gènes de fusion.....	25
Figure 6 : Schéma de la formation du <i>chromothripsis</i>	29
Figure 7 : Induction du <i>chromothripsis</i> par la formation d'un chromosome dicentrique.....	30
Figure 8 : Schéma de la formation de <i>chromoplexy</i>	31
Figure 9 : Types d'altérations ponctuelles.....	32
Figure 10 : Modèle du continuum des altérations drivers.....	38
Figure 11 : Modèle d'évolution tumorale à partir de l'œuf fertilisé jusqu'à la cellule cancéreuse.....	43
Figure 12 : Evolution tumorale ramifiée.....	44
Figure 13 : Incidence des différents types de sarcomes en fonction de l'âge.....	49
Figure 14 : Taxonomie des STM.....	52
Figure 15 : Courbe de survie sans métastase en fonction du grade FNCLCC pour une cohorte de 1 240 patients.....	53
Figure 16 : Caractérisation transcriptomique de 24 différents groupes de sarcomes à petites cellules rondes.....	58
Figure 17 : Caractérisation cytogénétique des sarcomes à « génétique complexe ».....	61
Figure 18 : Les deux types de profils génomiques observés dans les sarcomes à « génétique complexe ».....	62
Figure 19 : Classification non-supervisée des données d'expression de 160 sarcomes à « génétique complexe ».....	63
Figure 20 : Caryotype d'un liposarcome bien différencié présentant un chromosome en anneau.....	67
Figure 21 : Analyse Kaplan-Meier de la survie sans métastase (MFS) dans les GIST.....	70
Figure 22 : Analyse Kaplan-Meier de la survie sans métastase en fonction de la signature CINSARC (A) et du grade histologique (B).....	71
Figure 23 : Les différents produits de la fusion cellulaire :.....	75
Figure 24 : Mécanisme de fusion cellulaire.....	77
Figure 25 : <i>Hallmarks</i> de la fusion cellule-cellule.....	79
Figure 26 : Mécanismes moléculaires de la fusion des macrophages en ostéoclastes ou en MGC.....	87
Figure 27 : Condensation prématurée de chromosomes dans des cellules issues de fusions hétérophasiques.....	92
Figure 28 : Induction d'instabilité génétique dans les cancers par mutation, aneuploïdie ou par fusion cellulaire.....	95
Figure 29 : La fusion cellulaire permet de générer de la diversité cellulaire.....	96
Figure 30 : Nombre de transcrits chimériques détectés par deFuse dans les quatre principaux types histologiques de la cohorte.....	131
Figure 31 : Plot circulaire représentant les transcrits chimériques détectés dans les DDLPS.....	132
Figure 32 : Plots circulaires représentant le nombre de transcrits chimériques détectés dans les UPS, les MFS et les LMS.....	134
Figure 33 : Caractéristiques génomiques des IB105-DsRed et IB106-GFP et des hybrides.....	140
Figure 34 : Caractérisation phénotypique des hybrides.....	141
Figure 35 : Schéma expérimental pour l'obtention des hybrides issus de la fusion à des phases différentes du cycle de cellules transformées.....	180
Figure 36 : Synchronisation des cellules parentales.....	181
Figure 37 : Exemple des deux catégories d'altération considérées dans cette étude.....	183

Figure 38 : Ratio rB de chaque clone.	184
Figure 39 : rB moyen de chaque combinaison.	184
Figure 40 : <i>Genomic Index</i> de l'ensemble des clones.	185
Figure 41 : <i>Genomic Index</i> par combinaison.	185
Figure 42 : Expérience <i>in vivo</i> des hybrides G1-G2 et S-G2.	187
Figure 43 : Formation et caractérisation des hybrides C.	194
Figure 44 : Profil génomique des lignées parentales E6E7-CFP et RST-DsRed et des hybrides.	195
Figure 45 : <i>Genomic Index</i> des lignées parentales et des hybrides.	196
Figure 46 : Caractéristiques <i>in vitro</i> des hybrides comparés aux cellules parentales.	198
Figure 47 : Test de migration de la lignée parentale RST-DsRed, de l'hybride C1 et de deux dilutions limites de la RST-DsRed (DL1 et DL2).	199
Figure 48 : Développement tumoral et formation de métastases par les hybrides.	201
Figure 49 : Profil génomique des hybrides et des tumeurs des hybrides (M).	202
Figure 50 : Immunofluorescence sur coupe de paraffine d'une tumeur issue d'une xénotgreffe de RST-DsRED + E6E7-CFP.	203

Index des tableaux

Tableau 1 : Conséquences fonctionnelles des altérations structurales en fonction de la localisation du type de cassures et du type de réarrangements.....	23
Tableau 2 : Nombre de gènes de fusion totaux et récurrents identifiés par type histologique.	27
Tableau 3 : Les 12 lignes de différenciation observées dans les STM d'après la classification de l'OMS.	51
Tableau 4 : Grade FNCLCC, définition des paramètres.....	53
Tableau 5 : Liste des protéines impliquées dans les différentes étapes de la fusion cellulaire dans des processus physiologiques.	78
Tableau 6 : Liste d'études relatant l'identification de fusion entre des cellules tumorales et des cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) ou des macrophages.	97
Tableau 7 : Virus oncogéniques humains.....	100
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits de fusion en RT-PCR.	233
Tableau 9 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la quantification des transcrits chimériques par RT-qPCR.	233
Tableau 10 : Séquences des shRNA utilisées pour l'inhibition de l'expression de <i>TRIO33-TERT2</i> ainsi que celles du shRNA control (NT : Non trageting).	234
Tableau 11 : Cohorte analysées en CGH-array (n=24).....	234

Liste des abréviations

% : Pourcent

µg : microgramme

µl : microlitre

µm : micromètre

µM : micromolaire

53BP1 : *P53 Binding Protein 1*

A : Adénine

ABL1 : *Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1*

ADAM12 : *A Disintegrin And*

Metalloproteinase Domain 12

ADGRG2 : *Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique

Complémentaire

AFF-1 : *Anchor cell Fusion Failure protein 1*

AFIP : *Armed Forces Institute of Pathology*

AID : *Activation-Induced Cytidine deaminase*

ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*

ALT : *Alternative Lengthening of Telomeres*

APOBEC : *Apolipoprotein B mRNA Editing*

Catalytic Polypeptide-like

Arf : *Alternative Reading Frame*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASCT1 : *Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 1*

ASCT2 : *Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 2*

ASK1 : *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR : *Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein*

ATRX : *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked*

AURKA : *Aurora Kinase A*

AURKB : *Aurora Kinase B*

BCOR : *BCL-6 Corepressor*

BCR : *Breakpoint Cluster Region*

BMDC : *Bone Marrow Derived Cells*

BMT : *Bone Marrow Transplant*

BRAF : *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*

BRCA1 : *Breast Cancer Type 1 susceptibility protein*

BrdU : *Bromodésoxyuridine*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

BUB1 : *Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Homolog*

BUB3 : *Budding Uninhibited by Benzimidazoles 3 Homolog*

BUBR1 : *Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Homolog Beta*

C : Cytosine

CCL2 : *C-C Motif Chemokine Ligand 2*

CCNB3 : *Cyclin B3*

CCND1 : *Cyclin D1*

CCR2 : *C-C Motif Chemokine Receptor 2*

CD8 : *Cluster of Differentiation 81*

CD81 : *Cluster of Differentiation 81*

CD9 : *Cluster of Differentiation 9*

CDK1 : *Cyclin Dependent Kinase 1*

CDK12 : *Cyclin Dependent Kinase 12*

CDK4 : *Cyclin Dependent Kinase 4*

CDKN2A : *Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A*

CDKN2B : *Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2B*

Cdon : *Cell Adhesion Associated, Oncogene Regulated*

CENPE : *Centromere Protein E*

CEP57 : *Centrosomal Protein 57*

CFP : *Cyan Fluorescent Protein*

CGH : *Comparative Genomic Hybridization*

CINSARC : *Complexity INDEX in SARcomas*

CITED2 : *Cbp/P300 Interacting Transactivator with Glu/Asp Rich Carboxy-terminal Domain 2*

cl : Clone

CO₂ : dioxyde de carbone

COL1A1 : *Collagen type I Alpha 1 Chain*

COSMIC : *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

CSC : cellule souche cancéreuse

DC-STAMP : *Domain-Containing Protein 2*

DDB2 : *Damage Specific DNA Binding Protein 2*

DDIT3 : *DNA Damage Inducible Transcript 3*

DDLPS : *Dedifferentiated liposarcoma*

DUX4 : *Double Homeobox 4*

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EFF-1 : *Epithelial Fusion Failure*

EML4 : *Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4*

EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition
ERCC2 : Excision Repair Cross-Complementation Group 2
ERG : Transcriptional Regulator ERG
EtOH : Ethanol
ETS : E26 transformation-specific
ETV1 : ETS Variant 1
ETV6 : ETS Variant 6
EWSR1 : Ewing's Sarcoma RNA-binding protein 1

F : Fusion

Fah : Fumarylacetoacetate Hydrolase
FAST : Fusion- Small Transmembrane
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FNCLCC : Fédération Française Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
FOXO1 : Forkhead Box O1
FRS2 : Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2

G : Guanine

GEF : GTP Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GI : Genomic Index
GIST : Gastro Intestinal Stromal Tumor
gp160 : Glycoprotein 160
GTP : Guanosine Triphosphate
GTPases : Guanosine Triphosphatase

h : heure

H&E : Hematoxylin and Eosin
H2AX : H2A histone family member X
HAP2 : Protein HAPLESS 2
HCl : chlorure d'hydrogène
HCT116 : Human Colorectal Tumor 116
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
HHV-8 : Human Herpesvirus 8
HMGA2 : High Mobility Group AT-Hook 2
HN : Haemagglutinin-Neuramidase
HPF : High-Power Field
HR : Homologous Recombination
HRAS : Harvey Rat Sarcoma viral Oncoprotein
HVJ : Hemagglutinating Virus of Japan
HVJE : Hemagglutinating Virus of Japan Envelope

ICGC : International Cancer Genome Consortium

IGH : Immunoglobulin heavy Locus
IGK : Immunoglobulin kappa Locus
IGL : Immunoglobulin lambda Locus

Ig-like : Immunoglobulin-like

IL-3 : Interleukin 3

IL-4 : Interleukin 4

indels : insertions et délétions de paires de bases

KCl : Chlorure de potassium

KIF11 : Kinesin Family Member 11

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

LMS : Léiomyosarcomes

lncRNA : long non coding ribonucleic acid

M : Molaire

MAD1 : Mitotic Arrest Deficient 1 Like 1

MAD2 : Mitotic Arrest Deficient 1 Like 2

MAPK3/1 : Mitogen-Activated Protein Kinase 3/1

MAX : MYC Associated Factor X

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MDM2 : Mouse Double Minute 2

Mdx : Mouse Dystrophin

MED12 : Mediator Complex Subunit 12

MetOH : Méthanol

MFH : Malignant Fibrous Histiocytoma

MFS : Myxofibrosarcomes

MGC : Multinucleated Giant Cell

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

miRNA : micro ribonucleic acid

ml : millilitre

MLH1 : MutL Homolog 1

MLL : Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia

MMR : Mismatch Repair

MPF : Mitosis Promoting Factor

MPM2 : Mouse Monoclonal Mitotic Proteins Antibody

MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor

MSH2 : MutS Homolog 2

MSH6 : MutS Homolog 6

mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin

Myf5 : Myogenic Factor 5

MYOCD : Myocardine

MyoD : Myogenic Differentiation 1

NAB2 : NGFI-A-Binding protein 2

NaCl : Chlorure de sodium

NF1 : Neurofibromin 1

NFATc1 : Nuclear Factor of Activated T-cells 1

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NHEJ : Non Homologous End Joining
nm : nanomètre
NMDA : N-methyl-D-aspartate
NRAS : Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
NSG : NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ
NT : Non Targeting
NTRK3 : NeuroTrophic Receptor Tyrosine Kinase 3

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P53 : Protein 53 kDa
PAX3 : Paired Box 3
PAX5 : Paired Box 5
Pax7 : Paired Box 7
pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCC : Premature Chromosome Condensation
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCRq : Polymerase Chain Reaction - Quantitative
PDGFB : Platelet Derived Growth Factor Subunit B
PEG : Polyéthylène Glycol
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIC : Protease Inhibitor Cocktail
PLPS : Pleomorphic Liposarcomas
PMS2 : Postmeiotic Segregation Increased 2
PMSF : Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride
POLE : DNA Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit
PRDM10 : PR Domain-Containing Protein 10
PRMS : Pleomorphic Rhabdomyosarcomas
PTD : Partial Tandem Duplication
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog
RAC1 : Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RANKL : Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand
RB : Retinoblastoma
RFP : Red Fluorescent Protein
RHOG : Ras Homolog Family Member G
RIPA : Radio-ImmunoPrecipitation Assay
RIS : Radiation-Induced Sarcoma
RNA-seq : Ribonucleic acid-sequencing
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR : ReverseTranscription - Polymerase Chain Reaction
RUNX1 : Runt Related Transcription Factor 1

RUNX1T1 : RUNX1 Translocation Partner 1

SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SAS : Sarcoma Amplified Sequence
SDHB : Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SHDC : Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit C
shRNA : short hairpin ribonucleic acid
SLC37A3 : Solute Carrier Family 37 Member 3
SMARCB1 : SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily B, Member 1
SRF : Serum Response Factor
SS18 : Synovial Sarcoma Translocation, Chromosome 18
SSX2 : Synovial Sarcoma, X Breakpoint 2
STAG2 : Stromal Antigen 2
STAT1 : Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 6
STM : Sarcomes des Tissus Mous
STUMP : Smooth muscle Tumor with Uncertain Malignant Potential
SVF : Sérum de Veau Fœtal
SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T : Thymine
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TMPRSS2 : Transmembrane Serine Protease 2
TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha
TNXB : Tenascin XB
TRIO : Triple functional domain protein
TSPAN31 : Tetraspanin 31

UPS : Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

WDLPS : well-differentiated liposarcoma
Wnt : Wingless/Integrated

XPC : Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C

Partie 1 : Introduction

I. ALTERATIONS GENETIQUES, INSTABILITE ET CANCER

A. Cancer : La maladie du génome

Les cellules cancéreuses sont issues d'une cellule normale qui évolue progressivement vers un état néoplasique suite à l'acquisition successive de fonctions dérégulant la prolifération et l'homéostasie cellulaire (Hanahan and Weinberg 2011). Cette acquisition est la conséquence d'anomalies génétiques, fixées dans le génome tumoral, modifiant ainsi le comportement cellulaire et conduisant à la transformation tumorale. Dans 90% des cancers, ces mutations sont somatiques, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas héritées d'un des deux parents mais vont être acquises par les cellules au cours du temps. Ces altérations sont de deux types : celles qui permettent une activation anormale de gènes pro-tumoraux appelés oncogènes, et celles qui inactivent les gènes restreignant l'oncogenèse, les suppresseurs de tumeurs (Garraway and Lander 2013).

En 1914, Theodor Boveri évoque pour la première fois la contribution du génome dans le développement tumoral. Ce zoologiste réalisait des travaux sur la double fécondation d'un oocyte d'oursin avec deux spermatozoïdes, où il observa des mitoses multipolaires aboutissant à des cellules aneuploïdes. Ces anomalies allaient conduire à la mort ou au développement anormal de la cellule. Il fit alors le rapprochement entre ces anomalies et le développement tumoral. En effet, de précédents travaux réalisés par David von Hansemann, qui étudiait la division de cellules cancéreuses, décrivaient des mitoses anormales, comme celles observées dans les travaux de Boveri (Hansemann 1890). Boveri émit alors l'hypothèse suivante : les anomalies du génome sont à l'origine du développement tumoral (Boveri 1914). Cependant, la communauté scientifique de l'époque n'a pas pris en considération ses travaux car les résultats étaient observés chez l'oursin ; ses travaux ont été délaissés pendant près de 50 ans.

La découverte de la fonction et de la structure de l'ADN ont été identifiées quelques années plus tard (Avery *et al.* 1944 ; Watson and Crick 1953). C'est en 1960, avec la découverte de la translocation entre les chromosomes 9 et 22, appelée chromosome de Philadelphie, dans les leucémies

myéloïdes chroniques que l'association entre une altération génétique et un type tumoral particulier a été établie pour la première fois et a permis de relancer la théorie de Boveri (Nowell and Hungerford 1960). Celle-ci a également été appuyée par de nombreux travaux montrant l'apparition de mutations causées par des carcinogènes chimiques (Miller and Miller 1968, 1975, 1976, 1983a, b).

Mais ce fut dans les années 1980 que cette théorie s'est progressivement imposée. Deux équipes ont démontré le caractère oncogène de l'ADN tumoral suite à la transformation de lignées murines NIH3T3 causée par l'introduction d'ADN humain issu de lignées cellulaires cancéreuses de la vessie (Krontiris and Cooper 1981 ; Shih *et al.* 1981). L'étude des segments d'ADN induisant cette transformation a permis d'identifier une mutation faux sens de *HRAS*, résultant d'une substitution d'une base G en une base T (*HRAS* c.G35T, plus connue sous sa notation protéique p.G12V ; Reddy *et al.* 1982; Tabin *et al.* 1982). Le premier oncogène était découvert. Ces travaux fondateurs ont été suivis par beaucoup d'autres et le nombre d'études sur le génome tumoral a augmenté de manière exponentielle, à mesure que les techniques de séquençage se sont améliorées. Des études réalisées par les groupes *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) depuis 2005 et l'*International Cancer Genome Consortium* (ICGC) depuis 2008 ont abouti au séquençage haut débit du génome et du transcriptome de plusieurs milliers de tumeurs, apportant ainsi un nouveau regard sur les anomalies moléculaires qui s'opèrent lors du développement et de l'évolution tumorale. Aujourd'hui, la théorie de Boveri est communément acceptée et il est établi que le cancer est une maladie génétique.

B. Altérations chromosomiques

Comme décrit par les travaux fondateurs de Theodor Boveri et David von Hansemann, les cellules cancéreuses présentent des réarrangements chromosomiques. Ces altérations peuvent être numériques ou structurales, et sont la conséquence de défauts du maintien de l'intégrité chromosomique.

1. Altérations numériques

1.1. Aneuploïdie : définition

L'aneuploïdie est définie par la présence d'un nombre anormal de chromosomes, causé par des pertes ou des gains de régions chromosomiques. Cette modification est fréquente dans les cellules tumorales : 60% des cancers bronchiques non à petites cellules, 60-80% des cancers du sein, 70% des tumeurs colorectales, 30% des tumeurs de la prostate et 50% des sarcomes possèdent un nombre anormal de chromosomes (Choma *et al.* 2001 ; Carter *et al.* 2012 ; Fletcher *et al.* 2013 ; Donepudi *et al.* 2014). L'aneuploïdie est une modification sélective du nombre de copies de gènes. Cet état cellulaire est par ailleurs essentiel pour le développement de certaines tumeurs. Ainsi, le modèle de progression tumorale dans les cancers colorectaux implique le gain des chromosomes 1, 7, 8q, 13 et 20q et la perte des chromosomes 4q, 8p et 18q (Ried *et al.* 1996).

1.2. Mécanismes de l'aneuploïdisation

La présence d'erreurs de ségrégation au cours de la mitose est la cause majeure de l'aneuploïdie. Ces erreurs sont générées par un défaut d'attachement entre les microtubules et les kinétochores (**Figure 1**). Dans une cellule normale, la répartition correcte du contenu chromosomique dans les deux cellules filles est régulée à l'aide d'un système de surveillance.

En métaphase, les chromosomes sont placés au niveau de la plaque équatoriale. Ils sont attachés au niveau de leurs kinétochores à des microtubules émanant des deux pôles mitotiques opposés. Quand les microtubules des deux centrosomes s'attachent uniquement au kinétochore le plus proche, ils génèrent une forte tension entre les deux kinétochores du même chromosome : cet attachement est correct et est dit amphilétiq (Figure 1 A). Lors d'attachements anormaux, la tension entre les deux kinétochores sera incorrecte, ce qui va enclencher l'activation du *spindle assembly checkpoint* (SAC). Celui-ci empêchera la séparation des deux chromatides sœurs tant qu'un attachement correct n'est pas réalisé (Naylor and van Deursen 2016). Ce mécanisme régule et

maintient, au cours de la division cellulaire, un contenu chromosomique identique entre les deux cellules filles. La dérégulation de celui-ci, à différents niveaux, entraîne alors une aneuploïdie.

Une des causes majeures d'erreurs de ségrégation est un **attachement anormal** entre centromères et kinétochores. Ces attachements sont de différents types: des attachements syntéliques (attachement des deux kinétochores au même pôle), monotéliques (attachement d'un seul kinétochore) ou mérotéliques (attachement d'un kinétochore à des microtubules émanant de deux pôles différents ; **Figure 1 A**). Les attachements syntéliques et monotéliques activent le SAC via une tension incorrecte entre les deux kinétochores. Un défaut de ce *checkpoint* entraîne alors des défauts de répartition des chromosomes lors de la division cellulaire. L'haplo-insuffisance pour des protéines de ce *checkpoint* comme BUB1, BUBR1, BUB3, MAD1, MAD2 et CENPE, générée dans des modèles murins hétérozygotes, est suffisante pour induire de l'aneuploïdie (Michel *et al.* 2001; Dai *et al.* 2004; Kalitsis *et al.* 2005; Weaver *et al.* 2007; Iwanaga *et al.* 2007; Jeganathan *et al.* 2007 ; **Figure 1 B**). Les attachements mérotéliques, en revanche, n'active pas le SAC (Cimini *et al.* 2001, 2004). Quand ces attachements sont présents, les deux kinétochores sont attachés à des microtubules des pôles opposés entraînant alors une tension normale. Ils sont corrigés par un autre système dont la protéine centrale est l'Aurora kinase B (*AURKB*), protéine présente au niveau des centromères (Cheeseman *et al.* 2002, 2006). Cependant, l'inactivation de cette protéine ou l'impossibilité de celle-ci à activer ses substrats empêche cette correction (Cimini *et al.* 2006). Si ces attachements ne sont pas corrigés, les chromosomes mérotéliques vont conserver des attachements aux deux pôles. Le devenir de ce chromosome sera alors dépendant du nombre de microtubules fixés à chaque kinétochore. Si un kinétochore est attaché à un des deux pôles avec un nombre plus important de microtubules, proportionnel à la tension exercée, le chromosome ségrégera vers ce pôle. En revanche, si le nombre de microtubules est équivalent, le chromosome mérotélique ne sera pas réparti en anaphase, et restera temporairement bloqué au niveau de la plaque équatoriale (**Figure 1 C**). Il reste au niveau de la plaque équatoriale. Ce chromosome est dit retardataire et va soit se retrouver dans micronoyau, qui sera alors isolé du noyau principal, soit se bloquer au niveau du sillon de clivage (Holland and Cleveland 2012).

Une non-corréction de ces attachements peut donc conduire à une répartition incorrecte des chromosomes dans les deux cellules filles. Une augmentation de l'assemblage des microtubules a également été observée dans des lignées cellulaires de cancer colorectal induisant une hyperstabilisation des microtubules et des erreurs de ségrégation (Ertych *et al.* 2014).

Une autre cause de l'aneuploïdie est la présence de **centrosomes surnuméraires** (Nigg and Stearns 2011). Il a longtemps été pensé qu'une augmentation du nombre de centrosomes allait conduire à l'aneuploïdie par des divisions multipolaires. Cependant, les cellules résultantes de ces divisions sont le plus souvent non-viables du fait de la réduction trop importante du contenu chromosomique dans les cellules filles (Ganem *et al.* 2009 ; Godinho and Pellman 2014). Les cellules possédant des centrosomes surnuméraires vont pouvoir regrouper leurs centrosomes afin de former un fuseau mitotique pseudo bipolaire (**Figure 1 D-F**). Différentes étapes interviennent lors du regroupement des centrosomes. Tout d'abord, des fuseaux mitotiques multipolaires sont observés en prométaphase. Ces fuseaux vont entraîner des attachements anormaux de chromosomes, notamment des attachements mérotéliques. Puis, en métaphase, les centrosomes vont se regrouper en deux pôles, des deux côtés de la plaque métaphasique. Ce processus n'est donc pas sans conséquence. L'augmentation du nombre de centrosomes a diverses origines : une duplication anormale des centrioles ou une tétraploïdisation de la cellule suite à la fusion cellulaire, une endoréplication, une cytokinèse abortive ou encore à un défaut de la cytokinèse (Nigg and Stearns 2011).

La dérégulation de la cohésion entre les deux chromatides sœurs peut également participer à l'aneuploïdie. Cette cohésion est réalisée par les **cohésines** et la perte de fonction de ces protéines est associée à l'aneuploïdie. Une mutation inactivatrice de la cohésine STAG2 a été reportée dans 39% des cancers (Solomon *et al.* 2011 ; Tirode *et al.* 2014). Cette perte induit une hyperstabilisation des microtubules au niveau des kinétochores, empêchant la correction des attachements anormaux et favorisant les erreurs de ségrégation (Kleyman *et al.* 2014).

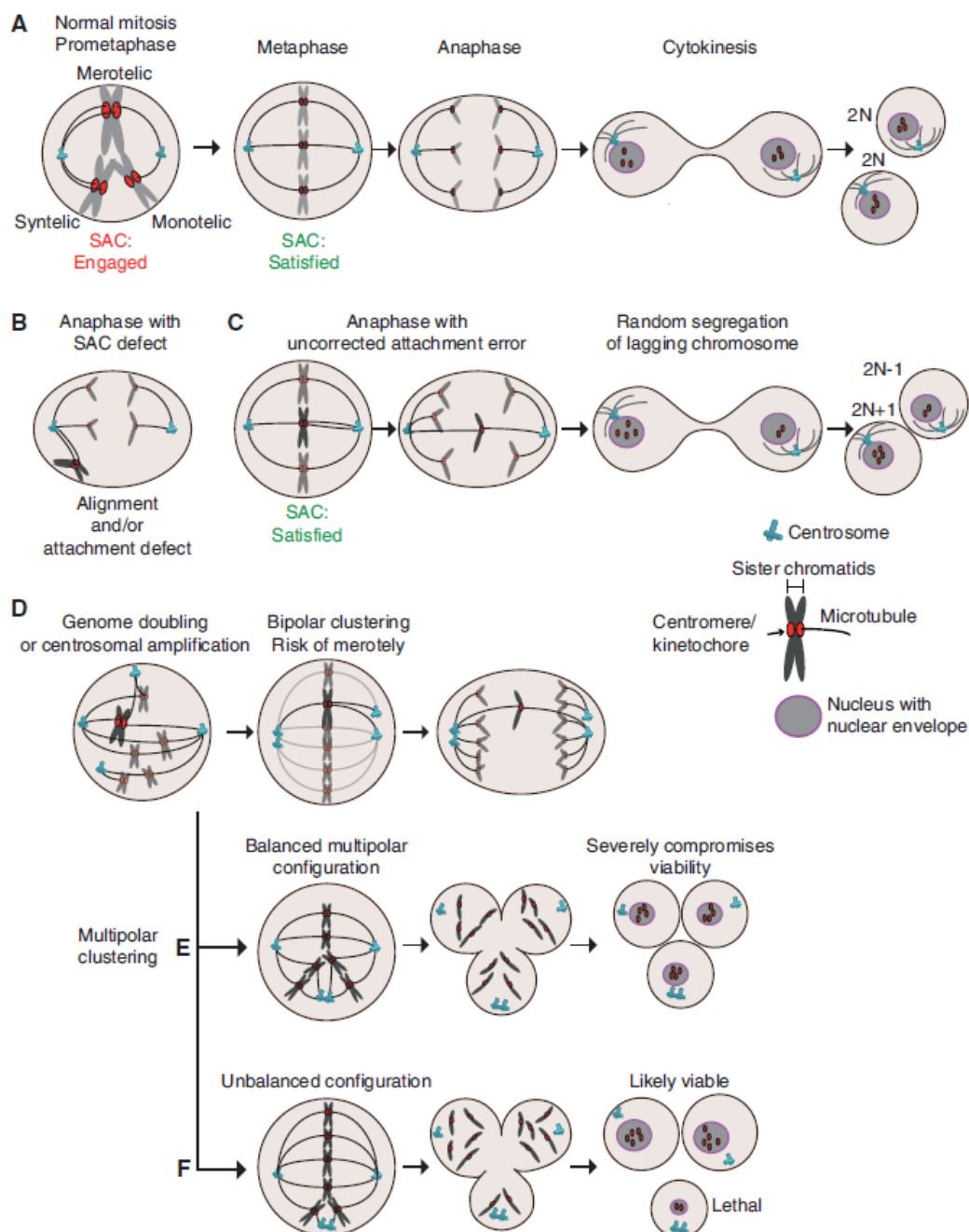


Figure 1 : Défaits mitotiques conduisant à l'activation du SAC.

A/ Les différentes configurations d'attachements entre microtubules et kinétochores sont représentées. En métaphase, l'activation du SAC va permettre un attachement normal et la séparation correcte des chromosomes en anaphase. B/ Un défaut du SAC va conduire à une séparation anormale des chromosomes. C/ L'attachement mérotélique n'est pas détecté par le SAC et induit la formation d'un chromosome retardataire qui sera soit réparti dans une des cellules filles soit retrouvé au niveau d'un micronoyau. D/ La présence de plusieurs centrosomes peut résulter en la formation d'un fuseau multipolaire transitoire permettant la formation d'attachements mérotéliques. Les centrosomes peuvent alors se regrouper en deux pôles qui conduiront à un chromosome retardataire. E/ Une anaphase multipolaire crée des cellules filles présentant une perte de contenu chromosomique. F/ Un regroupement des centrosomes en une configuration déséquilibrée peut conduire à une perte de chromosomes dans les cellules filles avec un pôle s'attachant à quelques chromosomes (Sansregret and Swanton 2017).

1.3. Rôle de l'aneuploïdie

1.3.1. Effet de l'aneuploïdie

L'aneuploïdie induit des modifications transcriptomiques, métaboliques, protéomiques ainsi qu'une augmentation de la sénescence (Tang *et al.* 2011 ; Santaguida *et al.* 2015 ; Schukken and Foijer 2018). La conséquence directe de celle-ci est de modifier le nombre de copies des gènes et contribuer à l'oncogenèse en dérégulant l'expression de gènes cibles. Par exemple, la perte du chromosome 13 permet l'inactivation de *RBI* et est une altération récurrente, observée dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules, les cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire ou encore les sarcomes pléomorphes (Chibon *et al.* 2000 ; Di Fiore *et al.* 2013).

Une modification du nombre de copies n'est pas toujours suffisante pour moduler l'expression d'un gène. Pour certains gènes, une compensation du dosage génique va avoir lieu, c'est-à-dire que le niveau d'expression de ces gènes va être conservé malgré la modification du nombre de copies. Pour d'autres en revanche, ces altérations modifient leur expression et entraînent des modifications phénotypiques. Davoli *et al.*, en 2013 montrent que la perte ou le gain d'un chromosome est associé à la distribution et au potentiel oncogénique de ses gènes. Ainsi, les chromosomes fréquemment perdus sont plus enrichis en suppresseurs de tumeurs qu'en oncogènes et inversement pour les chromosomes gagnés. Ils font donc l'hypothèse que ces réarrangements pourraient être sélectionnés au cours du développement tumoral en permettant une haplo-insuffisance (une perte d'une copie d'un gène entraînant un phénotype) de gènes suppresseurs de tumeurs au niveau des régions perdues et une triplo-sensibilité (un gain d'une copie d'un gène causant un phénotype) d'oncogènes dans les régions gagnées (Figure 2).

Le gain d'un chromosome peut également être associé à une autre altération et conduire à une copie supplémentaire d'un oncogène. C'est le cas des carcinomes épidermoïdes dans lesquels la trisomie du chromosome 7 conduit à la duplication de l'allèle préalablement muté de *HRAS* et ainsi à sa surexpression (Bianchi *et al.* 1990). A l'inverse, la perte d'un chromosome peut conduire à la conservation d'un seul allèle muté, et donc à une perte d'hétérozygotie, mécanisme fréquemment

observé lors de l'inactivation séquentielle des deux copies d'un suppresseur de tumeur selon le modèle « *two-hit* » proposé par Knudson (Knudson 1971).

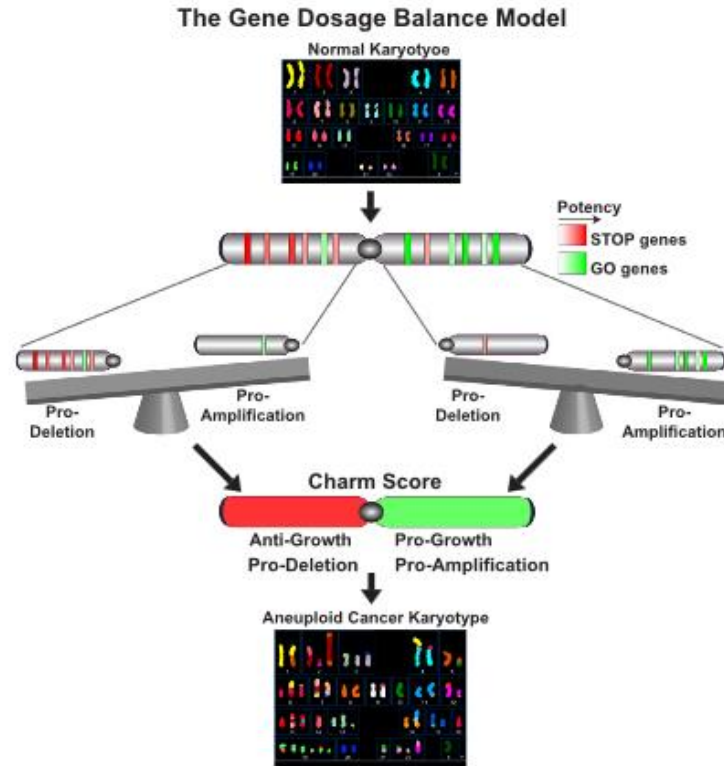


Figure 2 : Modèle d'haplo-insuffisance et de triplo-sensibilité.
(Davoli *et al.* 2013)

1.3.2. Aneuploïdie et évolution tumorale

En général, l'aneuploïdie est délétère pour la cellule (Williams *et al.* 2008 ; Stingle *et al.* 2012 ; Sheltzer *et al.* 2017). Les monosomies (toutes) et les trisomies (à l'exception de celle des chromosomes 13, 18 et 21) sont létales chez l'homme et 2 à 5% des cellules du cerveau et du rein seraient aneuploïdes (Knouse *et al.* 2014). Lorsque ces anomalies sont tolérées, elles ne sont cependant pas asymptomatiques et peuvent favoriser le développement tumoral. Par exemple, les patients atteints du syndrome de Down (trisomie du chromosome 21) présentent un retard mental et un risque élevé de développer des leucémies (Hasle *et al.* 2000). Le gain du chromosome 21 est une altération fréquente dans les leucémies de patients n'étant pas atteints par ce syndrome. Ce chromosome posséderait donc

des gènes favorables au développement de leucémies et la présence de ce chromosome supplémentaire prédisposerait à ce type de cancer (Berger 1997). Dans des conditions expérimentales, la trisomie du chromosome 12 dans des cellules souches hématopoïétiques conduit à la formation de tératome (Ben-David *et al.* 2014). L'aneuploïdie pourrait alors être un facteur de prédisposition au développement tumoral. Néanmoins, l'aneuploïdie des cellules normales étant souvent létale, le rôle de l'aneuploïdie dans le développement tumoral reste encore soumis à controverse.

Dans les cellules tumorales, en revanche, l'aneuploïdie est tolérée et ces altérations vont participer à l'acquisition de nouvelles capacités. La présence d'un chromosome supplémentaire dans la lignée cellulaire de cancer du côlon DLD1 permet une croissance plus favorable, une augmentation des capacités d'invasion et une diminution de l'apoptose dans des conditions sélectives de prolifération (sans sérum, en hypoxie ou en présence de 5-fluorouracil ; Rutledge *et al.* 2016). Des cellules tétraploïdes de sarcomes, comparées à des cellules diploïdes, montrent également une augmentation de la migration (Jemaà *et al.* 2017). Cette capacité est reliée à une augmentation de la quantité de protéines mitotiques qui joueraient un rôle au niveau du cytosquelette, favorisant alors la migration cellulaire.

Ces pertes ou gains de chromosomes ne sont en revanche pas toutes avantageuses pour la cellule. De nombreuses études ont démontré que l'aneuploïdie peut être délétère pour le développement tumoral. En effet, l'ajout d'un chromosome dans la lignée HCT116 aurait un effet suppresseur de tumeur entraînant une inhibition de la prise tumorale (Sheltzer *et al.* 2017). Aussi, l'acquisition spontanée de nouvelles altérations chromosomiques au cours des passages de cette lignée permet aux cellules de retrouver leur capacité oncogénique. Le rôle dans l'oncogenèse de l'aneuploïdie ne peut donc pas être résumé en analysant simplement les conséquences d'un chromosome supplémentaire sur le phénotype de la cellule. Les effets de l'aneuploïdie sont spécifiques du type d'altération dans les cellules cancéreuses. Lors de l'évolution tumorale, la perte ou le gain de certains chromosomes ne sont donc pas aléatoires et leur conservation dépend de l'avantage apporté. Ceci explique la récurrence de certaines altérations. Ainsi le gain du bras long (q) du chromosome 8 et la

perte du chromosome 17, contenant respectivement les gènes *MYC* et *TP53*, sont retrouvés de manière récurrente dans les cancers et permettent respectivement le gain d' un oncogène ou la perte d'un suppresseur de tumeurs (Giam and Rancati 2015).

2. Altérations structurales

2.1. Types d'altérations structurales

Les réarrangements chromosomiques structuraux sont des altérations présentes à l'intérieur du chromosome, modifiant alors son architecture. Ils peuvent conduire à l'amplification ou à la délétion de gènes d'intérêt, à la modification de séquences d'ADN, à la modification de régions régulatrices ou bien encore à la création de gènes de fusion. Ces altérations vont donc contribuer à la réorganisation du génome (Fröhling and Döhner 2008). Ce sont les sources majeures de l'évolution phylogénique, en créant et en modifiant des séquences génétiques et elles participent à l'évolution tumorale, notamment en générant des nouvelles fonctions protéiques.

Les différentes altérations génomiques, qui ont toutes pour origine une cassure de l'ADN, peuvent intervenir sur un seul chromosome ou entre différents chromosomes, créant respectivement des échanges intra ou inter-chromosomiques (Inaki and Liu 2012). Ces altérations peuvent être de différents types (**Figure 3**):

- Une **délétion**, perte de matériel génétique.
- Un **gain ou une amplification**, duplication de matériel génétique.
- Une **insertion** d'une séquence chromosomique issue du même chromosome ou d'un échange entre chromosomes.
- Une **inversion**, qui peut être péricentrique (la séquence inversée contient le centromère) ou paracentrique (au niveau d'un bras chromosomique).
- Une **translocation**, c'est-à-dire un échange entre deux chromosomes. Les translocations sont dites réciproques lorsque deux chromosomes non-homologues échangent une partie de leur matériel génomique. La fusion de deux chromosomes acrocentriques au niveau de leur centromère est appelée translocation robertsonnienne.

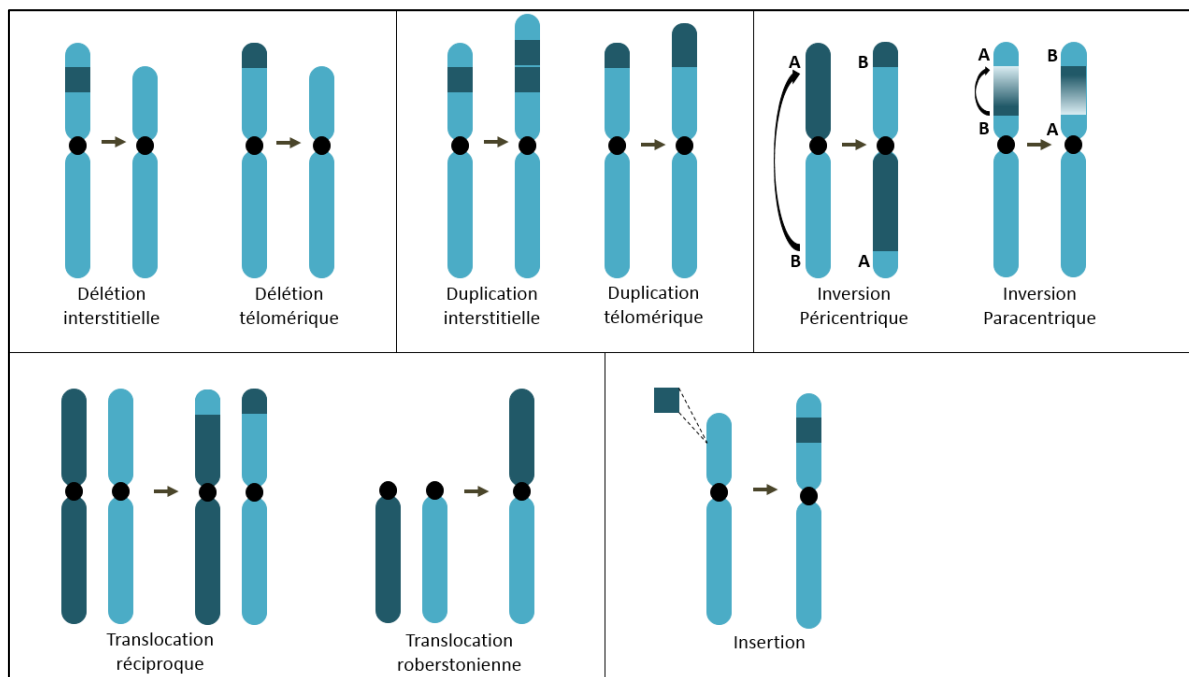


Figure 3 : Les différentes altérations chromosomiques structurales.

Ces altérations peuvent être associées à une modification du contenu génomique de la cellule. Elles sont alors dites équilibrées, quand aucune modification de la quantité d'ADN est observée (par exemple les translocations réciproques) ou déséquilibrées (pertes, gains, translocations non-réciproques, *etc.*).

2.2. Formation des réarrangements structuraux

La cause majeure de réarrangements chromosomiques est la formation de cassures double-brin. Ces cassures chromosomiques ne sont pas stables, génèrent des fragments chromosomiques non-protégés, nécessitant donc de les réparer. Les deux principaux mécanismes de réparation des cassures double-brin sont la recombinaison homologue (HR pour *homologous recombination*), durant les phases S et G2, et le système de réparation non-homologue NHEJ (pour *non homologous end joining*) durant la phase G1 (Hastings *et al.* 2009). La HR est basée sur l'homologie de séquences afin de réparer les cassures double-brin. Cependant, peu d'homologies de séquences sont observées au niveau des séquences de jonctions des réarrangements structuraux dans les tumeurs, suggérant alors que cette

réparation ne s'effectuerait pas via la HR mais par le système NHEJ, ce qui va favoriser des réparations anormales (Hillmer *et al.* 2011). Une inactivation des membres clefs du NHEJ dans des cellules délétées pour *BRCA1* (impliqué dans la HR) induit d'ailleurs une diminution du nombre de translocations (Bunting *et al.* 2010). D'autres systèmes de réparation semblent également jouer un rôle important comme le système V(D)J qui va générer la diversité des anticorps et des récepteurs des cellules T. Il favorise la formation de translocations dans les leucémies et les lymphomes (Lieber *et al.* 2006).

Ces cassures double-brin sont majoritairement produites lors de la réplication. L'arrêt et l'effondrement de la fourche de réplication sont à l'origine de la formation des cassures double-brin, causées par une collision avec la machinerie de transcription ou encore la formation de structures d'ADN anormales (Hastings *et al.* 2009). La déprotection des télomères est également un important inducteur d'altérations structurales en permettant la fusion d'extrémités chromosomiques non-protégées et le mécanisme de « cassure-fusion-pont », décrit par Barbara McClintock (McClintock 1951). D'autres sources comme le stress oxydatif ou les radiations peuvent également induire des cassures double-brin.

Enfin, la position spatiale des chromosomes dans le noyau participerait à la recombinaison de régions génomiques suite à une cassure double-brin (Mani *et al.* 2009 ; Roukos *et al.* 2013). Les chromosomes ne sont pas répartis aléatoirement dans le noyau, mais sont distribués au niveau de régions appelées « territoires chromosomiques ». Cette distribution conduit à la proximité de régions génomiques et pourrait expliquer la présence de translocations récurrentes dans certains types tumoraux.

2.3. Conséquences des réarrangements chromosomiques

Ces réarrangements vont avoir différentes conséquences en fonction de leur type et de la localisation du point de cassure dans le génome (**Tableau 1**). Ainsi, l'amplification ou la délétion de régions génomiques dont les points de cassure sont localisés au niveau de régions intergéniques permettent une modulation du nombre de copies des gènes présents dans ces régions. En revanche, les

points de cassures au niveau de séquences régulatrices ou de régions intragéniques/codantes peuvent modifier l'expression et la fonction des gènes.

Break points	Types	Functional Consequences	Example
Intergenic regions	Amplification (focal)	Overexpression	<i>ERBB2</i> and <i>MYC</i>
	Deletion (focal)	Silencing	<i>CDKN2A</i>
Gene regulatory regions	Enhancer juxtaposition	Overexpression	<i>MYC</i>
	Silencer juxtaposition	Silencing	
	Truncating promoter	Silencing	
Intragenic	Gene truncation	Silencing and activating	<i>CDKN2A</i> , <i>TP53</i> and <i>BRCA1</i>
	Fusion gene	Activating protein function and silencing	<i>BCR-ABL1</i> and <i>EML4-ALK</i>
	Exon rearrangements		<i>MLL-PTD</i>
	Fusion gene, untranslated region	Overexpression and silencing	<i>TMPRSS2-ETS</i>

Tableau 1 : Conséquences fonctionnelles des altérations structurales en fonction de la localisation du type de cassures et du type de réarrangements.
(Inaki and Liu 2012)

2.3.1. Variations du nombre de copies

L'amplification ou la délétion d'une région chromosomique vont modifier, tout comme l'aneuploïdie, le nombre de copies de gènes. Ces modifications peuvent conduire, dans le cas de gènes dont l'expression n'est pas compensée, à une expression anormale.

Une analyse pan-cancer sur 4 934 tumeurs a montré que les 70 régions les plus amplifiées et les 70 régions les plus perdues contenaient en moyenne entre trois et quatre gènes (Zack *et al.* 2013). Un oncogène ou un suppresseur de tumeur a été identifié dans environ 20% de ces régions. De manière intéressante, ces altérations peuvent être associées à une autre anomalie génétique. Ainsi, dans cette étude, l'amplification de 35 gènes est significativement associée à une mutation ponctuelle activatrice de ceux-ci, permettant alors une surexpression d'un oncogène muté. Dans ce mécanisme, l'amplification serait un évènement secondaire à la mutation ponctuelle et permettrait de générer un nombre de copies mutées supplémentaires d'un oncogène.

Ces altérations vont cibler un ou plusieurs gènes, et certaines, dues à leurs avantages oncogéniques, seront récurrentes. Par exemple, l'amplification focale de la région 12q15 et la délétion de la région 9p12.3 dans les adénocarcinomes pulmonaires visent respectivement les gènes *MDM2* et

CDKN2A/CDKN2B (Weir *et al.* 2007). Cependant, la cible de ces altérations n'est pas toujours identifiée.

2.3.2. Activation d'oncogènes

Modifications des régions régulatrices

La formation de réarrangements structuraux peut conduire à des dérégulations transcriptomiques par une modification de régions régulatrices (**Figure 4** ; Mertens *et al.* 2015).

Ces altérations sont la conséquence de la juxtaposition d'un nouvel élément régulateur en *cis* et d'un oncogène, permettant alors sa surexpression (Nambiar *et al.* 2008). Ce mécanisme est notamment observé dans les lymphomes de Burkitt et les plasmacytomes. Dans ces tumeurs, le promoteur d'une des immunoglobulines *IGK*, *IGH* ou *IGL* va être placé devant le gène *MYC* et ainsi déréguler son expression (Robbiani and Nussenzweig 2013). Un processus similaire a été identifié dans les tumeurs malignes des cellules T avec la juxtaposition de locus de gènes codant pour les récepteurs des cellules T et d'oncogènes (O'Neil and Look 2007). Dans les leucémies et les lymphomes, ces réarrangements sont dus à la recombinaison V(D)J qui va générer la diversité des anticorps et des récepteurs des cellules T (Lieber *et al.* 2006).

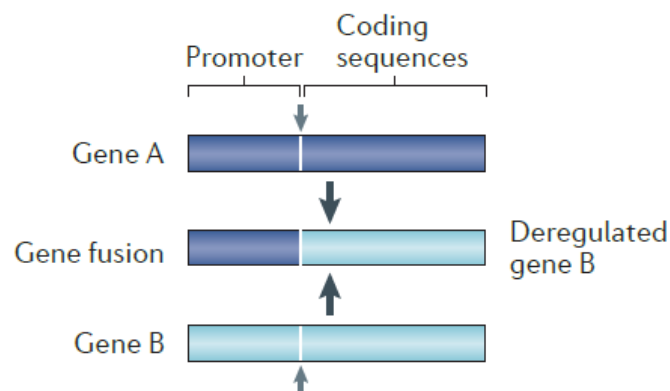


Figure 4 : Dérégulation de l'expression d'un gène suite à la juxtaposition d'une région promotrice activatrice devant un oncogène.
(Mertens *et al.* 2015)

Formation de gènes de fusion oncogéniques

Une autre conséquence majeure des réarrangements structuraux est la formation d'un gène de fusion (**Figure 5**). Un gène de fusion est un gène hybride issu du réarrangement chromosomique entre deux gènes initialement séparés (Nambiar *et al.* 2008). Ces gènes de fusion vont permettre l'expression d'un transcrit chimérique avec conservation du cadre de lecture, codant pour une protéine chimérique. Ces protéines de fusion ont une fonction différente de celles des protéines initiales, ce sont donc de nouvelles protéines. Les gènes impliqués dans des gènes de fusion codent principalement pour deux familles de protéines : les facteurs de transcription et les tyrosines kinases (Mertens *et al.* 2015).

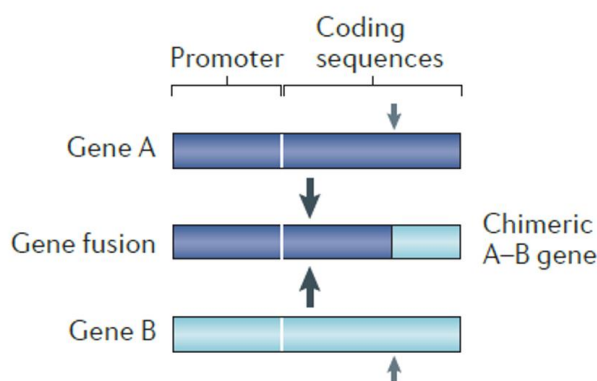


Figure 5 : Formation de gènes de fusion.
(Mertens *et al.* 2015)

Les protéines chimériques ayant un rôle dans la transcription sont issues de la fusion en N-terminal de domaines d'un premier partenaire et en C-terminal d'un domaine de liaison à l'ADN d'un second partenaire. C'est par exemple le cas pour le gène *TMPRSS2* qui va fusionner avec des membres de la famille *ETS* (Clark *et al.* 2007). Ces gènes de fusion sont observés dans 40 à 80% des carcinomes de la prostate. Dans la majorité des cas, les deux premiers exons de *TMPRSS2* sont juxtaposés aux exons des gènes *ETS* suite à un réarrangement de type délétion. Le gène *TMPRSS2* est surexprimé en présence d'androgènes, ces hormones vont alors stimuler l'activation de la transcription de la fusion *TMPRSS2-ETS* et activer l'expression de gènes cibles (Squire *et al.* 2011). Par ailleurs, des gènes de fusion peuvent également participer à l'oncogenèse en empêchant le recrutement du facteur de

transcription normal. C'est par exemple le cas du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1* identifié dans 13% des leucémies myéloïdes aiguës. Le domaine activateur de transcription de RUNX1 est perdu lors de la fusion mais pas son domaine de liaison à l'ADN. La protéine RUNX1-RUNX1T1 va donc empêcher la liaison de RUNX1 au niveau du complexe corépresseur histone déacétylase et empêcher ainsi l'activité normale de la protéine RUNX1 (Wang *et al.* 2004).

D'autres types de gènes de fusion vont quant à eux arborer une activité protéine kinase. Dans ce groupe, les gènes chimériques entraîneront la fusion en N-terminal de domaines d'un premier partenaire avec le domaine tyrosine kinase en C-terminal d'un second partenaire. C'est notamment le cas pour le premier gène de fusion identifié dans des cellules cancéreuses, le gène *BCR-ABL1* dans les leucémies myéloïdes chroniques (Nowell and Hungerford 1960 ; Groffen *et al.* 1984). Dans la protéine chimérique, le domaine tyrosine kinase d'ABL1 est conservé mais pas son domaine de régulation auto-inhibiteur (Mian *et al.* 2009). La protéine contient également le domaine d'oligomérisation de BCR, permettant l'activation constitutive d'ABL1 en l'absence d'un ligand (Mian *et al.* 2009).

Les gènes de fusion peuvent être issus de l'ensemble des réarrangements structuraux préalablement décrits. Alors qu'initialement identifiés suite à des mécanismes de translocations, une étude en 2015 a démontré que 75% d'entre eux seraient issus de réarrangements intra-chromosomiques (Yoshihara *et al.* 2015).

Le nombre et la récurrence des gènes de fusion dépendent du type tumoral. En effet, de nombreux sous-types histologiques de leucémies, lymphomes et de sarcomes sont caractérisés par un gène de fusion ou par l'activation d'un oncogène suite à la juxtaposition d'une région régulatrice activatrice (**Tableau 2** ; Mertens *et al.* 2015). En revanche, peu de gènes de fusion récurrents sont observés dans les carcinomes et leur apparition serait issue de l'instabilité chromosomique de ces tumeurs (Yoshihara *et al.* 2015).

Diagnosis	Number of gene fusions*	
	Total	Confirmed as recurrent
<i>Haematological disorders</i>		
Undifferentiated and biphenotypic leukaemia	25	3
Acute myeloid leukaemia	302	51
Myelodysplastic syndromes	52	8
Myeloproliferative neoplasms, including chronic myeloid leukaemia	72	24
Acute lymphoblastic leukaemia	237	59
Plasma cell neoplasms	22	5
Mature B cell neoplasms	181	31
Mature T cell and natural killer cell neoplasms	28	8
Hodgkin disease	13	2
<i>Benign solid tumours</i>		
Benign epithelial tumours	14	6
Benign mesenchymal tumours	57	8
<i>Malignant solid tumours</i>		
Respiratory system	2,110	11
Digestive system	522	5
Breast	3,856	68
Female genital organs	432	0
Male genital organs	676	25
Urinary tract	626	5
Endocrine system	158	15
Nervous system	738	6
Skin	193	0
Bone	28	5
Soft tissue	104	34

Tableau 2 : Nombre de gènes de fusion totaux et récurrents identifiés par type histologique.
(Mertens *et al.* 2015)

2.3.3. Formation d'un gène tronqué

Une autre conséquence des réarrangements chromosomiques structuraux, moins décrite, est la formation d'un gène tronqué. Ces altérations sont issues de la juxtaposition d'une partie de la séquence d'un gène avec une région génomique non-codante. Cette dernière peut être soit une région intergénique, soit une séquence d'un autre gène ayant un cadre de lecture différent.

A l'inverse des gènes de fusion oncogéniques décrits précédemment, ces réarrangements peuvent conduire à la non-expression/traduction du transcrit ou à l'expression d'un transcrit chimérique ne conservant pas le cadre de lecture des deux partenaires. Ces altérations ne permettent

donc pas la formation d'une protéine chimérique ; elles vont entraîner l'inactivation du gène ou la formation d'une protéine tronquée. La contribution dans l'oncogenèse de ces gènes tronqués est encore peu décrite, mais il semblerait néanmoins que ce sont des conséquences fréquentes des réarrangements structuraux. Ainsi, l'étude de Yoshihara *et al.* en 2015 montre que 77% des transcrits chimériques, identifiés dans 13 types tumoraux, ne conserveraient pas le cadre de lecture du deuxième partenaire.

L'inactivation de suppresseurs de tumeurs par des réarrangements chromosomiques a été observée pour les gènes *CDKN2A* et *NF1* (Duro *et al.* 1996 ; Storlazzi *et al.* 2005). De plus, des réarrangements chromosomiques touchant les gènes *TP53*, *PTEN*, *BRCA1* ou encore *BRCA2* ont été identifiés comme récurrents dans des tumeurs de la prostate (Mao *et al.* 2011). Alors que plusieurs exemples démontrent le rôle de ces altérations dans l'inactivation de suppresseurs de tumeurs, peu d'exemples démontrent leur rôle oncogénique en induisant la formation d'une protéine tronquée. Cela est toutefois observé dans des leucémies lymphoblastiques aiguës avec la formation d'un gène *PAX5* tronqué (Coyaud *et al.* 2010 ; Kawamata *et al.* 2012). Dans ces tumeurs, la partie 5' de *PAX5* est conservée et conduit à l'expression d'une nouvelle isoforme avec un effet dominant sur la protéine normale.

2.4. Réarrangements complexes

Les réarrangements décrits dans la partie précédente étaient des réarrangements simples, d'un point de vue structural, issus de l'altération de quelques régions génomiques. Cependant, le séquençage du génome tumoral a mis en évidence des réarrangements plus complexes, pouvant impliquer plusieurs régions génomiques. Les deux altérations à grande échelle génomique les plus décrites sont le *chromothripsis* et le *chromoplexy*.

Le *chromothripsis* est le premier réarrangement complexe identifié (Stephens *et al.* 2011). Il consiste en la fragmentation en 12 à 100 régions génomiques au niveau d'un bras chromosomique ou de quelques chromosomes (**Figure 6**). Des inversions, des délétions et des insertions sont alors observées. Le terme *chromothripsis* signifie « pulvérisation chromosomique ». Initialement identifié

dans des leucémies lymphocytaires chroniques, ce réarrangement « catastrophique » a été observé dans 2-3% des cancers (25% des tumeurs osseuses). L'origine de ce réarrangement serait un évènement catastrophique unique provoquant la pulvérisation de régions chromosomiques. Les fragments chromosomiques obtenus seront ensuite soit réparés dans un ordre aléatoire, soit perdus. Le nombre de copies des régions concernées va donc osciller entre perte et statut normal.

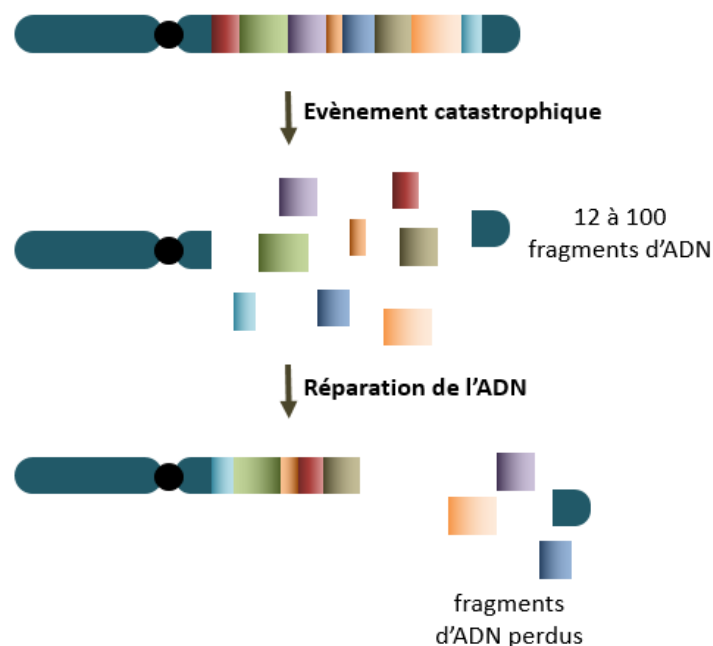


Figure 6 : Schéma de la formation du *chromothripsis*.
(adapté de Stephens *et al.* 2011).

Deux modèles ont permis d'expliquer expérimentalement le *chromothripsis*. Le premier est l'isolement d'un chromosome au niveau d'un micronoyau (Crasta *et al.* 2012). Le chromosome isolé réalise une réplication asynchrone et défectueuse en comparaison de celle du noyau principal. L'entrée en mitose du micronoyau conduit ensuite à une condensation prématurée de la chromatine, créant ainsi une pulvérisation chromosomique à l'origine du *chromothripsis*. Ceci expliquerait pourquoi cette altération est localisée au niveau d'une région génomique particulière. La formation d'un micronoyau est la conséquence d'une anomalie lors de la ségrégation, qui peut alors conduire à la formation de réarrangements structuraux.

Le deuxième mécanisme serait consécutif à l'érosion des télomères (**Figure 7**). Des chromosomes dicentriques vont être formés suite à la fusion des régions terminales des deux chromatides sœurs ou de deux chromosomes (Maciejowski *et al.* 2015 ; Maciejowski and de Lange 2017). Lors de la mitose, le chromosome dicentrique est allongé, tiré par les microtubules des deux pôles et forme un pont chromatidien lors de la cytokinèse, empêchant la séparation des deux cellules filles. Suite à la formation de ce pont, l'enveloppe nucléaire peut être partiellement rompue en anaphase. Le pont d'ADN se retrouve alors en contact avec des exonucléases du cytoplasme qui vont cliver l'ADN et créer des fragments chromosomiques.

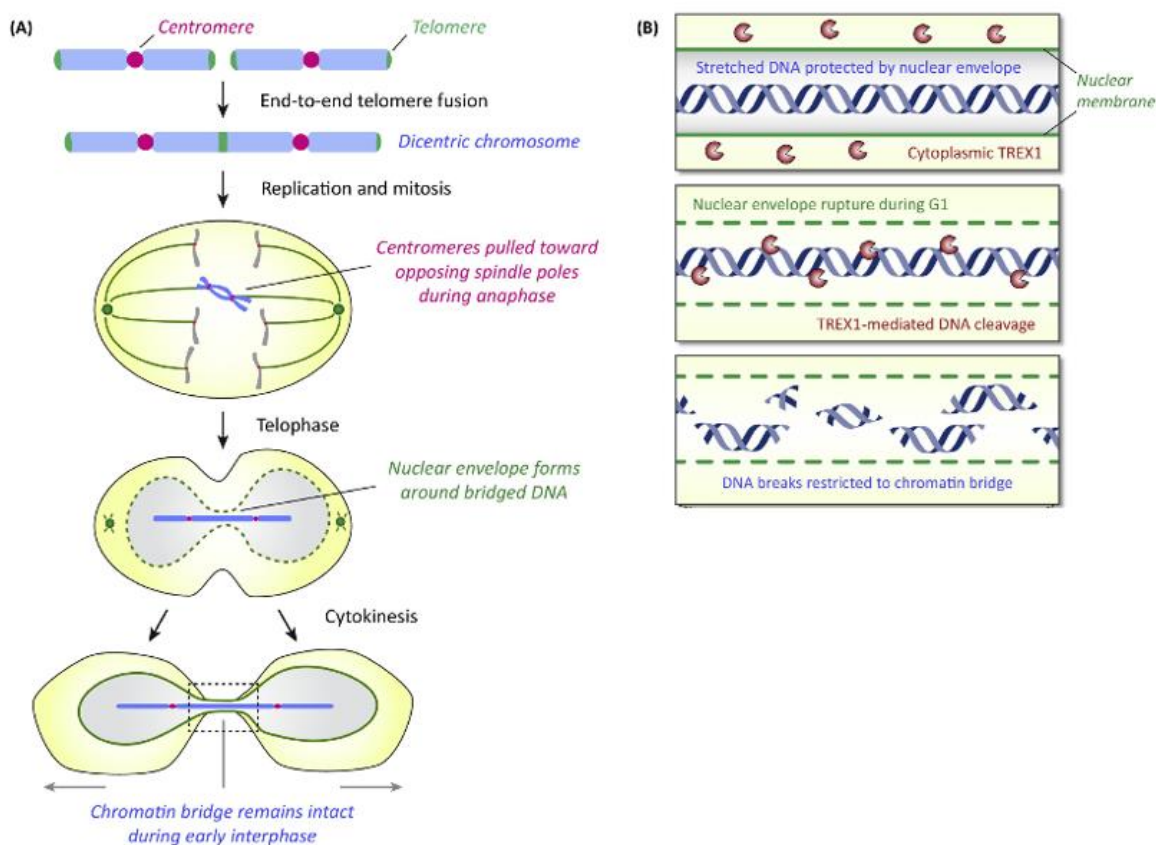


Figure 7 : Induction du chromothripsis par la formation d'un chromosome dicentrique.
A/ Le chromosome dicentrique se retrouve bloqué au niveau du sillon de clivage. B/ Rupture de l'enveloppe nucléaire au niveau du sillon de clivage et fragmentation de l'ADN avec l'exonucléase TREX1 (adapté de Ly and Cleveland 2017).

Le deuxième réarrangement complexe observé dans les tumeurs est appelé *chromoplexy* (**Figure 8**). Il consiste en la formation de translocations équilibrées entre au moins trois chromosomes. Ce réarrangement a été identifié dans des tumeurs de la prostate, permettant l'inactivation de suppresseurs de tumeurs et la formation du gène de fusion *TMPRSS2-ERG* (Baca *et al.* 2013). Ce réarrangement ressemble à une chaîne chromosomique (le chromosome A réalise un échange avec le B, le B avec le C, le C avec le D, le D avec le A). Il ne conduit pas à une perte de région génomique. Les régions impliquées dans les cassures sont transcriptionnellement actives. Ce mécanisme pourrait alors s'expliquer par plusieurs cassures au niveau de régions génomiques co-régulées, spatialement proches qui seraient échangées au cours de la réparation de l'ADN (Baca *et al.* 2013) .

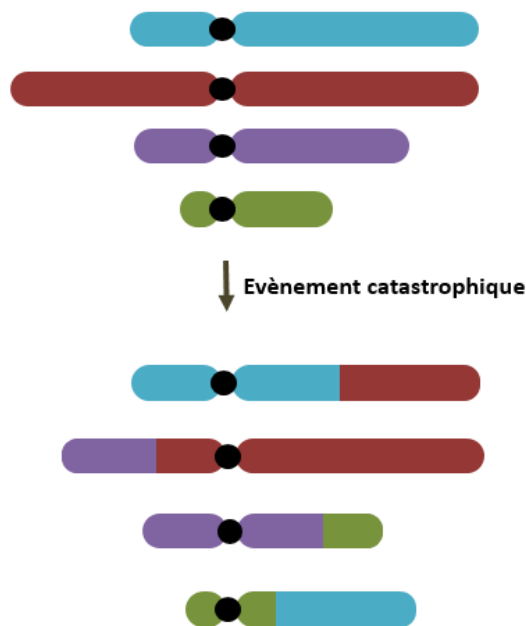


Figure 8 : Schéma de la formation de *chromoplexy*.

C. Mutations ponctuelles

1. Types d'altérations ponctuelles

En plus des réarrangements chromosomiques, des altérations ponctuelles sont retrouvées dans les cellules tumorales (**Figure 9**). Ces altérations vont modifier la séquence génétique, sans intervention de réarrangements structuraux. Elles sont regroupées en deux catégories principales :

- Les **substitutions d'une paire de bases**. Au niveau d'une région codante, cette substitution peut être synonyme (le codon généré correspond au même acide aminé), faux-sens (modification de l'acide aminé) ou non-sens (formation d'un codon stop). La substitution d'une région non-codante peut également contribuer à l'oncogenèse en modifiant les séquences de fixation de facteur de transcription au niveau de régions promotrices, les régions de fixation de *miRNA*, les séquences d'épissage ou encore les régions de régulation de la traduction (Diederichs *et al.* 2016).

- Les **insertions ou délétions de paire(s) de bases** (indels). Ces mutations correspondent à un ajout ou à une suppression de nucléotides (sur moins de 100 pb). Dans une région codante, les indels peuvent être *frame-shift* (décalage du cadre de lecture du gène) ou *non frame-shift* (séquence ayant une longueur multiple de trois pb). Les indels *non frame-shift* n'impacteraient pas, le plus souvent, la structure protéique lorsqu'ils sont inférieurs à 39 pb, mais ils peuvent toutefois conduire à la formation d'une structure protéique désordonnée (Kim and Guo 2010).

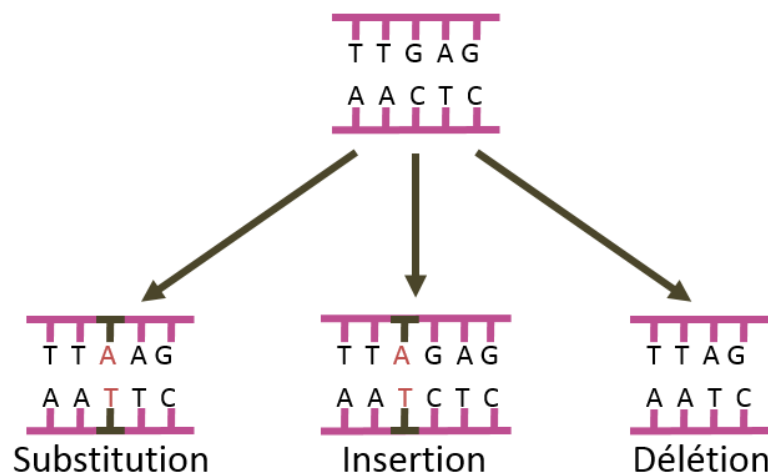


Figure 9 : Types d'altérations ponctuelles.

Dans les carcinomes, 33 à 66 gènes présentent une mutation ponctuelle au niveau de leur séquence codante. Environ 95% de ces mutations sont des substitutions non-synonymes d'une paire de bases, les 5% restantes étant des indels (Vogelstein *et al.* 2013).

2. Formation des altérations ponctuelles

La formation de ces mutations est la conséquence de dommages endogènes de l'ADN, de dommages exogènes, d'erreurs lors de la réplication ou lors de la réparation de l'ADN. Une trentaine de signatures mutationnelles a été identifiée suite à l'analyse du type de mutation ponctuelle et des nucléotides encadrant celles-ci (les bases immédiatement en 5' et en 3' de la base mutée ; Nik-Zainal *et al.* 2012; Alexandrov *et al.* 2013a, b; Helleday *et al.* 2014). Chaque signature représente un ensemble de combinaisons spécifiques dont la moitié est associée à des facteurs endogènes ou exogènes, et donc à une étiologie particulière. Ce catalogue mutationnel est consigné dans la base de données COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* ; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>).

Une réaction de déamination est fréquemment observée au niveau des nucléotides altérés et constitue l'un des principaux **dommages endogènes** de l'ADN. Un exemple de ces dommages est la formation d'uracile consécutive à la déamination de la cytosine, réaction catalysée par des cytidines déaminases de la famille des AID/APOBEC. Ces enzymes permettent d'éditer l'ADN et participent à la déamination de cytosines lors de la diversification des anticorps ou de la protection de l'hôte contre une infection virale (Yang *et al.* 2017). Les signatures attribuées à l'activité enzymatique de cette famille sont retrouvées dans les tumeurs du sein ou dans les leucémies aigües lymphoblastiques (Alexandrov *et al.* 2013b). Un nombre important de ces mutations est également retrouvé au niveau de régions chromosomiques réarrangées. Cette hypermutation, appelée *kataegis*, serait consécutive à l'activation des déaminases de la famille APOBEC (Nik-Zainal *et al.* 2012).

Les **sources exogènes de dommage à l'ADN** peuvent être des sources chimiques ou physiques. Par exemple, les ultraviolets sont des sources exogènes physiques qui participent au développement des mélanomes. Ils modifient les liaisons covalentes entre deux pyrimidines

adjacentes, créant ainsi la formation de dimères de pyrimidines. Cette signature est représentée majoritairement par des substitutions de deux cytosines par deux thymidines suite à la déamination des cytosines en uraciles (Ikehata and Ono 2011).

Le **mécanisme de réparation** post-répliatif *mismatch repair* (MMR), qui reconnaît les mauvaises incorporations de bases ou les indels, peut également induire la formation d'altérations. Un défaut de ce mécanisme de réparation augmente le taux de mutation et l'incorporation d'indels de petites tailles (Alexandrov *et al.* 2013b).

Enfin, la polymérase ϵ (*POLE*), responsable de la **réplication de l'ADN** du brin continu, peut être mutée et ainsi directement contribuer à la formation de substitutions. L'altération de cette polymérase est retrouvée dans les carcinomes colorectaux et ceux de l'endomètre (Cancer Genome Atlas Network 2012 ; Cancer Genome Atlas Research Network *et al.* 2013b ; Alexandrov *et al.* 2013b).

D. Altérations génétiques et oncogénèse

1. Altérations et types tumoraux

Les cellules cancéreuses sont donc caractérisées par des altérations génétiques de différents types qui vont participer au développement de la tumeur.

La distribution de ces altérations dans les cellules tumorales n'est pas aléatoire. En effet, certaines sont retrouvées spécifiquement dans un type tumoral comme la translocation *BCR-ABL1* dans les leucémies myéloïdes chroniques ou encore le gène de fusion *NAB2-STAT6* dans les tumeurs fibreuses solitaires (Groffen *et al.* 1984; Chmielecki *et al.* 2013; Robinson *et al.* 2013). Par son activité basale, la cellule d'origine va donc acquérir des altérations spécifiques. Ainsi, les translocations des leucémies et des lymphomes vont être générées via le système V(D)J. Ce système, qui est retrouvé dans les lymphocytes, va être détourné lors d'un processus tumoral et va contribuer à la juxtaposition de locus d'immunoglobulines ou de promoteurs des gènes codant pour les récepteurs des cellules T devant des oncogènes (Lieber *et al.* 2006). Alors que la cellule d'origine va contribuer à l'acquisition d'altération(s), il apparaît aussi qu'elle va guider la ligne de différenciation tumorale. Ainsi, une même altération dans des cellules différentes va conduire à plusieurs types tumoraux. C'est notamment le cas

de *SMARCB1*, gène inactivé dans les tumeurs rhabdoïdes qui sont des tumeurs pédiatriques fréquemment observées au niveau du système nerveux central. L'inactivation de ce gène dans des modèles murins permet le développement de tumeurs intra-crâniennes uniquement si celle-ci a lieu à des stades précis de l'embryogenèse ; le type des cellules affectées va conduire à la formation d'entités tumorales différentes (Han *et al.* 2016). La différenciation tumorale serait donc associée au type de cellules à l'origine de la tumeur.

En plus du rôle de la cellule d'origine dans l'acquisition et la différenciation tumorale, l'évolution tumorale peut également être associée à une combinaison spécifique d'altérations. Ainsi, le développement tumoral de certaines entités est la conséquence d'une dérégulation de gènes cibles. Ceci est d'ailleurs observé dans les tumeurs du pancréas, de l'endomètre ou encore dans les carcinomes à cellules claires du rein (Iranzo *et al.* 2018). Il apparaîtrait donc que, dans certaines tumeurs, les mécanismes génétiques de l'oncogénèse soient restreints, devant être réalisés selon un ordre précis.

Le développement tumoral peut être aussi la conséquence d'une multitude de combinaisons d'altérations différentes. Il existerait par conséquent des altérations interchangeables, participant au même phénotype dans ces tumeurs. Les altérations sont alors non-spécifiques à un type tumoral, et peuvent être remplacées par d'autres. L'oncogénèse est alors la conséquence de diverses origines génétiques. Ce mécanisme serait d'ailleurs observé dans les cancers de l'estomac, de l'œsophage et les cancers du poumon (Iranzo *et al.* 2018).

Enfin, en plus d'accéder à l'oncogénèse en altérant certains gènes cibles impliqués dans des voies précises, le type d'altérations est également intrinsèque au type tumoral. En effet, les gènes de fusion sont les altérations caractéristiques de plusieurs sous-types histologiques de leucémies, lymphomes et sarcomes, mais sont relativement rares dans les carcinomes (Mertens *et al.* 2015). Les carcinomes du rein à cellules claires, les carcinomes colorectaux et les carcinomes utérins présentent préférentiellement de nombreuses mutations ponctuelles, alors que le génome des carcinomes de l'ovaire a une variation importante du nombre de copies de chromosomes (Ciriello *et al.* 2013). La

mécanique génétique à l'origine de l'oncogénèse est donc spécifique, la formation des altérations est ciblée et le moyen d'accéder à l'oncogénèse n'est pas identique entre les différents types tumoraux.

2. Altérations *Drivers* et *Passengers*

Les données obtenues lors des projets de séquençage du TCGA et de l'ICGC indiquent que les tumeurs possèdent entre 1 000 et 20 000 variants ponctuels somatiques et environ une centaine de réarrangements structuraux dans leur génome (Vogelstein *et al.* 2013). Cependant, parmi l'ensemble de ces altérations, seulement certaines vont contribuer au développement tumoral. Deux types d'altérations peuvent alors être distinguées : les altérations qui vont conférer un avantage lors du développement tumoral appelées *drivers* et les altérations ne contribuant pas à l'évolution tumorale, appelées *passengers*.

Les altérations *drivers* vont permettre aux gènes impactés de réaliser des fonctions qui vont contribuer au développement tumoral ou à la progression tumorale. Ces altérations vont conférer aux cellules un avantage et seront soumises à une sélection positive, c'est-à-dire qu'elles seront maintenues lors de l'évolution tumorale. En revanche, les altérations *passengers* ne contribuent pas à l'oncogénèse et sont sans conséquence pour l'évolution tumorale. Elles seront soumises à une sélection neutre.

Les mutations *drivers* permettent de réaliser les fonctions fondamentales à la survie des cellules cancéreuses, certaines d'entre elles vont donc être retrouvées dans plusieurs types tumoraux. C'est notamment le cas des altérations touchant le gène *TP53*. Ce gène, surnommé le « gardien du génome », participe au maintien de l'intégrité du génome en activant des voies de réparation ou en induisant la mort cellulaire. Il limite le développement et l'évolution tumorale et est inactivé dans 50% des tumeurs (Hanahan and Weinberg 2011). Le gène *KRAS* quant à lui présente des mutations activatrices dans 30% des cancers (dont 90% des cancers du pancréas), ces dernières conduisant à une prolifération anormale des cellules (Klimstra and Longnecker 1994).

Afin de distinguer les altérations *drivers* et *passengers*, différentes méthodes sont utilisées, principalement basées sur la définition de la fréquence de l'altération ou sur l'étude de l'impact direct

de celle-ci d'un point de vue fonctionnel (Pon and Marra 2015). Une étude de l'ensemble des données exoniques de 9 423 tumeurs, correspondant à 33 types tumoraux différents, a permis d'estimer le nombre de mutations *drivers* à 299 (Bailey *et al.* 2018). Les mutations ponctuelles *drivers* représenteraient alors moins de 1% de l'ensemble des variants identifiés.

La distinction entre altérations *drivers* et *passengers* est basée sur la notion que peu d'altérations conduisent au développement tumoral (Miller 1980). Cette classification s'appuie principalement sur un faible nombre de gènes dont les altérations seraient fortement oncogéniques, c'est-à-dire qu'elles permettent à elles seules de modifier suffisamment le phénotype de la cellule. Cependant, dans le cas de tumeurs du sein ou des tumeurs de l'ovaire de haut grade, aucune altération *driver* forte n'a pas été identifiée, ce qui indiquerait que cette simple classification entre *drivers* et *passengers* est trop restreinte (Barbieri *et al.* 2012 ; Cancer Genome Atlas Network 2012 ; Castro-Giner *et al.* 2015). La combinaison de plusieurs altérations, chacune avec un effet moindre, pourraient alors expliquer leur oncogénèse : ces altérations *drivers* de faible capacité oncogénique sont appelées *mini drivers*. Dans ce modèle, une multitude d'altérations *mini drivers* pourrait alors substituer le rôle d'un *driver* fort (**Figure 10**). Ce serait un modèle polygénique d'évolution dans lequel plusieurs gènes participeraient à l'établissement d'un phénotype donné. La contribution dans l'oncogénèse de ces *mini drivers* a d'ailleurs été soutenue en 2013 par l'étude de Davoli *et al.* qui identifie de nouveaux gènes au potentiel oncogénique faible en étudiant l'impact fonctionnel de mutations de 8 200 tumeurs. Ces altérations peuvent être retrouvées avec une fréquence faible et être considérées par les méthodes classiques comme des altérations *passengers*. Aujourd'hui, le nombre de gènes participant à l'oncogénèse est donc revu, et une méta-analyse regroupant les données de 273 études identifie 2 372 gènes *drivers* parmi les 22 000 gènes codants du génome humain, c'est-à-dire 1% des gènes codants (Kuppili Venkata *et al.* 2018). Le dogme de *drivers* et *passengers* serait donc trop limité pour expliquer l'ensemble des processus oncogéniques et le développement tumoral serait beaucoup plus complexe qu'initialement proposé.

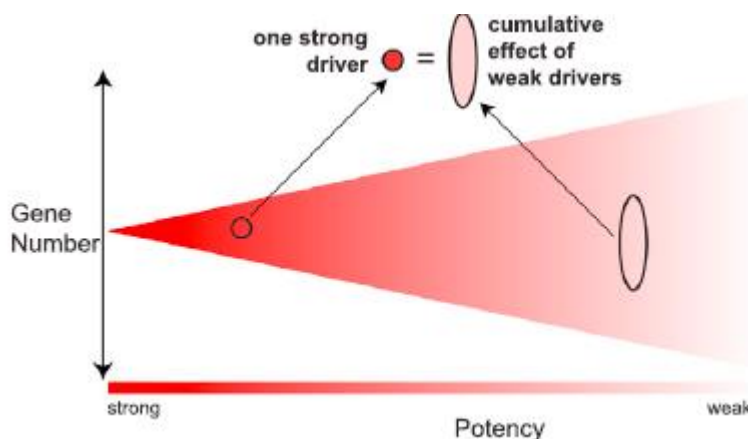


Figure 10 : Modèle du continuum des altérations drivers.
(Davoli *et al.* 2013)

E. Instabilité génomique et évolution

1. L'instabilité génomique

1.1. Un processus évolutif

Le développement tumoral est issu de l'acquisition d'altérations. Cette affirmation a été proposée pour la première fois par Armitage et Doll qui proposaient que le développement tumoral serait possible suite à l'acquisition de six ou sept altérations génétiques (Armitage and Doll 1954). Ce modèle cumulatif est en accord avec l'hypothèse « *two-hit* » proposée par Knudson (Knudson 1971). Ses travaux, visant à étudier le développement de rétinoblastomes bilatéraux chez des patients présentant une inactivation constitutionnelle d'un allèle de *RBI*, démontrent que deux mutations seraient nécessaires et suffisantes pour le développement de ces tumeurs. Dans les tumeurs du colon, dans lesquelles cette accumulation a été validée pour la première fois, le cumul d'altérations est associé à la transformation d'un tissu épithélial en carcinome et à la formation d'une tumeur métastatique (Fearon and Vogelstein 1990). Le nombre précis d'altérations nécessaires reste néanmoins à définir et semble variable en fonction des types tumoraux (Martincorena *et al.* 2017). Cependant, l'ensemble des travaux réalisés sur l'évolution tumorale s'accorde à dire que l'oncogenèse est la conséquence d'une accumulation d'altérations.

L'acquisition d'altérations va être rendue possible par la capacité des cellules tumorales à générer des altérations génomiques au cours du développement tumoral : ces cellules sont génomiquement instables. Cette instabilité va donc permettre l'établissement de combinaisons génétiques favorables au développement tumoral et est nécessaire au processus général d'évolution tumorale.

Une des conséquences majeures de l'instabilité est d'induire l'hétérogénéité tumorale, en générant de nouvelles altérations dans l'ensemble des cellules tumorales. Ainsi, les cellules d'une même tumeur vont donc présenter des différences génétiques. L'instabilité génétique va entraîner la formation de sous-clones au sein de la tumeur, dont certains vont posséder des propriétés nouvelles. Cette hétérogénéité est souvent associée à un mauvais pronostic (McGranahan and Swanton 2015). L'instabilité génétique va aussi favoriser la survie des cellules tumorales. Elle va permettre l'émergence de clones résistants à des chimiothérapies en induisant de la diversité génétique (Kuznetsova *et al.* 2015). De plus, l'acquisition de nouvelles altérations permettrait d'outrepasser une addiction à certains oncogènes forts, comme *HER2* ou *KRAS_{G12V}*, ciblés par des thérapies (Rowald *et al.* 2016). L'instabilité génétique favorise donc la rechute et la persistance de cellules tumorales. Cette capacité est par conséquent une force conductrice de l'oncogenèse, qui confère aux cellules une plasticité pour s'adapter au microenvironnement.

L'instabilité génétique peut être de différents types : l'instabilité nucléotidique qui va concerner l'ensemble des altérations ponctuelles, et l'instabilité chromosomique, la plus fréquente, qui va concerner les altérations numériques et structurales (Abbas *et al.* 2013). Ces deux mécanismes semblent assez exclusifs, en effet les tumeurs ne présentant pas une importante aneuploïdie montrent souvent une instabilité nucléotidique et inversement (Ciriello *et al.* 2013).

1.2. Instabilité nucléotidique

L'instabilité nucléotidique va être la conséquence d'erreurs de réplication ou bien d'altérations au niveau des systèmes de réparation de l'ADN. Elle peut être associée à des altérations germinales dans des voies de réparation comme les mutations des gènes *XPC*, *ERCC2* ou *DDB2*, impliqués dans

le *nucleotide excision repair*, qui vont être responsables de la maladie *xeroderma pigmentosum* (Dworaczek and Xiao 2007). Ces mutations vont conduire à une forte prévalence de mutations et une prédisposition pour des cancers du côlon et de la peau.

De plus, des anomalies dans le système de réparation des séquences microsatellites MMR, notamment au niveau des gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2* vont conduire à des délétions ou des insertions de séquences microsatellites dans le génome. Ceci est observé dans les cancers colorectaux, les tumeurs de l'estomac, de l'endomètre et de l'ovaire (Guillotini and Martin 2014).

1.3. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est observée dans 90% des tumeurs et induit la formation d'altérations numériques et structurales (Sansregret *et al.* 2018). Les tumeurs présentant une instabilité génomique vont donc être caractérisées par une aneuploïdie, des amplifications, des délétions, des translocations, *etc.*

Cette instabilité chromosomique est la conséquence de défauts dans le maintien de l'intégrité chromosomique. Une altération dans un gène régulant ces processus va donc contribuer à l'acquisition d'altérations au cours de l'évolution tumorale. Ainsi, les patients atteints d'un syndrome d'aneuploïdie mosaïque, associé à une mutation inactivatrice constitutionnelle de *BUBR1* (impliqué dans le SAC) ou de *CEP57* (retrouvé au niveau des centrosomes) présentent une prédisposition au développement de tumeurs pédiatriques (Hanks *et al.* 2004). Il a été également démontré le développement de tumeurs, consécutivement à l'induction d'instabilité chromosomique, par inhibition de protéines du SAC dans des modèles murins (Weaver *et al.* 2007 ; Silk *et al.* 2013). Un autre exemple est l'inactivation des protéines BRCA1 et BRCA2, impliquées dans la HR, dans des carcinomes du sein *basal-like* qui favorise l'aneuploïdie et la formation de cassures chromosomiques (Popova *et al.* 2012). La formation de micronoyaux consécutifs à des problèmes de ségrégation participerait également à l'agressivité tumorale (Bakhoun *et al.* 2018). La rupture de ces micronoyaux conduit à la présence d'ADN au niveau du cytoplasme ce qui va activer la voie de signalisation cGAS-STING. Cette voie de

signalisation induit l'activation de la voie non-canonique de NF- κ B qui va alors conduire au développement de métastases (Wang *et al.* 2016).

Cependant, l'instabilité chromosomique des cellules tumorales peut également être délétère et ne contribuerait au développement tumoral que si elle n'excède pas un certain seuil. Dans les tumeurs du sein, de l'ovaire, les tumeurs gastriques et bronchiques non à petites cellules, une instabilité faible ou élevée sont de meilleur pronostic qu'une instabilité intermédiaire (Birkbak *et al.* 2011). Une trop faible instabilité chromosomique ne permettrait pas l'acquisition de nouveaux caractères, alors que l'instabilité trop élevée pourrait générer une perte d'altérations participant à l'oncogenèse. Ceci a d'ailleurs été observé dans des modèles murins inactivés pour une protéine du SAC. L'inactivation totale dans des modèles murins de CENP-E conduit à d'importants problèmes de ségrégation et à la mort à des stades précoces du développement. Alors que les souris CENP-E +/- développent des tumeurs spontanées, l'augmentation de l'instabilité par des carcinogènes inhibe ce développement tumoral (Weaver *et al.* 2007 ; Silk *et al.* 2013).

L'instabilité chromosomique participe à l'évolution tumorale, il est donc nécessaire de l'empêcher dans un contexte normal. Plusieurs mécanismes cellulaires permettent de protéger les cellules vis-à-vis des altérations chromosomiques, agissant comme un *checkpoint* afin de prévenir la conservation de ces cellules anormales et dont l'acteur central serait p53. Ce facteur de transcription va être activé suite à des signaux de stress et va promouvoir l'expression de gènes cibles (Kasthuber and Lowe 2017). Les signaux de stress peuvent être l'hypoxie, le stress oxydatif, les dommages à l'ADN, l'érosion des télomères ou encore l'activation d'un oncogène. Suite à l'activation de p53, diverses réponses cellulaires peuvent être générées telles que l'arrêt du cycle, l'activation de la réparation de l'ADN ou encore l'apoptose. *TP53* est notamment surexprimé dans les cellules aneuploïdes et limiterait la prolifération de ces cellules (Thompson and Compton 2008, 2011). La délétion de *TP53*, situé sur le bras court du chromosome 17, contribue à l'instabilité chromosomique. Lors de la progression tumorale des cellules de l'œsophage, une perte du chromosome 17p est observée avant la formation de cellules aneuploïdes (Blount *et al.* 1994). Par ailleurs, l'acquisition d'altérations

structurales serait dépendante de la perte de p53, permettant alors aux cellules d'acquérir un caryotype complexe (Soto *et al.* 2017). Cependant, cette étude montre également que des anomalies de ségrégation peuvent être tolérées dans des cellules p53 efficaces et des cellules normales et tumorales peuvent être aneuploïdes en présence de protéines p53 normales (Duncan *et al.* 2010). D'autres facteurs participeraient donc à cette régulation.

2. Un modèle darwinien d'évolution

En 1976, Nowell décrit l'évolution tumorale comme étant un processus évolutif, guidé par le cumul de nouvelles altérations, qui serait similaire au modèle d'évolution naturelle des espèces proposé par Darwin (Nowell 1976). Le modèle d'évolution darwinien se base sur trois principes. Le premier est que pour qu'il y ait sélection naturelle, un caractère observé dans une population doit présenter des variations, c'est-à-dire des phénotypes différents. Le deuxième principe est que ces variations doivent conférer un avantage sélectif, soit pour se reproduire, soit pour survivre. Enfin le dernier est que ce caractère doit être héritable.

Selon ce modèle, les tumeurs se développeraient à partir d'une cellule unique qui va accumuler, au fil des mitoses successives, des altérations génétiques d'origines exogènes ou endogènes, propres à l'activité cellulaire basale (**Figure 11** ; Stratton *et al.* 2009). Bien que le plus souvent celles-ci soient corrigées, certaines échappent à la réparation de l'ADN et seront fixées dans le génome de la cellule. Ces mutations peuvent, dans de rares cas, altérer une région génomique et modifier la fonction régulée par cette région, contribuant alors à l'oncogenèse. L'instabilité génétique va ensuite permettre une variation phénotypique en générant des altérations *drivers*, neutres ou même délétères ; elle va induire une hétérogénéité cellulaire au sein de la tumeur. Ces altérations, si elles présentent un avantage sélectif, pourront être transmises au cours des divisions suivantes.

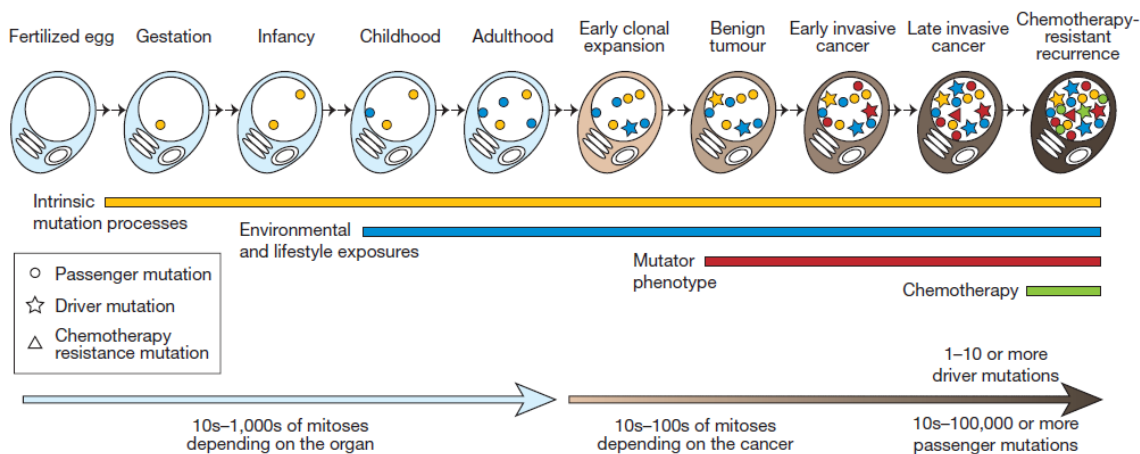


Figure 11 : Modèle d'évolution tumorale à partir de l'œuf fertilisé jusqu'à la cellule cancéreuse. L'acquisition d'altérations génétiques est liée à l'activité cellulaire basale, à l'environnement mais également à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses (indiquée ici par *mutator phenotype* ; (Stratton *et al.* 2009).

L'étude de l'hétérogénéité permet d'inférer l'historique génétique de la tumeur. La plupart des tumeurs évoluent selon un modèle d'évolution ramifiée (Venkatesan and Swanton 2016). Dans ce modèle, des altérations sont présentes dans l'ensemble des cellules de la tumeur, elles sont générées de manière précoce. Elles définissent le dernier ancêtre commun de la population tumorale et donc le tronc de l'arbre phylogénétique de ces tumeurs (**Figure 12**). Puis, consécutivement à l'instabilité génétique, de nouvelles altérations seront formées dans les cellules tumorales et de nouveaux clones vont émerger. Ces altérations vont se retrouver au niveau des ramifications de l'arbre phylogénétique. Cette évolution ramifiée peut être la conséquence de différents types de microenvironnements, conduisant alors à l'émergence de différents clones. Il est également possible que les différentes altérations générées dans les sous-clones résultent au même avantage, et que différentes voies génétiques soient redondantes.

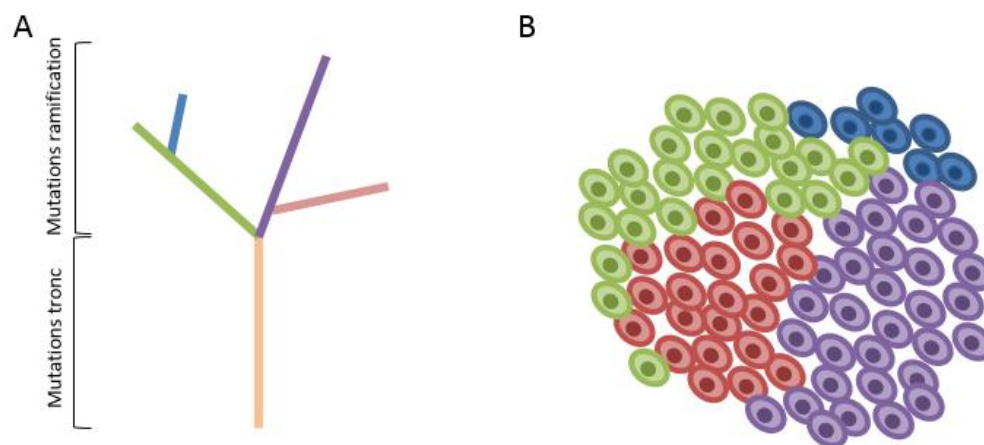


Figure 12 : Evolution tumorale ramifiée.

A/ Divergence génétique des sous clones durant l'évolution tumorale. Les mutations présentes dans le dernier ancêtre commun de ces clones vont être présentes au niveau du tronc de l'arbre phylogénétique. Les mutations acquises exclusivement dans certains clones divergents vont être localisées au niveau des ramifications. B/ Représentation des différents sous clones tumoraux (Burrell and Swanton 2016).

3. Tétraploïdie : une étape intermédiaire de l'évolution tumorale ?

Alors que l'instabilité génétique est un inducteur fort de l'évolution tumorale, celle-ci pourrait être générée par la tétraploïdie. Le doublement du génome est retrouvé dans environ 26% des tumeurs solides et de nombreuses études supportent l'idée que l'état tétraploïde pourrait être un état instable favorisant la formation d'altérations génomiques (Gerlinger *et al.* 2014 ; Tanaka *et al.* 2018).

Un modèle de l'oncogenèse faisant intervenir la tétraploïdie comme étape intermédiaire de l'aneuploïdie dans les cancers a été proposé. Ce modèle est supporté par des études démontrant que le doublement du génome peut induire la tumorigenèse et affecter la stabilité du génome (Fujiwara *et al.* 2005 ; Davoli *et al.* 2010). De plus, la surexpression de *KIF11*, *MAD2* ou de *AURKA*, gènes qui participent à la ségrégation correcte des chromosomes, conduit à la formation de cellules tétraploïdes avec une capacité oncogénique (Meraldi *et al.* 2004 ; Sotillo *et al.* 2007 ; Castillo *et al.* 2007). Un doublement du génome est observé dans 11 à 64% des tumeurs et cet évènement est associé à un nombre important de réarrangements chromosomiques et un mauvais pronostic (Carter *et al.* 2012 ; Zack *et al.* 2013 ; Dewhurst *et al.* 2014).

La formation de cellules tétraploïdes peut avoir diverses origines comme la fusion cellulaire, une cytokinèse abortive, un défaut du sillon de clivage ou la présence d'un chromosome retardataire lors de la cytokinèse, conduisant à un arrêt de la division et à la formation de cellules binucléées (Brito and Rieder 2006; Mullins and Biesele 1977; Shi and King 2005). Enfin, l'endoréplication, correspondant à un cycle cellulaire dans lequel la réplication de l'ADN n'est pas suivie par une division cellulaire, peut conduire à la tétraploïdisation.

Le doublement du contenu génomique pourrait participer à l'oncogenèse en favorisant la diversité génétique, notamment en générant des erreurs de ségrégation par la présence de centrosomes surnuméraires dans les cellules tétraploïdes (Ganem *et al.* 2009). De plus, la formation de cellules tétraploïdes peut causer des dommages à l'ADN et des réarrangements structuraux. Un travail sur la levure a démontré que la présence d'une double quantité d'ADN conduit à une diminution du recrutement de la machinerie de réparation, voire à une saturation, favorisant alors les anomalies chromosomiques (Storchová *et al.* 2006). La tétraploïdie est donc un état instable favorisant la restructuration du génome. En plus de favoriser l'instabilité, la tétraploïdie pourrait également être un état permissif aux altérations génomiques (Dewhurst *et al.* 2014). Il a ainsi été démontré que les cellules tétraploïdes sont plus tolérantes à l'aneuploïdie comparées aux cellules diploïdes (Ganem *et al.* 2007 ; Dewhurst *et al.* 2014). Alors que l'aneuploïdie est un perturbateur général de la survie cellulaire induisant des modifications sévères dans l'expression des gènes, la perte ou le gain d'un chromosome dans des cellules tétraploïdes auraient un effet moindre que dans des cellules diploïdes (Tanaka *et al.* 2018).

Cet évènement de restructuration du génome s'inscrit alors comme un processus évolutif important. Par ailleurs, ce mécanisme est bien décrit lors de l'évolution de certaines espèces et des évènements de tétraploïdisation sont fréquemment observés lors de l'évolution des plantes (Simillion *et al.* 2002). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, trois évènements de doublement du génome ont été identifiés au cours de l'évolution. Ces évènements permettent la divergence de fonction des gènes

dupliqués et l'acquisition de nouvelles fonctions à travers la génération d'altérations chromosomiques numériques et structurales. Ceci pourrait expliquer pourquoi le doublement du génome est fréquemment observé dans des phases précoces du développement tumoral. Ce mécanisme pourrait donc participer à l'évolution tumorale. Il a été observé chez un patient présentant un cancer du rein que les sites métastatiques comprenaient des cellules tétraploïdes alors que la tumeur primaire était majoritairement diploïde, suggérant ainsi que la tétraploïdie participerait à l'évolution tumorale et permettrait l'acquisition de nouvelles capacités (Gerlinger *et al.* 2012). Dans des conditions précancéreuses dans l'œsophage, la formation de cellules tétraploïdes est suivie par de l'aneuploïdie (Galipeau *et al.* 1996 ; Barrett *et al.* 2003). La tétraploïdisation est aussi observée à des stades précoces du cancer du côlon, du cancer du sein et du cancer cervical (Dutrillaux *et al.* 1991 ; Levine *et al.* 1991 ; Olaharski *et al.* 2006). Ceci soutient le modèle d'instabilité génétique « diploïdie-tétraploïdie-aneuploïdie » qui participerait à la progression tumorale (Gerlinger *et al.* 2014).

F. Conclusion

Le développement tumoral est un processus évolutif dans lequel les altérations génétiques vont permettre aux cellules d'acquérir de nouvelles fonctions leur permettant de survivre. Une restructuration de leur génome va être un élément majeur de l'évolution tumorale. L'importante divergence observée entre les cellules tumorales et les cellules normales aux points de vue génotypique et phénotypique a ainsi conduit à l'établissement d'une nouvelle vision. Selon Duesberg, les cellules cancéreuses ne sont pas des cellules normales dont le comportement est modifié, mais seraient une nouvelle espèce créée à partir du génome de l'individu (Duesberg and Rasnick 2000 ; Duesberg *et al.* 2011).

Bien que les phénotypes observés dans les cellules cancéreuses soient souvent similaires, phénotypes définis par Hanahan et Weinberg dans les « *Hallmarks of Cancer* », le moyen de générer ces caractéristiques est variable en fonction des types tumoraux. Ainsi, l'oncogenèse est la conséquence d'une accumulation d'altérations et d'une instabilité génétique spécifiques du type tumoral.

Cette grande divergence est notamment observée dans les sarcomes. Ces tumeurs d'origine mésenchymateuse sont catégorisées en deux groupes génétiques distincts, dans lesquels les mécanismes conduisant à l'oncogenèse sont très différents.

II. ALTERATIONS GENOMIQUES ET SARCOMES

A. Caractéristiques cliniques et pathologiques des sarcomes

1. Descriptions de la pathologie

Les sarcomes forment un groupe rare et très hétérogène de tumeurs d'origine mésenchymateuse (Fletcher *et al.* 2013). Ce groupe de tumeurs est divisé en 80 types histologiques, classés en fonction de la morphologie et de la différenciation cellulaire des tumeurs. Chaque type histologique est associé à des comportements cliniques, pronostiques et thérapeutiques spécifiques. Il existe trois catégories de sarcomes : les sarcomes osseux, les sarcomes viscéraux et les sarcomes des tissus mous (STM). Dans ce manuscrit, nous allons principalement nous intéresser aux STM. Dans 40 à 50% des cas, ces tumeurs disséminent en métastases cinq ans après le diagnostic et le site métastatique principal est situé au niveau des poumons (Fletcher *et al.* 2013). Le traitement majeur de ces tumeurs est la chirurgie.

En plus de leur diversité histologique et clinique, les STM présentent également une grande hétérogénéité au niveau de leur localisation. En effet, 40% des STM sont présents au niveau du tronc (17% au niveau thoracique, 9% du rétro péritoine, 8% du pelvis et 6% de l'abdomen) et 60% se développent au niveau périphérique (49% au niveau des membres et 11% de la tête et du cou ; Ducimetière *et al.* 2011; Honoré *et al.* 2015).

Les STM représentent 1% des cancers de l'adulte avec une incidence de 3,6 cas pour 100 000 habitants par an en France (Ducimetière *et al.* 2011). Cette incidence est variable en fonction du type histologique, avec une prédominance de liposarcomes (25%), de sarcomes indifférenciés (21,8%) et de léiomyosarcomes (17,1% ; Neuville and Coindre 2013 ; Honoré *et al.* 2015).

Le ratio global homme-femme est de 1,1/1 avec des prépondérances variables en fonction du type histologique (les STM touchent 57% d'hommes et les sarcomes viscéraux concernent 59% de femmes). L'âge médian au diagnostic est de 60 ans, allant de 0 à 92 ans (**Figure 13**).

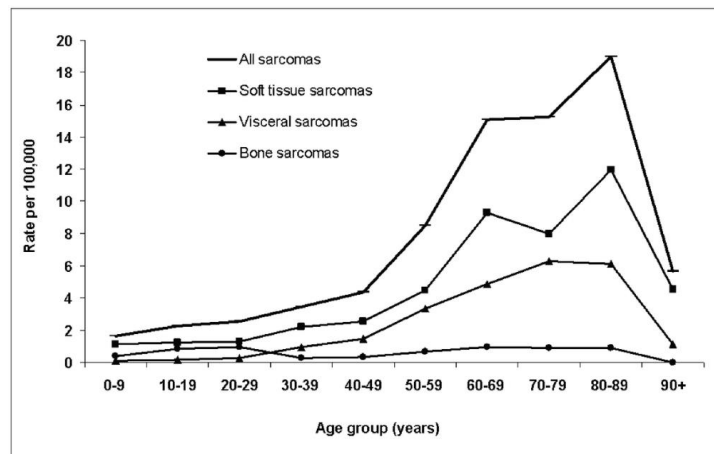


Figure 13 : Incidence des différents types de sarcomes en fonction de l'âge.
(Ducimetière *et al.*, 2011)

2. Etiologie

L'étiologie des STM est inconnue, la plupart se développe *de novo*, sans facteur causal identifié. Dans quelques cas, le développement d'un STM se trouve associé à un facteur étiologique.

Susceptibilité génétique. Depuis plusieurs années il est établi que des altérations génétiques héréditaires peuvent influencer sur la prévalence de certains cancers. C'est également le cas dans le cadre des STM (Fletcher *et al.* 2013). Les plus récurrents sont :

- Le syndrome de Li-Fraumeni : un syndrome autosomique dominant dû à une mutation de type « perte de fonction » du gène *TP53* (Li and Fraumeni 1969) qui est associé au développement d'ostéosarcomes, de rhabdomyosarcomes et de léiomyosarcomes (Ognjanovic *et al.* 2012).
- La neurofibromatose de type 1 : maladie autosomique dominante provoquée par une mutation inactivatrice du gène *NFI* (Sørensen *et al.* 1986). Cette altération est associée au développement de tumeurs malignes des gaines nerveuses périphériques (MPNST) et de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST ; Zöller *et al.* 1997).
- Le syndrome héréditaire du rétinoblastome : causé par la mutation germinale du gène *RBI*. Dans 90% des cas, les patients développent un rétinoblastome bilatéral suite à l'inactivation, dans un second temps, de la deuxième copie de *RBI* (Knudson 1971). Les survivants ont un haut risque

de développer par la suite de nouvelles tumeurs primaires avec une forte prévalence de léiomyosarcomes et d'ostéosarcomes (MacCarthy *et al.* 2013).

Prédisposition génétique. Parmi 72 gènes prédisposant à la survenue d'une tumeur, une analyse d'association rapporte que la moitié des patients développant un sarcome présente une variation constitutive pathogénique d'au moins un de ces gènes (Ballinger *et al.* 2016). Les gènes *TP53*, *ATM*, *ATR*, *BRCA2* et *ERCC2* sont les plus fréquemment retrouvés dans cette analyse.

Infection virale et immunodéficience. La relation entre une infection virale et le développement de sarcomes a pu être établie dans deux cas. Le virus HHV-8 est associé au développement de sarcome de Kaposi (Chang *et al.* 1994) et son incidence varie en fonction du statut immunitaire du patient avec une incidence augmentée chez les patients immuno-déficients (Koelle *et al.* 1997). Le développement de léiomyosarcomes est associé à une infection au virus Epstein-Barr chez des jeunes adultes séropositifs pour le VIH (McClain *et al.* 1995).

Trauma et chirurgie. Plusieurs cas de STM développés sur des tissus blessés, notamment par brûlure, ou ayant subi une chirurgie ont été rapportés (Willan 1930 ; Sherlock *et al.* 1987 ; Dijkstra *et al.* 1995 ; Can *et al.* 1998 ; Ozercan *et al.* 2004 ; Pol *et al.* 2012). Le mécanisme conduisant à la formation de STM suite à une blessure n'est pas entièrement compris. L'induction de blessures musculaires par des cardiotoxines dans un modèle *in vivo* de souris *Pax7^{CreER/+};Kras^{LSL-G12D/+};Trp53^{flax/flax}* favorise la formation de sarcomes pléomorphes au niveau du site blessé (Van Mater *et al.* 2015).

Carcinogènes chimiques. Plusieurs études ont pu démontrer une augmentation du nombre de STM après des expositions à des herbicides phénoxyacétiques, des chlorophénols et leurs contaminants chez des agriculteurs (Eriksson *et al.* 1981, 1990).

Radiation. Les sarcomes développés sur territoires irradiés (RIS, *Radiation-Induced Sarcoma*) sont des tumeurs qui se développent secondairement suite à un traitement par radiothérapie d'une première tumeur de type histologique différent (Gladdy *et al.* 2010). La fréquence des sous-types histologiques observée dans les RIS est différente de celle observée dans les sarcomes sporadiques : 30% de sarcomes pléomorphes indifférenciés, 21% d'angiosarcomes, 12% de léiomyosarcomes et 12% de fibrosarcomes.

3. Classification des STM

3.1. Classification histologique

Une description histologique complète des STM a été établie par l'organisation mondiale de la santé (OMS ; Fletcher *et al.* 2013). Celle-ci décrit 12 catégories principales, basées sur la ligne de différenciation cellulaire prise par la tumeur, c'est-à-dire celle ressemblant à l'aspect d'un tissu normal (Tableau 3, Figure 14).

Tumeurs adipeuses
Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques
Tumeurs fibrohistiocytiques
Tumeurs musculaires lisses
Tumeurs péri-angiocytiques (péri vasculaires)
Tumeurs musculaires squelettiques
Tumeurs vasculaires
Tumeurs osseuses et cartilagineuses
GIST (tumeur stromale gastro intestinale)
Tumeurs à différenciation de gaine nerveuse
Tumeurs à différenciation incertaine
Sarcomes inclassés ou indifférenciés

Tableau 3 : Les 12 lignes de différenciation observées dans les STM d'après la classification de l'OMS.

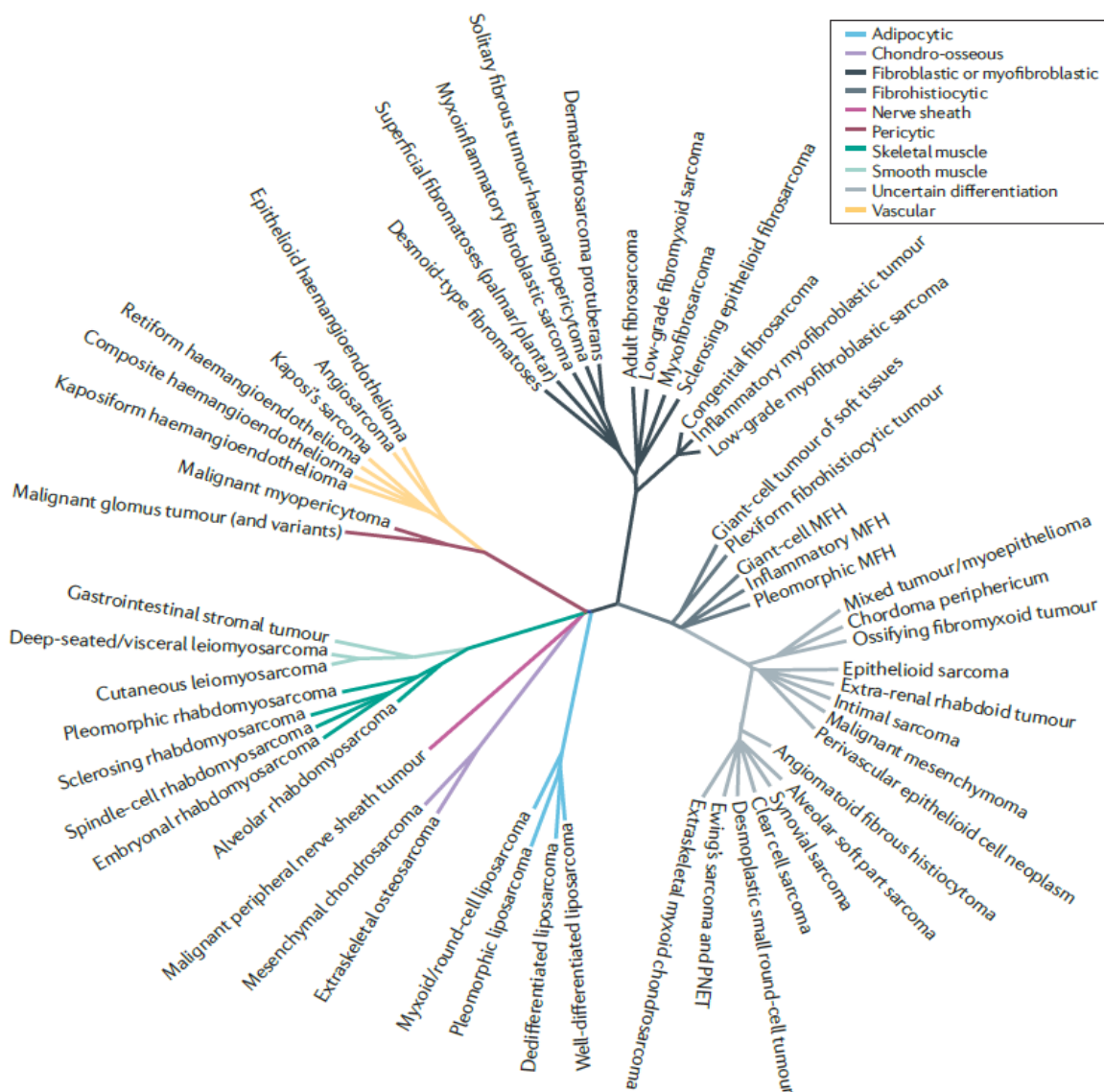


Figure 14 : Taxonomie des STM.

Cette classification reflète les différents types histologiques en fonction de leur ligne de différenciation, de l'altération moléculaire observée ainsi que des paramètres supplémentaires. MFH correspond aux sarcomes pléomorphes indifférenciés et PNET aux tumeurs neuroectodermiques primitives (Taylor *et al.*, 2011).

La classification histologique des STM est complétée par une analyse morphologique, des analyses immuno-histochimiques ainsi que par des analyses moléculaires (décrites dans la partie **1.II.B**). L'ensemble de ces données permet de définir l'entité à laquelle appartient chaque tumeur. Cependant, certaines tumeurs ne montrent ni ligne de différenciation ni marqueur moléculaire particulier et sont regroupées dans le groupe des sarcomes indifférenciés.

3.2. Grade histologique FNCLCC

La classification histologique ne permet pas, à elle seule, de prédire le devenir clinique de la pathologie. Afin d'évaluer le risque métastatique de chaque tumeur, des systèmes de grades ont été établis (Fletcher *et al.* 2013). Parmi ces systèmes, la référence internationale la plus utilisée est celle de la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC ; Trojani *et al.* 1984; Coindre 2006). Il est basé sur trois critères : la différenciation tumorale, le pourcentage de nécrose au sein de la tumeur et le nombre de mitoses (mesuré sur une surface de champ [=HPF] de 0.1734 mm²). Un score est alors attribué pour chaque critère, et le grade est obtenu par l'addition des scores de chaque paramètre (**Tableau 4**). Le grade 1 est associé aux tumeurs de bon pronostic, le grade 3 pour celles présentant un haut risque de développer des métastases et le grade 2 est un groupe de tumeurs à agressivité intermédiaire (**Figure 15**).

<p>Différenciation tumorale</p> <p>Score 1: Sarcomes ressemblant au tissu mésenchymateux adulte normal</p> <p>Score 2: Sarcomes dont le type histologique est incertain</p> <p>Score 3: Sarcomes indifférenciés et embryonnaires, sarcomes au type tumoral douteux et certain sous-type histologique</p>
<p>Comptage du nombre de mitoses</p> <p>Score 1: 0-9 mitoses par 10 HPF</p> <p>Score 2: 10-19 mitoses par 10 HPF</p> <p>Score 3: ≥ 20 mitoses par 10 HPF</p>
<p>Nécrose tumorale</p> <p>Score 0: aucune nécrose</p> <p>Score 1: < 50% de nécrose tumorale</p> <p>Score 2: ≥ 50% de nécrose tumorale</p>
<p>Grade histologique FNCLCC</p> <p>Grade 1: score total 2,3</p> <p>Grade 2: score total 4,5</p> <p>Grade 3: score total 6, 7, 8</p>

Tableau 4 : Grade FNCLCC, définition des paramètres
(adapté de Trojani *et al.*, 1984)

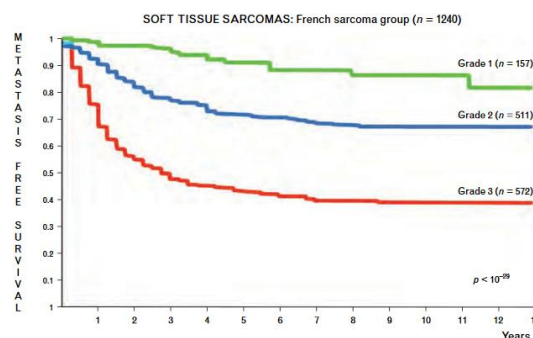


Figure 15 : Courbe de survie sans métastase en fonction du grade FNCLCC pour une cohorte de 1 240 patients.

Le grade 1 est représenté en vert, le grade 2 en bleu et le grade 3 en rouge (Neuville *et al.* 2014).

Le grade FNCLCC présente cependant de nombreuses limitations. Il ne peut être utilisé que sur des tumeurs primaires de STM et doit être établi à partir d'un matériel bien représentatif de la tumeur et non pas sur des microbiopsies (Fletcher *et al.* 2013). De plus, il ne peut substituer le diagnostic histologique et ne permet pas de différencier les tumeurs de bon ou de mauvais pronostic dans 40% des cas (grade 2). Enfin, le grade ne permet pas d'évaluer le risque métastatique des MPNST et des rhabdomyosarcomes (Coindre *et al.* 2001).

B. Les sarcomes : des maladies chromosomiques

Comme annoncé précédemment, l'ensemble des sarcomes est subdivisé en plus de 80 sous-types histologiques. En plus des caractéristiques cliniques et morphologiques, les STM présentent des caractéristiques génétiques propres (Taylor *et al.* 2011; Fletcher *et al.* 2013).

Que ce soit lors de leur développement ou de leur évolution, la grande majorité de ces tumeurs est caractérisée par des anomalies chromosomiques. Elles peuvent être classées en deux grands groupes : les sarcomes à « génétique simple » et les sarcomes dits à « génétique complexe ». Les premiers présentent une altération spécifique *driver* forte, associée à des comportements cliniques caractéristiques. Les seconds, les sarcomes à « génétique complexe », présentent de nombreux réarrangements génétiques, sans altération spécifique et récurrente. L'oncogenèse de ces deux groupes est donc la conséquence d'anomalies génétiques différentes.

1. Les sarcomes à « génétique simple »

Ces tumeurs sont caractérisées par une altération génétique simple, spécifique et récurrente (Taylor *et al.* 2011). Les anomalies oncogéniques de ces sarcomes sont de deux types : des gènes de fusion ou des mutations. Ces altérations semblent être, par leur récurrence, fondamentales pour le développement de ces tumeurs.

1.1. Les sarcomes à mutation ponctuelle

Cinq sarcomes sont actuellement caractérisés par une mutation spécifique, dont les plus connus sont les GIST.

Ces tumeurs sont les sarcomes les plus fréquemment observés au niveau du tractus intestinal, 80% sont caractérisés par des mutations activatrices au niveau des exons 9, 11, 13 et 17 du gène *KIT* (Hirota 1998 ; Rubin *et al.* 2001 ; Wardelmann *et al.* 2003 ; Heinrich *et al.* 2003b). Ce gène code pour un récepteur tyrosine kinase et les mutations permettent une activation constitutionnelle de la protéine et l'activation des voies de signalisation MAPK3/1, AKT, STAT1 et STAT3 (Heinrich *et al.* 2002 ; Duensing *et al.* 2004). En absence de mutations de *KIT*, le gène *PDGFRA* est muté au niveau des exons 12, 14 et 18 dans 8% des GIST (Heinrich *et al.* 2003a ; Lasota *et al.* 2004). Les patients ne présentant pas d'altération de ces deux gènes montrent des altérations oncogéniques des gènes *NF1*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* et *SDHB/SHDC* (Blay *et al.* 2012). Alors que ces altérations sont essentielles pour le développement de ces tumeurs, d'autres altérations ont été décrites. La perte du chromosome 14 ou de la région 14q, inactivant le gène *MAX*, a été observée chez deux tiers des patients et la délétion du bras long du chromosome 22 est identifiée dans 50% des GIST (el-Rifai *et al.* 1996 ; Rubin *et al.* 2007 ; Schaefer *et al.* 2017). Les pertes des chromosomes 1p, 9p, 11p et 17p, bien que moins fréquentes, sont associées à leur progression tumorale (O'Leary *et al.* 1999 ; Kim *et al.* 2000 ; Lagarde *et al.* 2012).

1.2. Les sarcomes à « translocation »

Pendant longtemps, les translocations chromosomiques et les gènes de fusion ont été associés aux tumeurs hématologiques (Mitelman *et al.* 2007). Toutefois, en 1983, la première translocation dans des tumeurs solides a été identifiée dans les sarcomes d'Ewing (Aurias *et al.* 1983 ; Turc-Carel *et al.* 1983). Cette translocation entre le chromosome 11 et le chromosome 22 (t(11;22)(q24;q12)) conduit à la fusion des gènes *EWSR1* et *FLII* (Delattre *et al.* 1992, 1994). Dans le sous-groupe des sarcomes à « translocation », un réarrangement chromosomique structural est associé à un type histologique (Mertens *et al.* 2010, 2015). Ces réarrangements vont permettre soit la formation d'un gène de fusion, soit la juxtaposition d'une région régulatrice activatrice et d'un oncogène. Alors que

dans la grande majorité des cas, une translocation est à l'origine de ces altérations, elles peuvent également être causées par d'autres mécanismes comme des délétions ou encore des réarrangements plus complexes. Ainsi, le gène de fusion des sarcomes d'Ewing peut être formé lors d'un mécanisme de *chromoplexy*, phénomène retrouvé dans 42% de la cohorte d'une étude récente (Anderson *et al.* 2018).

Ces altérations sont spécifiquement retrouvées dans un type histologique. Elles peuvent être les seules représentantes (*NAB2-STAT6* dans les tumeurs fibreuses solitaires ; Chmielecki *et al.* 2013; Robinson *et al.* 2013), ou plusieurs altérations différentes vont être associées à un type histologique (*FUS-DDIT3* et *EWSR1-DDIT3* sont retrouvés dans les liposarcomes myxoïdes ; Dal Cin *et al.* 1997).

Les translocations génèrent deux types d'altérations :

- **Formation d'un gène de fusion.** Dans les sarcomes, la plupart des gènes de fusion vont impliquer des facteurs de transcription pour permettre la dérégulation transcriptomique de gènes cibles. C'est notamment le cas dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires qui possèdent une translocation t(2;13)(q35;q14) entre les gènes *PAX3* et *FOXO1* (Turc-Carel *et al.* 1986). Suite à réarrangement, le domaine C-terminal de trans-activation de FOXO1 est associé au domaine de liaison à l'ADN de PAX3 (Galili *et al.* 1993). Cette protéine chimérique va réguler l'expression de centaines de gènes, notamment des gènes de la différenciation musculaire striée (Ebauer *et al.* 2007). Les autres gènes de fusion vont conduire à la formation de protéines chimériques, ayant soit un rôle tyrosine kinases soit un rôle de facteur de croissance, qui seront alors activées de manière constitutive. Ce type d'altération est observé dans les fibrosarcomes congénitaux avec la translocation t(12;15)(p13;q25) permettant la fusion des gènes *ETV6* et *NTRK3* (Knezevich *et al.* 1998). Suite à la fusion, le domaine de dimérisation d'*ETV6* est conservé et est associé au domaine tyrosine kinase de *NTRK3*, qui aura perdu, lors de la fusion ses domaines de régulations.

- **Régulation de l'expression d'un oncogène.** Les dermatofibrosarcomes de Darrier Ferrand vont présenter une translocation t(17;22)(q22;q13) résultant en la fusion des deux premiers exons de *COL1A1* et de *PDGFB* (moins l'exon 1 non-codant). Cette altération permet une surexpression

et l'activation constitutionnelle de PDGFB et mène à une prolifération incontrôlée des cellules (Pedoutour *et al.* 1996 ; O'Brien *et al.* 1998).

1.3. Les *drivers* forts de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique simple »

Les sarcomes à « génétique simple » présentent une altération récurrente et spécifique. Ces sarcomes ont un génome relativement simple, ne présentant le plus souvent que cette altération, ce qui suggère que ce sont bien des événements précoces et des altérations *drivers* de l'oncogenèse. L'introduction dans des fibroblastes murins NIH3T3 du gène de fusion *EWS-FLI* entraîne une transformation cellulaire (May *et al.* 1993). En revanche, cette même introduction dans des fibroblastes primaires humains et murins induit l'arrêt de la prolifération ou la mort cellulaire (Lessnick *et al.* 2002). La capacité oncogénique de ces altérations dépendrait donc d'un fond génétique particulier.

Chaque altération génétique oncogène des sarcomes à « génétique simple » définit des groupes homogènes d'un point de vue transcriptomique (Segal *et al.* 2003 ; Baird *et al.* 2005 ; Pierron *et al.* 2012 ; Watson *et al.* 2018; **Figure 16**). Ces altérations participent alors largement à l'oncogenèse de ces tumeurs et sont associées à une différenciation tumorale spécifique.

Cette différenciation peut être la conséquence de la formation de cette altération dans un lignage cellulaire spécifique et/ou à un stade précis de la cellule au cours du développement (Haldar *et al.* 2007 ; Tirode *et al.* 2007 ; Han *et al.* 2016). L'expression de *SS18-SSX2*, l'un des gènes de fusion spécifique des synovialo-sarcomes, dans des modèles murins génère des tumeurs similaires à celles observées chez l'humain lorsque celle-ci est induite dans des myoblastes exprimant *MYF5* (Haldar *et al.* 2007). Dans des cellules musculaires plus avancées dans la différenciation, cette expression ne conduit pas au développement tumoral.

L'oncogenèse de ces tumeurs serait donc la conséquence d'une altération *driver* forte, associée à la différenciation cellulaire et à un stade de développement précis.

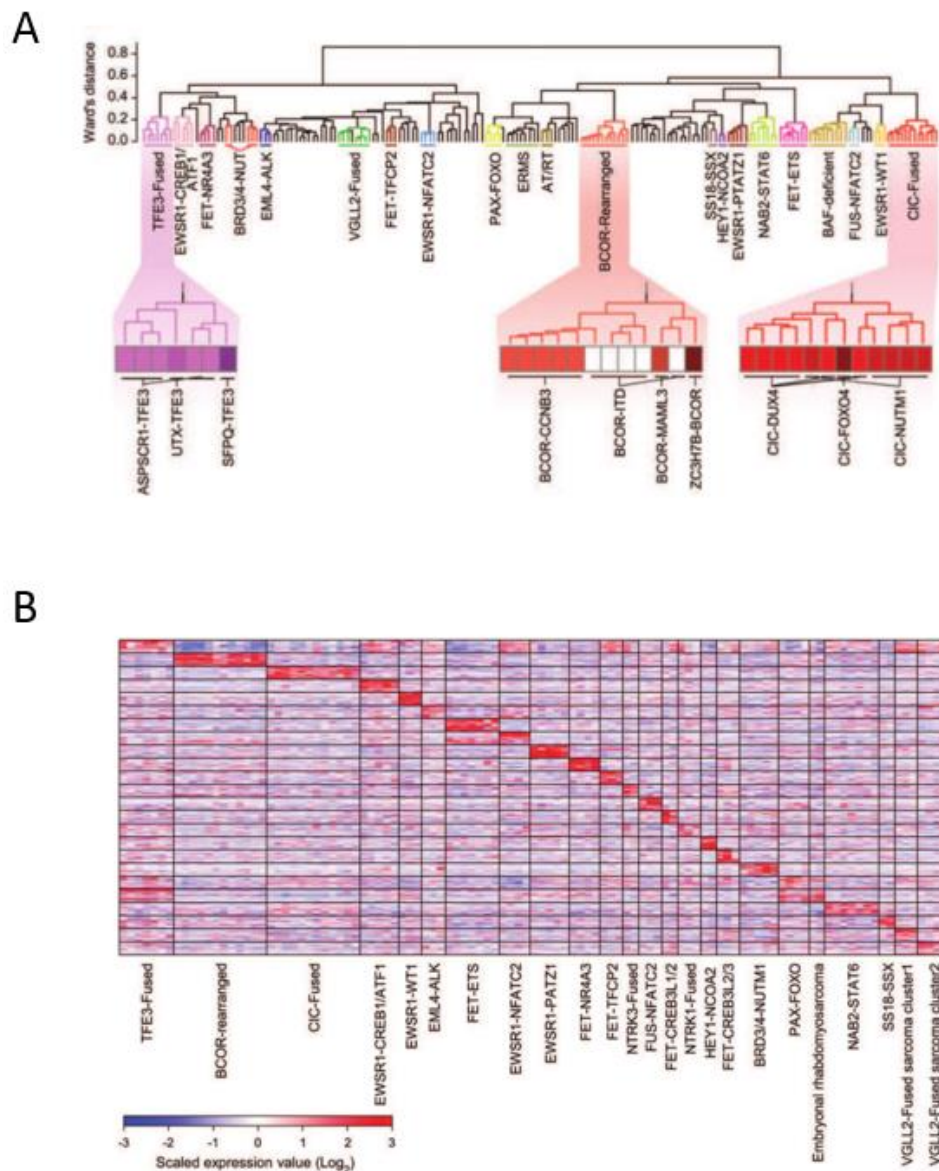


Figure 16 : Caractérisation transcriptomique de 24 différents groupes de sarcomes à petites cellules rondes.

A / Classification de 184 sarcomes à petites cellules rondes en fonction des profils d'expressions. Les différents gènes de fusion sont indiqués sous le *clustering* et sont représentés par groupe de couleur.
 B/ Profil d'expression des 24 différents groupes de sarcomes à petites cellules rondes définis en fonction de leur altération (Watson *et al.* 2018).

2. Les sarcomes à « génétique complexe »

2.1. Types histologiques des sarcomes à génétique complexe

La moitié des STM est composée de tumeurs non-caractérisées par une altération récurrente et spécifique, mais par un remaniement génomique important (Guillou and Aurias 2010 ; Fletcher *et al.* 2013). Cette seconde catégorie de sarcomes a été mon modèle d'étude lors de ma thèse.

Les sarcomes à « génétique complexe » sont composés en majorité des sarcomes pléomorphes tels que :

- les **léiomyosarcomes** (LMS) représentent 8 à 10% des STM (Fletcher *et al.* 2013). Ces tumeurs montrent une différenciation musculaire lisse variable. On les retrouve principalement chez les patients âgés et leur comportement clinique dépend majoritairement de leur localisation.

- les **sarcomes pléomorphes indifférenciés** (UPS, pour *undifferentiated pleomorphic sarcomas* anciennement appelés *malignant fibrous histiocytomas*, MFH) ne présentent aucune différenciation cellulaire caractéristique et sont un diagnostic d'exclusion. Ces tumeurs sont de haut grade et représentent 5 à 7% des STM.

- les **myxofibrosarcomes** (MFS) ont longtemps été classés parmi les MFH (Mentzel *et al.* 1996 ; Fletcher *et al.* 2013). Ces tumeurs composent un groupe encore mal défini mais ils sont caractérisés par une croissance multi-nodale et la présence d'une matrice extra cellulaire myxoïde composée d'acide hyaluronique.

- les **liposarcomes pléomorphes** (PLPS, pour *pleomorphic liposarcomas*) est l'entité la plus rare de l'ensemble des liposarcomes (5%), composée de zones lipogéniques et de zones sans différenciation identifiable (Gebhard *et al.* 2002 ; Hornick *et al.* 2004 ; Fletcher *et al.* 2013). Ils sont majoritairement observés chez les patients âgés au niveau des extrémités inférieures.

- les **rhabdomyosarcomes pléomorphes** (PRMS, pour *pleomorphic rhabdomyosarcomas*) sont présents au niveau des extrémités de l'adulte d'âge moyen et représentent moins de 1% de l'ensemble des sarcomes (Furlong *et al.* 2001 ; Parham and Ellison 2006 ; Fletcher *et al.* 2013). Ce sont des tumeurs agressives, 70% des patients décèdent dans les deux ans qui suivent le diagnostic.

- les **MPNST** présentent une différenciation semblable aux gaines nerveuses (différenciation Schwannienne) et représentent 5 à 8% des STM (Fletcher *et al.* 2013).
- Les **liposarcomes dédifférenciés** (DDLPS, *dedifferentiated liposarcoma*) sont caractérisés par une différenciation adipeuse (Fletcher *et al.* 2013).
- *etc.*

2.2. Le génome des sarcomes à « génétique complexe »

2.2.1. Caractérisation cytogénétique de leur génome

Ces tumeurs présentent un génome aneuploïde avec de nombreuses altérations structurales et/ou numériques (**Figure 17**). Une analyse comparative des données génomiques et transcriptomiques entre des sarcomes à « génétique complexe » et 33 autres types tumoraux analysés montre que ce sont les tumeurs possédant la plus haute fréquence d'altérations numériques et un faible taux de mutation ponctuelle (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Leurs génomes ont également de nombreux réarrangements structuraux et des régions chromothriptiques ont été identifiées dans 35% des LMS (Chudasama *et al.* 2018).

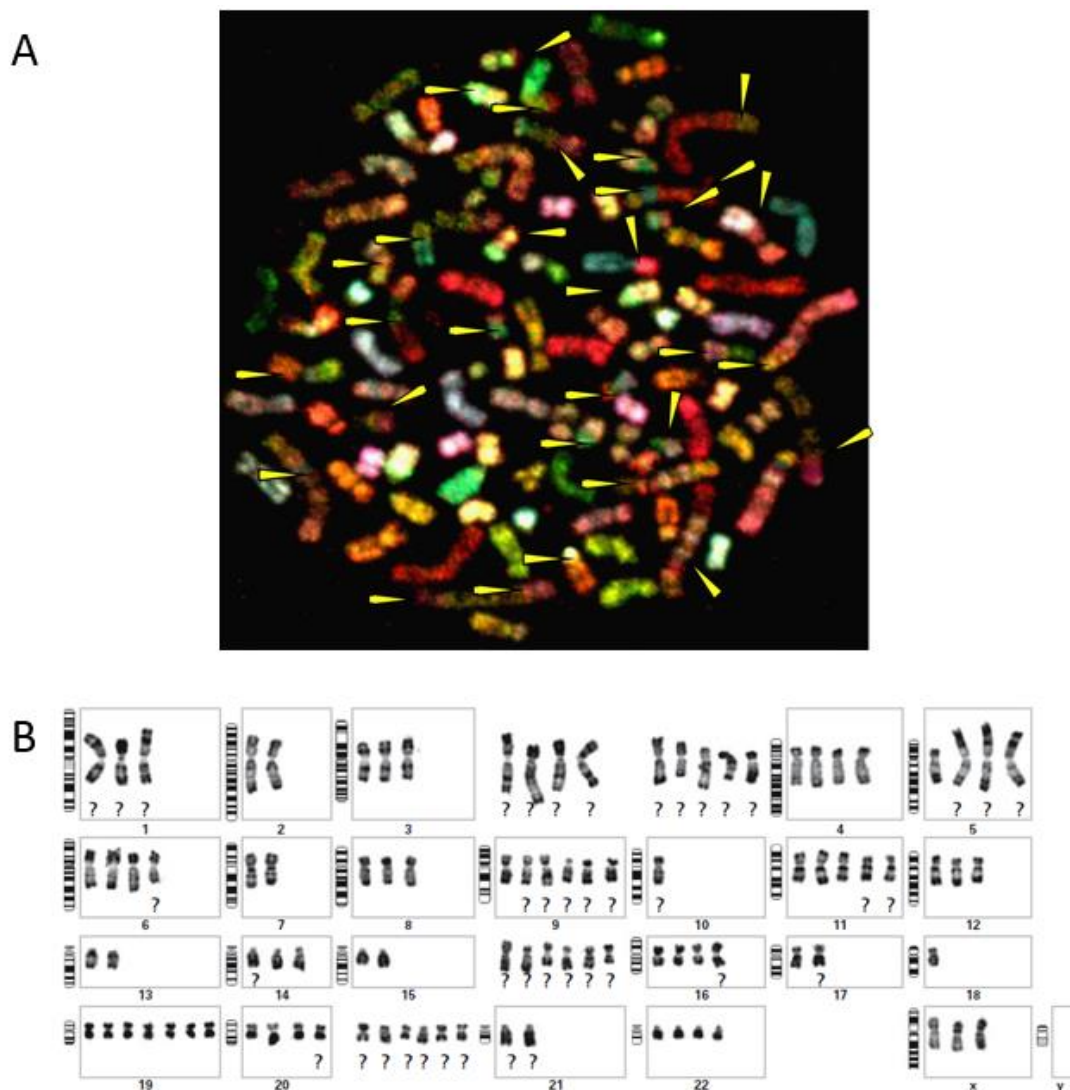


Figure 17 : Caractérisation cytogénétique des sarcomes à « génétique complexe ».
A/ FISH 24 couleurs de la lignée de sarcome pléomorphe indifférencié COMA. Chaque paire de chromosomes est hybridée à l'aide de sondes couplées à une combinaison de fluorochromes spécifiques. Les flèches jaunes indiquent les chromosomes comportant des translocations inter-chromosomiques. Dans cet exemple, 30 translocations sont observées (adaptée de Mairal *et al.* 2000).
B/ Caryotype d'un UPS de haut grade. Certains chromosomes ne peuvent être classés au vu de leur nombre important de réarrangements et sont indiqués par un « ? » (Chibon and Aurias 2007).

Alors que d'un point de vue génomique ces tumeurs ne peuvent être associées à une altération spécifique, elles peuvent en revanche être classées en fonction du nombre et du type d'altérations chromosomiques (Chibon *et al.* 2010). Deux profils génomiques différents sont donc retrouvés (Figure 18) :

- Des tumeurs avec moins de 30 altérations génomiques et dont les réarrangements génomiques concernent des pertes ou des gains de bras chromosomiques ou de chromosomes entiers : ces profils sont dits à « bras ».

- Des tumeurs dont le génome possède de nombreuses altérations génomiques (entre 30 et 85 altérations chromosomiques) : ce sont les profils dits réarrangés. Les types de réarrangements de ces tumeurs sont des pertes et des gains de chromosomes ainsi que des altérations structurales.

Cette classification génomique est significativement associée au grade histologique FNCLCC ($P = 0,001$), les profils à « bras » étant de meilleur pronostic que les profils réarrangés.

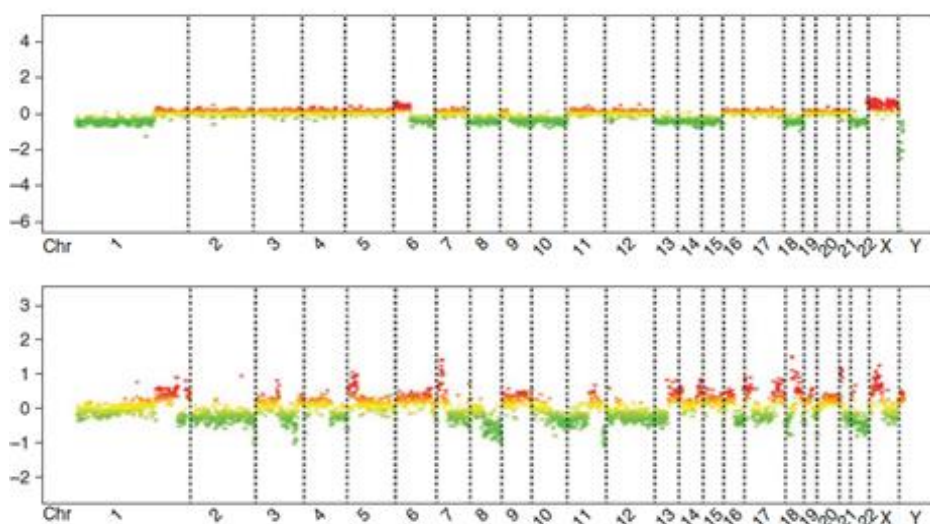


Figure 18 : Les deux types de profils génomiques observés dans les sarcomes à « génétique complexe ».

Le profil du haut correspond aux profils « à bras » et celui du bas aux profils réarrangés. L'axe des X correspond aux chromosomes de 1 à Y ; l'axe des Y représente le log2 ratio de l'ADN de la tumeur d'intérêt comparé à un ADN de référence (adapté de Chibon *et al.* 2010).

2.2.2. Altérations récurrentes

Actuellement, aucune altération spécifique n'a été associée à un type histologique. De plus, contrairement aux sarcomes à « génétique simple », une analyse non-supervisée de leur expression ne permet pas de distinguer les différents types histologiques (Gibault *et al.* 2011 ; **Figure 19**).

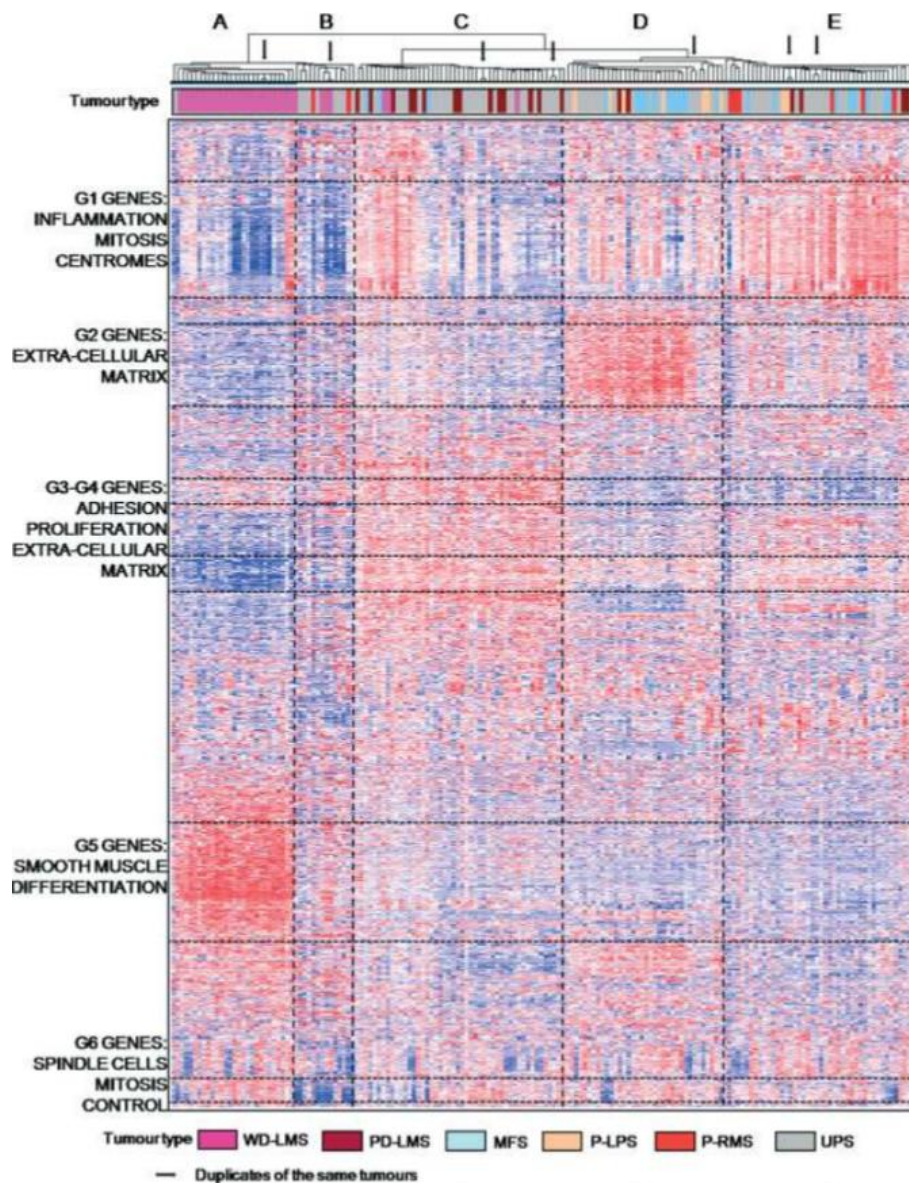


Figure 19 : Classification non-supervisée des données d'expression de 160 sarcomes à « génétique complexe ».

Dans cette étude, les tumeurs ont été classées en cinq groupes indiqués en haut de la classification (de gauche à droite ; A-E). Les types histologiques sont indiqués par des couleurs spécifiques. Les duplicats ou les récurrences de la même tumeur sont représentés par les barres noires verticales. Dans le graphique, les données d'expression sont symbolisées par des spots colorés (rouge : surexpression ; bleu : sous-expression ; blanc : expression intermédiaire). Des groupes de gènes d'intérêt sont indiqués à gauche (Gibault *et al.* 2011).

La majorité de ces altérations sont des événements privés, c'est-à-dire uniquement présentes dans une tumeur, mais quelques-unes sont retrouvées de manière récurrente.

Les deux inactivation majeures : *TP53* et *RBI*

Parmi les régions chromosomiques le plus fréquemment altérées dans ce groupe de sarcomes se trouve la région 13q14-21. Cette région chromosomique est perdue dans 78% des UPS, ce qui conduit à l'inactivation de *RBI* (Chibon *et al.* 2000 ; Gibault *et al.* 2011). L'inactivation de la voie pRb dans les MFS peut être due à des altérations directes du gène *RBI*, à des pertes d'expression de *CDKN2A/CDKN2B* ou à une surexpression de *CCND1* (Ogura *et al.* 2018). Ces altérations sont mutuellement exclusives et sont associées à un mauvais pronostic. pRb est un des deux régulateurs clef du cycle cellulaire. Il joue un rôle lors de la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse, dans la mort cellulaire, dans le maintien de l'arrêt du cycle ou encore dans la stabilité génomique (Burkhart and Sage 2008). Lorsqu'il est activé, pRb s'associe à la chromatine afin de limiter la transcription de gènes du cycle, principalement en régulant la transcription des gènes activés par la famille E2F (Dyson 2016). L'inactivation de pRb va faciliter l'entrée dans le cycle cellulaire, notamment en empêchant l'arrêt lors de la transition G1/S.

La voie de signalisation de p53 est également systématiquement altérée dans les sarcomes à « génétique complexe » (Pérot *et al.* 2010). Cette inactivation est la conséquence de la mutation ou de la délétion du gène *TP53* ou du locus 17p13 dans 80% des LMS et 71% des UPS. Les tumeurs ne présentant pas ces altérations vont inactiver la voie de signalisation p53 par la délétion ou la perte d'expression de p14/Arf (codé par le locus *CDKN2A* situé en 9p21). Ces deux gènes entraînent un arrêt du cycle en G1 : p53 agit comme facteur de transcription et p14/Arf inhibe l'ubiquitine ligase MDM2, dont l'activation permet la dégradation par le protéasome de p53 (Matheu *et al.* 2008). L'inactivation de p53 va donc participer à la tolérance au stress cellulaire, à l'instabilité génétique et à la progression dans le cycle cellulaire.

L'inactivation des voies de signalisation pRb et p53 est systématique et semble essentielle dans le développement tumoral des sarcomes à « génétique complexe » (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017 ; Chudasama *et al.* 2018). L'inactivation de *tp53* et de *rb1* dans des modèles murins démontre d'ailleurs que ces altérations conduisent à la formation de sarcomes indifférenciés (Lin *et al.* 2009). D'autres modèles murins basés essentiellement sur l'inactivation de la voie p53

conjointement à l'altération d'un second gène (inactivation de *PTEN* ou activation de *KRAS*) ont été générés et permettent le développement de sarcomes pléomorphes (Tsumura *et al.* 2006 ; Hernando *et al.* 2007 ; Kirsch *et al.* 2007 ; Dodd *et al.* 2015). Dans ces modèles, les tumeurs présentent des caractéristiques cliniques et morphologiques proches de celles des tumeurs humaines mais ne miment pas l'instabilité génomique observée dans les sarcomes à « génétique complexe ».

Autres altérations récurrentes

La région 10q23-31 est également fréquemment perdue (Derré *et al.* 2001 ; Gordon *et al.* 2003). Cette région contient le gène *PTEN* qui est le régulateur négatif de la voie PI3K/AKT/mTOR, agissant sur la croissance cellulaire (Maehama and Dixon 1998).

Une perte de la région Xq21.1 contenant le gène *ATRX* est observée dans 30% des sarcomes à « génétique complexe » (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). La perte d'expression de ce gène, notamment via des mécanismes de mutation ponctuelle, a été observée dans les LMS, les PLPS, les MFS, les UPS et les MPNST (Yang *et al.* 2015 ; Liau *et al.* 2015 ; Koelsche *et al.* 2016 ; Ren *et al.* 2018). Ce gène appartient à la famille des protéines de remodelage de la chromatine SWI/SNF et son inhibition est nécessaire, mais non suffisante, pour l'activation du mécanisme alternatif d'élongation des télomères (ALT) qui est le mécanisme principal d'élongation des télomères de ces tumeurs (Flynn *et al.* 2015).

Enfin, une amplification de la région 5p13-15 est fréquemment observée dans les PLPS, les UPS et les LMS (Mechtersheimer *et al.* 1999 ; Otaño-Joos *et al.* 2000 ; Adamowicz *et al.* 2006 ; Gibault *et al.* 2011). Cette région contient le gène *TRIO* et son amplification conduit à sa surexpression (Adamowicz *et al.* 2006). Ce gène possède deux régions régulatrices de GTPases (*Guanosine-5'-triphosphate Exchange Factor* ou GEF) qui vont activer les protéines Rac1 et RhoA (Debant *et al.* 1996). Ces protéines Rho agissent au niveau de l'organisation du cytosquelette, de l'activation de kinases ou encore de la transcription de gènes cibles (Hall 1998).

Certaines altérations sont retrouvées spécifiquement dans un type histologique.

Les LMS bien différenciés du rétro péritoine sont des tumeurs de haut grade et présentent une amplification de *MYOCD* en 17p (Pérot *et al.* 2009). Ce gène code pour la myocardine, un cofacteur du *serum response factor* (SRF) qui permet la régulation de la différenciation musculaire lisse.

Les myxofibrosarcomes surexpriment spécifiquement les gènes *ADGRG2* et *TNXB* (Nakayama *et al.* 2007).

Enfin, trois cas d'UPS présentant des gènes de fusion impliquant *PRDM10* (en second partenaire) fusionné avec soit *MED12* ou *CITED2* ont été observés dans une cohorte de 84 STM (Hofvander *et al.* 2015). Ces tumeurs sont de bas grade, les patients présentent une rémission complète en 3 ans minimum, sans développer de métastase, faisant de ces tumeurs des cas atypiques d'UPS.

2.2.3. Les sarcomes à amplification : une altération spécifique dans un génome remanié

Les DDLPS et les liposarcomes bien différenciés (WDLPS, pour *well-differentiated liposarcoma*) possèdent une amplification de la région q14-15 du chromosome 12 (Pedoutour *et al.* 1994 ; Pilotti *et al.* 1998). Cette altération se traduit, au niveau cytogénétique, par la présence de chromosomes en anneaux (**Figure 20**) ou de chromosomes géants (aussi appelés « marqueurs » chromosomiques ou néo-chromosomes) qui contiennent ces séquences amplifiées. Cette amplification va notamment cibler le gène *MDM2*, dont le rôle de dégradation de p53 est bien décrit. De plus, il été démontré que ce gène peut se lier à la chromatine et réguler le métabolisme de la sérine et l'homéostasie redox indépendamment de p53, participant alors à la prolifération et à la croissance tumorale (Riscal *et al.* 2016). Les autres cibles de ces amplifications sont les exons 1 et 2 de *HMGA2* (retrouvés dans 100% des cas), mais également *CDK4* et *SAS/TSPAN31* dans 87% des cas (Italiano *et al.* 2008). L'architecture ainsi que la formation de cette amplification serait la conséquence d'évènements chromothriptiques (Garsed *et al.* 2014).

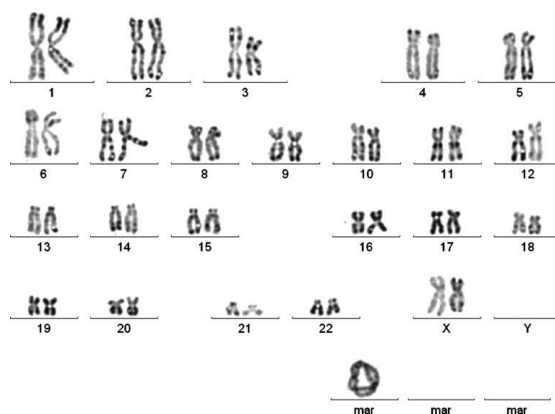


Figure 20 : Caryotype d'un liposarcome bien différencié présentant un chromosome en anneau.
(Coindre *et al.* 2010)

Alors que les WDLPS sont le plus souvent diploïdes et ne présentent pas d'autres anomalies chromosomiques que l'amplification du chromosome 12, les DDLPS présentent un génome très complexe. Leur génome est caractérisé par des chromosomes double-minute contenant des régions génomiques du chromosome 12 (fragments chromatidiens acentriques), la présence de plusieurs chromosomes géants, de marqueurs chromosomiques ainsi qu'une instabilité génomique (Coindre *et al.* 2010). Ils présentent également une co-amplification des régions 1p32 et 6q23 ciblant respectivement *JUN* et *ASK1*, co-amplifications mutuellement exclusives, qui agissent sur la dédifférenciation adipeuse (Chibon *et al.* 2004 ; Mariani *et al.* 2007).

Certains DDLPS hautement indifférenciés étaient initialement diagnostiqués comme sarcomes indifférenciés. L'identification en routine clinique de cette amplification du chromosome 12 permet aujourd'hui de les reclasser dans cette catégorie (Chibon *et al.* 2002 ; Coindre *et al.* 2003).

2.3. Instabilité chromosomique

Les sarcomes à « génétique complexe » présentent un génome instable. Comme précédemment expliqué, l'instabilité chromosomique est la capacité des cellules tumorales à acquérir des altérations chromosomiques au cours du temps. Certains processus contribuent à l'émergence de cette instabilité. Un doublement du génome tumoral a été observé dans des sarcomes à « génétique complexe » (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Une étude a d'ailleurs démontré que

55% des LMS seraient tétraploïdes (Chudasama *et al.* 2018). Dans un cas de LMS de cette étude, un doublement du génome a été identifié dans la métastase mais pas dans la tumeur primaire : les auteurs suggèrent alors que la tétraploïdisation serait un évènement évolutif de cette tumeur. La tétraploïdie dans des lignées cellulaires de sarcomes favorise la migration cellulaire sans impacter la prolifération (Jemaà *et al.* 2017).

Le mécanisme alternatif d'élongation des télomères, ALT, identifié dans la plupart des sarcomes, participerait également à l'instabilité du génome de ces tumeurs. Ainsi, les facteurs de transcription NR2C/F sont associés aux télomères lors du mécanisme ALT et la liaison de ces facteurs de transcription dans des régions génomiques peut conduire à l'insertion de séquences télomériques dans le génome et donc à l'instabilité chromosomique (Marzec *et al.* 2015).

Bien que plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette instabilité, le mécanisme à l'origine de celle-ci n'est pas encore identifié.

C. L'instabilité chromosomique comme facteur d'agressivité tumorale

1. Progression tumorale et instabilité

L'instabilité chromosomique est corrélée avec l'agressivité tumorale et avec la présence de métastases ; ceci a d'ailleurs été observé dans les sarcomes (Turajlic and Swanton 2016 ; Bakhoun *et al.* 2018). Comme précédemment expliqué, les DDLPS possèdent un génome complexe : ils présentent de nombreuses altérations génomiques et sont caractérisés par une amplification au niveau du chromosome 12. Alors que les WDLPS sont peu agressifs, les patients atteints d'un DDLPS vont fréquemment développer des métastases (Fletcher *et al.* 2013). La dédifférenciation adipeuse des WDLPS est observée dans 10% des cas, conduisant alors à une transition de bas à haut grade accompagnée par l'augmentation de l'instabilité chromosomique (Dei Tos 2000 ; Fletcher *et al.* 2013).

Une étude sur 32 MFS de grade 1, 2 et 3 a démontré que la récurrence locale de ces tumeurs est associée à une augmentation de l'instabilité chromosomique (Willems *et al.* 2006). Les récurrences de

MFS présentent une augmentation du grade ainsi qu'une augmentation du nombre d'altérations génomiques et suivraient alors un modèle de progression à plusieurs étapes.

L'instabilité chromosomique participerait également à l'évolution métastatique des sarcomes à « génétique simple ». Dans les GIST, une augmentation de la complexité génomique est observée à des stades avancés de la pathologie (El-Rifai *et al.* 2000 ; Ylipää *et al.* 2011). Dans les sarcomes d'Ewing, une mutation inactivatrice de *STAG2* a été identifiée dans 21% des cas, associée à une augmentation du nombre de variants structuraux et à un mauvais pronostic (Solomon *et al.* 2011 ; Tirode *et al.* 2014). *STAG2* est impliqué dans le complexe cohésine et favorise l'aneuploïdie (Kleyman *et al.* 2014).

2. Index génomique

La complexité chromosomique a clairement été mesurée comme étant associée à une évolution locale ou métastatique dans trois types de sarcomes (présentés ci-après). Une mesure possible de cette complexité chromosomique est réalisée via l'index génomique (GI, pour *Genomic Index*) dont la formule est la suivante (Lagarde *et al.* 2012) :

$$GI = \frac{A^2}{C}$$

A = nombre total d'altérations (défini par des segments de perte ou de gain)

C = nombre de chromosomes altérés (autosomes)

Cet index a été initialement défini testé dans les GIST. Ces tumeurs sont cliniquement classées selon un système de grade différent de celui défini par la FNCLCC : le grade de l'*Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP), basé sur la localisation tumorale. Ce système définit trois stades, dont un stade intermédiaire ayant un risque métastatique mal défini (Miettinen and Lasota 2006). L'étude de Lagarde *et al.* en 2012 montre que ces tumeurs peuvent être classées en fonction de leur complexité chromosomique (**Figure 21**). Deux groupes de tumeurs sont alors définis en fonction du GI, celles

ayant un GI entre 0 et 10 et celles ayant un GI supérieur à 10 ; cette classification stratifie alors les tumeurs de bon et de mauvais pronostic. Le GI permet notamment de déterminer le risque métastatique des tumeurs de grade intermédiaire (Lartigue *et al.* 2015).

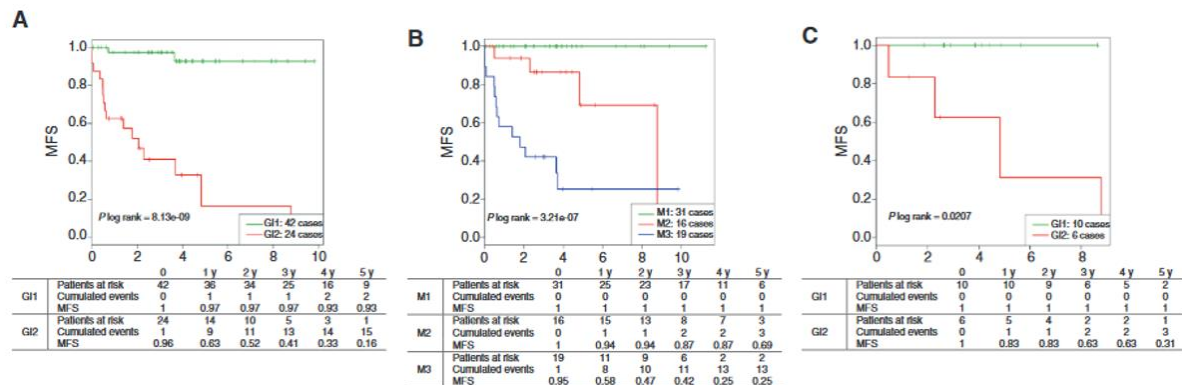


Figure 21 : Analyse Kaplan-Meier de la survie sans métastase (MFS) dans les GIST.

En fonction du GI (A) de la classification AFIP (B) et du GI dans le sous-groupe de risque intermédiaire du grade AFIP (C). L'axe des abscisses représente le temps ; l'axe des ordonnées représente le taux de survie sans métastase. GI 1 = GI ≤ 10 ; GI 2 = GI > 10 ; M1 = groupe AFIP de faible risque métastatique ; M2 = groupe AFIP de risque intermédiaire ; M3 = groupe AFIP de haut risque métastatique (Lagarde *et al.* 2012).

La deuxième étude concerne les synovialosarcomes, tumeurs observées chez l'adulte et chez l'enfant, caractérisées par une translocation *SS18-SSX1* ou *SS18-SSX2* (Clark *et al.* 1994 ; Crew *et al.* 1995). En 2013, Lagarde *et al.* montrent que ces tumeurs de l'adulte possèdent un génome plus altéré que celles de l'enfant et que les tumeurs présentant au moins une altération génomique (GI ≥ 1) ont un haut risque de développer des métastases. Ceci a d'ailleurs été confirmé sur une cohorte européenne de synovialosarcomes pédiatriques (Orbach *et al.* 2018).

Le GI peut également prédire le devenir métastatique d'une entité de sarcomes utérins à différenciation musculaire lisse (STUMP pour *smooth muscle tumor with uncertain malignant potential*) dont l'analyse morphologique ne permet pas de déterminer si ces lésions sont bénignes ou malignes (Croce *et al.* 2015). Une étude réalisée sur des léiomyomes (tumeurs musculaires lisses bénignes), des STUMP, ainsi que des LMS utérins a confirmé l'importance du GI (seuil à 10) pour la

classification des STUMP et a démontré qu'un GI supérieur à 35 définit un mauvais pronostic en survie globale (Croce *et al.* 2018).

3. CINSARC

Une analyse différentielle d'expression basée sur la complexité génomique et sur le grade histologique FNCLCC a permis d'identifier une signature transcriptomique pronostique de 67 gènes (Chibon *et al.* 2010). La signature CINSARC (pour *Complexity INdex in SARcomas*) permet de classer les tumeurs en deux catégories (celles à faible expression et celles à forte expression de la signature). Elle est plus prédictive du devenir métastatique que le grade FNCLCC (Figure 22). Les gènes de cette signature sont tous impliqués au niveau de la mitose et du contrôle de l'intégrité chromosomique.

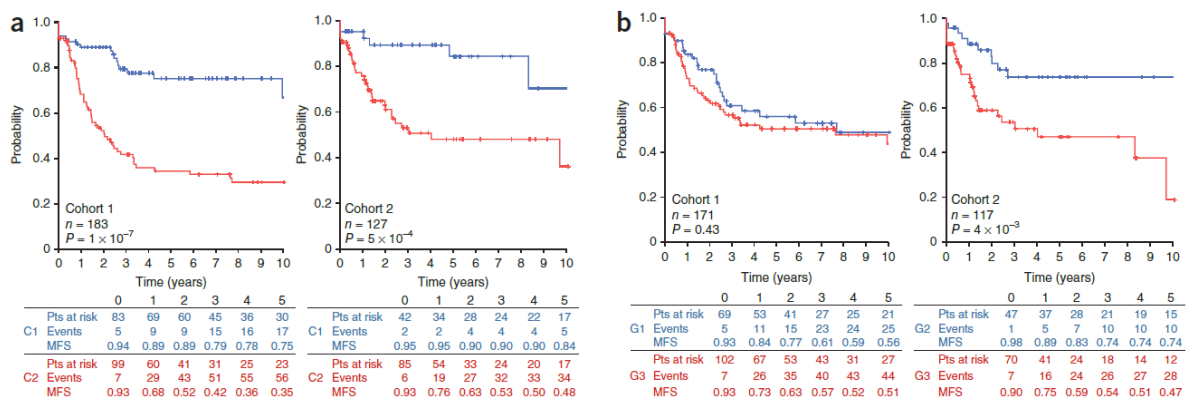


Figure 22 : Analyse Kaplan-Meier de la survie sans métastase en fonction de la signature CINSARC (A) et du grade histologique (B).

L'axe des X représente le temps ; l'axe des Y représente le taux de survie sans métastase (Chibon *et al.* 2010). Ici, MFS indique *metastasis free survival*.

D. Conclusion

Les sarcomes sont des tumeurs rares et hétérogènes d'un point de vue histologique, clinique et génétique. Ce sont des maladies chromosomiques, à la fois lors de leur développement mais également lors de leur évolution. Cependant, le mécanisme permettant le développement tumoral semble différent entre les sarcomes à « génétique simple » et les sarcomes à « génétique complexe ».

Ce dernier groupe est composé de tumeurs ayant différentes lignes de différenciation. Le mécanisme moléculaire à l'origine de ces tumeurs n'a pas été identifié, cependant, elles partagent une complexité génomique similaire.

Alors que les modèles murins de sarcomes pléomorphes présentent des caractéristiques cliniques et histologiques similaires, ils ne permettent pas de reproduire la génétique de ces tumeurs. Elles pourraient avoir comme origine la fusion cellulaire, phénomène physiologique observé dans les cellules du lignage mésenchymateux et qui, dans un contexte pathologique, favorise l'instabilité génétique et l'évolution tumorale.

III. LA FUSION CELLULAIRE

A. Généralités

1. Description

La fusion entre cellules se base sur un processus de fusion des membranes qui permet l'intégration de compartiments cellulaires distincts pour former un nouveau compartiment (Willkomm and Bloch 2015). Ce processus physiologique est hautement régulé, observé tout au long du développement de l'organisme. Il peut se produire entre cellules de même type (homotypique) ou de types différents (hétérotypique). La fusion cellulaire va induire une modification des signaux et des comportements cellulaires, permettant alors aux cellules de réaliser leurs fonctions, de former et de régénérer de nouveaux tissus ou encore d'acquérir de nouvelles fonctions (Ogle *et al.* 2005 ; Aguilar *et al.* 2013 ; Willkomm and Bloch 2015).

Deux types de fusion sont observés : la fusion sexuelle lors du développement d'un nouvel organisme et la fusion non-sexuelle ou somatique qui permet de « sculpter » différents organes et d'aboutir à une différenciation cellulaire. Alors que la fécondation ne tolère qu'un seul événement de fusion, des événements de fusion cellulaire successifs sont observés lors du développement de muscles ou encore d'ostéoclastes (Aguilar *et al.* 2013).

Ce phénomène est impliqué dans le développement de nombreux organismes, dans ce manuscrit nous allons principalement nous intéresser à la fusion cellulaire chez l'Homme.

2. Les différents produits issus de la fusion cellulaire

La fusion peut conduire à la formation de cellules mono ou multi-nucléées. On distingue alors trois grands types de cellules issues de ce mécanisme :

- **Les syncytia (Figure 23 A)** : cellules multi-nucléées issues de la fusion de cellules de même lignage, observées de manière physiologique dans les cellules musculaires squelettiques, les

ostéoclastes et les syncytiotrophoblastes du placenta mature (Willkomm and Bloch 2015). La multi-nucléation de ces cellules leur permet de réaliser leurs fonctions respectives et participe à la différenciation cellulaire. Ce mécanisme est également retrouvé dans des conditions pathologiques, notamment en réponse à un élément étranger avec la formation de cellules géantes multi-nucléées issues de la fusion des macrophages (Vignery 2005).

- **Les hétérokaryons (Figure 23 B)** : cellules issues de la fusion de deux ou plusieurs cellules de différents lignages. Tout comme les syncytia, ces cellules sont multi-nucléées. La possibilité que des cellules de différents lignages puissent fusionner a été explorée pour la première fois en 1965 par Harris et Watkins en réalisant la fusion de cellules HeLa humaines et de cellules Ehrlich murines. Dans ce système, les deux noyaux restent séparés et stables au cours du temps, sans prolifération ni division cellulaire. Il permet alors d'étudier l'influence des facteurs cytoplasmiques sur l'expression de gènes et par conséquent sur la différenciation cellulaire ou la reprogrammation cellulaire (Harris *et al.* 1969 ; Ephrussi *et al.* 1969 ; Blau *et al.* 1983, 1985 ; Blau 1989 ; Blau and Blakely 1999 ; Serov *et al.* 2011). Ce modèle expérimental a largement été utilisé afin d'étudier des mécanismes de trans-différenciation et de réversion phénotypique. Il a longtemps été pensé que la fusion hétérotypique se formait exclusivement dans des systèmes expérimentaux, via l'utilisation de fusogènes artificiels (particules permettant la fusion cellulaire). Cependant, des études *in vivo* ont démontré la présence d'hétérokaryons, suite à l'injection de cellules différenciées ou de cellules souches, se formant spontanément et pouvant contribuer à la régénération cellulaire (Gibson *et al.* 1995 ; Ferrari *et al.* 1998 ; Camargo *et al.* 2003 ; Corbel *et al.* 2003 ; Johansson *et al.* 2008 ; Piquer-Gil *et al.* 2009 ; Lluís and Cosma 2010).

- **Le synkaryon (Figure 23 C)** : cellule de fusion mono-nucléée dont la forme hétérokaryon serait un stade intermédiaire. Tout comme les hétérokaryons, ces produits de fusion ont été observés dans des modèles animaux suite à la fusion de cellules de la moelle osseuse avec des cellules somatiques, permettant alors la régénération cellulaire (Vassilopoulos *et al.* 2003 ; Wang *et al.* 2003 ; Rizvi *et al.* 2006). La présence d'un seul noyau serait la conséquence d'une fusion nucléaire ou de la perte d'un des noyaux (Ogle *et al.* 2005).

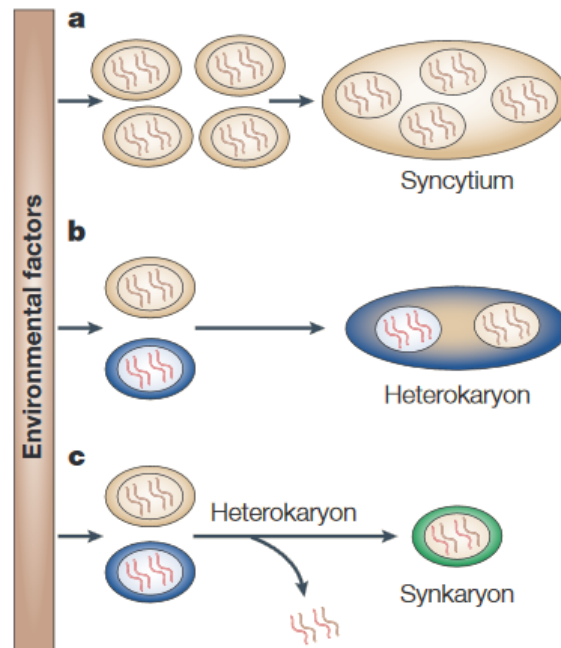


Figure 23 : Les différents produits de la fusion cellulaire : les syncytia (a), les hétérokaryons (b) et les synkaryons (c ; Bjerkvig *et al.* 2005).

B. Fusion des membranes

La fusion cellulaire est basée sur la fusion de membranes, mécanisme qui est observé de manière endoplasmique (à l'intérieur de la cellule) ou exoplasmique (à l'extérieur de la cellule). La compréhension du mécanisme de fusion membranaire est principalement basée sur des études de fusion entre virus et cellules hôtes et des études de fusion intracellulaire. Ces processus subissent en effet des contraintes identiques et font intervenir des facteurs similaires (Hernández and Podbilewicz 2017). Une liste non-exhaustive de facteurs impliqués dans la fusion de membranes exoplasmiques est indiquée dans le **Tableau 5**.

1. Modèle de fusion des membranes

1.1. Etapes de pré-fusion

Avant les étapes de fusion membranaires, des étapes préparatoires sont nécessaires (Hernández and Podbilewicz 2017). Ces trois étapes sont la différenciation, la reconnaissance et l'adhésion.

La **différenciation** va permettre aux cellules d'exprimer l'ensemble des protéines qui vont rendre les futurs partenaires compétents à la fusion. Cette étape fait intervenir des facteurs spécifiques de chaque type cellulaire comme la protéine Cdon dans les myoblastes (conduit à l'expression de gènes spécifiques du compartiment musculaire tels que MyoD (Kang *et al.* 1997, 1998) ou le M-CSF dans les macrophages (*macrophage colony-stimulating factor* ; Tanaka *et al.* 1993).

L'étape de **reconnaissance** permet aux cellules d'identifier un partenaire et de se déplacer afin de pouvoir initier la fusion ; cette étape est induite par des chimio-attractants. La chimiokine CCL2 joue par exemple un rôle très important dans l'étape de reconnaissance des macrophages en se liant à son récepteur CCR2 (Kyriakides *et al.* 2004). Des protéines membranaires, comme la néphrine nécessaire à la fusion des myoblastes, participent également à cette étape (Sohn *et al.* 2009).

Enfin, une cascade de réactions est enclenchée permettant alors l'**adhésion** entre les deux partenaires et l'activation des protéines nécessaires à la fusion des membranes. Cette étape est réalisée par des protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires. Des protéines de la famille des intégrines participent à la myogenèse et à la fusion des macrophages (McHugh *et al.* 2000 ; McNally and Anderson 2002 ; Schwander *et al.* 2003 ; Lafuste *et al.* 2005 ; Brzóska *et al.* 2006). Les cadhérines, comme la E, la N et la M-cadhérine, protéines des jonctions adhérentes sont également impliquées dans ce processus (Coutifaris *et al.* 1991; Moreno *et al.* 2007; Fiorino and Harrison 2016; Radice *et al.* 1997; Charlton *et al.* 1997; Ozawa 2015).

A la fin de ces étapes préliminaires, les deux membranes plasmiques sont à une distance de 10 nm (Hernández and Podbilewicz 2017).

1.2. Etapes de fusion

La fusion se déroule alors en trois étapes : le contact cellulaire, l'hémifusion et l'ouverture du pore de fusion (Figure 24).

L'ensemble du mécanisme va être guidé par des fusogènes, c'est-à-dire des protéines nécessaires et suffisantes pour conduire à la fusion en permettant le contact entre les cellules et la formation du pore de fusion (Aguilar *et al.* 2013). Ils seront plus détaillés dans la partie suivante (voir partie 1.III.2).

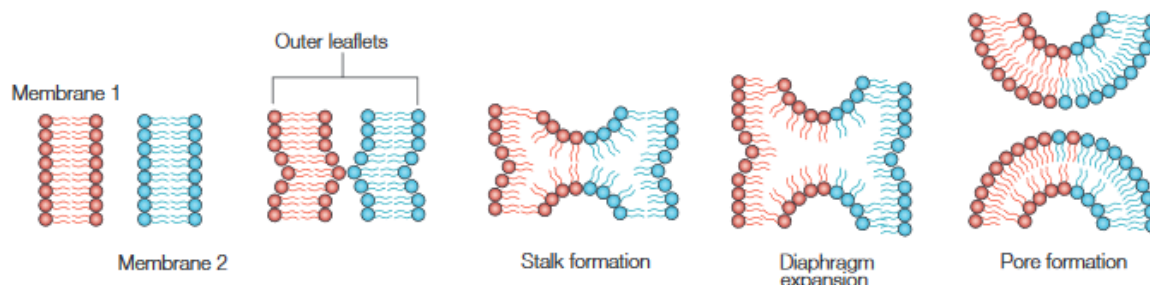


Figure 24 : Mécanisme de fusion cellulaire.

Les deux membranes cellulaires vont être mises en contact à l'aide d'un fusogène, suivi par l'hémifusion (indiquée ici par *stalk formation*). Un élargissement de la zone de fusion va ensuite permettre la formation du pore de fusion (Ogle *et al.* 2005).

La première étape consiste au **contact** entre les cellules au niveau des couches lipidiques des membranes plasmiques. Cette étape peut être favorisée par un renforcement de la proximité des membranes suite à des réarrangements du cytosquelette. Ainsi dans les myoblastes, l'activation de la GTPase Rac1 va permettre la formation de protrusion du cytosquelette (Laurin *et al.* 2008). Rac1 est également indispensable dans la fusion des macrophages (Pajcini *et al.* 2008).

Les membranes plasmiques présentent à leur surface une couche hydrophile, provoquant une répulsion des deux membranes plasmiques lorsqu'elles se retrouvent à une distance de 10 nm. Une déshydratation ainsi qu'une modification du contenu lipidique des membranes sont nécessaires pour permettre la fusion (Hernández and Podbilewicz 2017). De manière intéressante, une externalisation de la phosphatidylsérine au niveau des membranes plasmiques est observée dans les trophoblastes et

dans les myoblastes avant la fusion des membranes, phénomène normalement associé à l'apoptose (Lyden *et al.* 1993 ; van den Eijnde *et al.* 2001 ; Jeong and Conboy 2011). Ceci pourrait être la conséquence d'une modification lipidique des membranes lors du processus de fusion.

La deuxième étape consiste en la fusion des deux couches lipidiques externes et est appelée l'**hémifusion**. Les cytoplasmes ne sont pas encore en contact alors que les couches lipidiques ont déjà fusionné.

Enfin, la dernière étape consiste en la fusion des dernières couches lipidiques internes et à la formation d'un **pore de fusion**. Ce pore doit ensuite s'élargir pour permettre la finalisation du processus de fusion.

		Zygote	Syncytio-trophoblastes	Fibres musculaires	Ostéoclastes	MGC
Pré-fusion	Différenciation		hCG Protéine kinase A	MyoD Cdon N-cadhérine P38 α / β	M-CSF DAP12 TREM2 PI3K KCNN4 TNF P2RX7	
	Reconnaissance	ZP3 ZP2		Néphrin	RANKL NFATc1	IL-4 IL-3 STAT6
	Adhésion		E-cadhérine Cadhérine 11 Connexine-43 ZO-1	N-cadhérine M-cadhérine α 3-intégrine α 9-intégrine β -intégrine	E-cadhérine	
Fusion	Contact	IZUMO ADAM1 ADAM2 ADAM3	ADAM12 PS	ADAM12 Dock1 Rac1 Arp2/3 F actine cdc42 PS	Rac1 F-actine	
	Hémi fusion	IZUMO		β -1 intégrine		
	Fusion	IZUMO	Syncytine-1 ASCT1 / ASCT2	Caveolin-3 Myomaker Minion/ Myomerges/ Myomixer	DC-STAMP	
	Fusogènes	-	Syncytine-1	Myomaker Minion/ Myomerges/ Myomixer	-	-

Tableau 5 : Liste des protéines impliquées dans les différentes étapes de la fusion cellulaire dans des processus physiologiques.

Cette liste est non-exhaustive (Gerbaud and Pidoux 2015 ; Georgadaki *et al.* 2016 ; Deng *et al.* 2017 ; Pereira *et al.* 2018).

2. Fusogènes

La déformation membranaire observée lors de la fusion nécessite une forte dépense énergétique qui ne peut être dépassée sans l'aide de fusogènes (**Figure 25** ; Cohen and Melikyan 2004). Ces protéines sont nécessaires et suffisantes pour réaliser la fusion cellulaire (Hernández and Podbilewicz 2017). Elles peuvent être présentes sur l'une des deux membranes plasmiques ou sur les deux, elles sont donc unilatérales ou bilatérales.

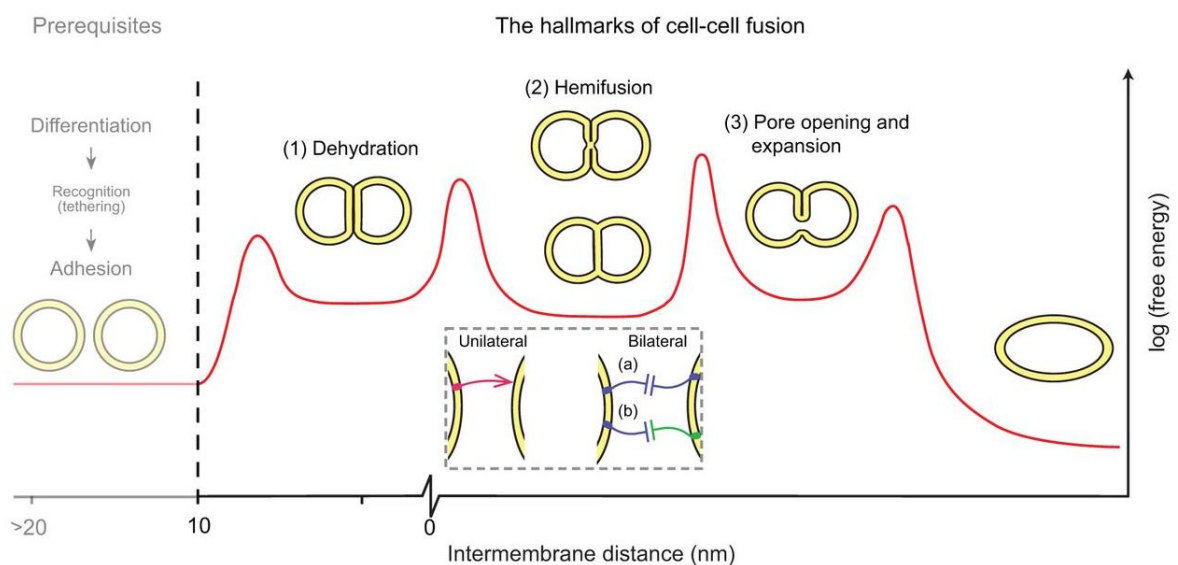


Figure 25 : Hallmarks de la fusion cellule-cellule.

Le processus de fusion nécessite des étapes préliminaires de différenciation, de reconnaissance et d'adhésion. Le processus de fusion est ensuite enclenché. Les deux membranes plasmiques se retrouvent à une distance de 10nm. Les fusogènes doivent alors dépasser quatre barrières énergétiques (indiquées par les pics rouges) au cours du contact, de l'hémifusion et de l'ouverture du pore. Les deux types de fusogènes sont représentés en dessous (Hernández and Podbilewicz 2017).

Dans cette partie, nous allons distinguer trois types de fusogènes : ceux exprimés par les cellules compétentes dans des conditions physiologiques, les fusogènes viraux et les agents fusogènes non-protéiques.

2.1. Fusogènes physiologiques

La fusion membranaire physiologique est génétiquement programmée (Aguilar *et al.* 2013). Un fusogène est défini par sa nécessité et sa suffisance pour réaliser la fusion cellulaire. Quatre familles de fusogènes ont pu être identifiées dans des processus physiologiques : les syncytines, Myomaker, la famille de EFF-1/AFF-1 et HAP2 (Hernández and Podbilewicz 2017).

La syncytine-1 est une protéine fusogénique impliquée dans la fusion des cytotrophoblastes, permettant alors la formation d'un syncytium, le syncytiotrophoblaste – couche épithéliale externe du placenta (Blond *et al.* 1999 ; Mi *et al.* 2000 ; Pötgens *et al.* 2004). Cette protéine est codée par le gène *Syncytin-1* ou *ERVW-1* (Ruebner *et al.* 2010). Ce gène est un homologue des gènes rétroviraux codant pour les protéines de l'enveloppe virale (impliquées dans le ciblage, l'attache et l'infiltration par les virus ; Gong *et al.* 2005; Renard *et al.* 2005). La syncytine-1 possède également un profil structural proche de celui de la glycoprotéine d'enveloppe gp160 du VIH. Environ 10% du génome humain est composé de séquences virales endogènes et seulement quelques gènes d'origine virale ont conservé une fonction ; ils appartiennent à la famille des syncytines (Turner *et al.* 2001 ; Blaise *et al.* 2003 ; Dewannieux *et al.* 2005). Les syncytines-2 et 3 induisent également la fusion cellulaire et peuvent induire des fusions hétérotypiques (Blaise *et al.* 2005 ; Malassiné *et al.* 2007 ; Aagaard *et al.* 2012). La syncytine-1 jouerait également un rôle dans la fusion des myoblastes et des ostéoclastes (Søe *et al.* 2011 ; Bjerregard *et al.* 2014).

L'identification des fusogènes responsables de la formation des fibres musculaires squelettiques est très récente (Sampath *et al.* 2018). En 2013, une analyse bioinformatique a permis d'identifier Myomaker, une protéine transmembranaire présente au niveau de la membrane plasmique des myoblastes : cette protéine est nécessaire pour leur fusion (Millay *et al.* 2013). Son partenaire, un micro-peptide (petite protéine de 100 résidus), a été découvert quatre ans plus tard par trois équipes et est nommé Myomerger/Minion/Myomixer (Bi *et al.* 2017 ; Quinn *et al.* 2017 ; Zhang *et al.* 2017). Ces deux protéines sont co-exprimées et permettent, en plus de la fusion homotypique des myoblastes, la fusion entre myoblastes et fibroblastes et entre deux fibroblastes.

Les fusogènes impliqués dans l'ostéoclastogenèse et fusion des gamètes n'ont en revanche pas encore été identifiés. En plus des deux fusogènes décrits, deux autres familles de fusogènes existent : la famille EFF-1/AFF-1 chez *C. elegans*, qui participe à la formation d'organes au cours du développement et la famille HAP2 qui joue un rôle dans la fusion des gamètes chez les plantes, les algues, les invertébrés et les protistes (Avinoam and Podbilewicz 2011) ; (Valansi *et al.* 2017).

De manière intéressante, il a été observé que EFF-1 et HAP2 présentaient des structures et des fonctions similaires aux protéines fusogènes des virus enveloppés de classe II, suggérant que, comme les syncytines, ils auraient une origine virale (Pérez-Vargas *et al.* 2014)(Hernández and Podbilewicz 2017).

2.2. Fusogènes viraux

La propagation de l'infection virale se base sur la capacité des virus à pouvoir se transmettre de cellules en cellules (Mothes *et al.* 2010). On distingue alors deux types de virus :

- Les virus enveloppés possédant une couche lipidique externe. Pour rentrer à l'intérieur de la cellule, ils utilisent des larges complexes protéiques multimériques pour fusionner leur enveloppe avec la membrane de l'hôte (White *et al.* 2008 ; Podbilewicz 2014).
- Les virus non-enveloppés ne possédant pas de couche lipidique et dont l'entrée dans la cellule n'est pas induite par la fusion membranaire (Ciechonska and Duncan 2014).

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, les fusogènes cellulaires présentent des similitudes structurales avec les fusogènes des virus enveloppés. Des infections virales peuvent aussi induire la formation de syncytia (Chen 2005 ; Duelli and Lazebnik 2007).

Plusieurs types de transmissions virales de cellules à cellules existent. Une des stratégies employée par les rétrovirus est de conduire à l'expression de la protéine virale fusogène au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée afin de reformer une nouvelle particule virale (Zhong *et al.* 2013). La présence de cette protéine de fusion au niveau membranaire permet également à ces protéines de reconnaître et de se lier à ses récepteurs présents au niveau d'une cellule saine, pouvant

induire des fusions membranaires. Ce mécanisme est notamment observé dans le cas du VIH et du virus de la rougeole pneumonique (Clavel and Charneau 1994 ; Griffin 2010).

L'implication des virus dans la fusion cellulaire est surtout associée aux virus non-enveloppés. Alors qu'ils n'expriment pas de protéine permettant leur entrée dans l'hôte, les réovirus expriment une petite protéine fusogène qui permet uniquement la formation de syncytia (Boutillier and Duncan 2011 ; Ciechonska and Duncan 2014). Ces protéines sont appelées *fusion small transmembrane* (FAST). Suite à l'infection par le virus, les protéines FAST vont pouvoir être synthétisées et se localiser au niveau de la membrane plasmique afin d'induire la fusion entre cellules. Ces virus vont s'aider de co-facteurs comme l'actine ou les cadhérines afin de pouvoir effectuer le mécanisme de fusion (Salsman *et al.* 2008).

Les virus ont également été utilisés comme outil afin d'étudier la fusion cellulaire. Le virus hémagglutinant du Japon (HVJ pour *hemagglutinating virus of Japan*), aussi appelé virus Sendai, a été isolé dans les années 50. Son rôle fusogénique a été identifié suite à une étude sur des cellules murines Ehrlich (Hosaka 1988). Dans ces études, le virus est inactivé à l'aide d'ultraviolets afin de le rendre non-pathogène. La fusion cellulaire induite par le Sendai va être réalisée par les protéines d'enveloppe F (pour Fusion) et HN (pour *Haemagglutinin-neuramidase* ; Shioda *et al.*, 1983; Morgan *et al.*, 1984). La protéine HN va reconnaître et se lier à son récepteur, l'acide sialique, qui est retrouvé universellement dans le monde animal (Eguchi *et al.* 2000). Sa faible spécificité d'espèce et de type cellulaire a conduit à la très large utilisation de cette molécule dans le domaine de la recherche.

2.3. Agents fusogènes non-protéiques

Des agents fusogènes non-protéiques induisent la fusion en agissant sur la proximité cellulaire et/ou sur la formation de pores au niveau des membranes plasmiques : ils sont couramment utilisés en recherche.

Le premier agent identifié est le polyéthylène glycol (PEG). Le mécanisme induit par cet agent n'est pas encore parfaitement compris (Knutton 1979). Il est cependant établi que ce polymère hautement hydraté va pouvoir se lier aux membranes et redistribuer les particules intra-membranaires causant alors une déshydratation de celles-ci et permettant alors la fusion des membranes (Lentz 1994).

Un protocole d'électrofusion peut également induire la fusion cellulaire (Radomska and Eckhardt 1995). Celui-ci se déroule en deux étapes : une première qui va permettre le contact des membranes des deux partenaires via un courant électrique continu qui va aligner les cellules et une deuxième consistant en un pulse électrique qui va créer des pores au niveau des membranes.

Tout comme le Sendai, ces deux agents ont largement été utilisés car ils peuvent induire la fusion sans spécificité cellulaire ou d'espèce.

C. Processus physiologique

1. Fécondation

La fécondation constitue la première fusion cellulaire de tout organisme pluricellulaire et permet la fusion de deux gamètes haploïdes : un spermatozoïde et un oocyte (Georgadaki *et al.* 2016). Lorsque le spermatozoïde est à proximité de l'oocyte, il va enclencher la réaction acrosomique suite à son interaction avec des protéines de la *zona pellicuda* (couche de glycoprotéines entourant l'oocyte). L'acrosome est un organite d'origine golgienne présent au niveau de la tête du spermatozoïde, contenant des enzymes protéolytiques (Roldan and Shi 2007). Lorsque la réaction acrosomique est enclenchée, la membrane interne de l'acrosome va fusionner avec la membrane plasmique du spermatozoïde. Les enzymes protéolytiques présents au niveau de l'organite vont alors être relâchés et vont hydrolyser la *zona pellicula* et les cellules granulaires présentes autour de l'oocyte afin de pouvoir fusionner avec l'œuf. La couche interne de l'acrosome va alors entrer en contact avec la région riche en microvillosités de l'oocyte et ainsi enclencher la fusion (Johnson *et al.* 1975 ; Huang and Yanagimachi 1985 ; Evans 2002).

Des protéines sont essentielles à cette fusion. Parmi celles-ci, CD9 qui appartient à la famille des tetraspanines, protéines transmembranaires qui est impliquée dans la formation des microvillosités

au niveau de la surface de l'oocyte (Kaji and Kudo 2004; Runge *et al.* 2007). La tétraspanine CD81 qui est exprimée à la surface de l'oocyte et interagit avec CD9 (Horváth *et al.* 1998). Enfin, IZUMO est situé dans l'acrosome avant la réaction acrosomique et est nécessaire à la fusion des gamètes (Inoue *et al.* 2005). Suite à la fusion de l'organite avec la membrane plasmique, IZUMO va se retrouver au niveau de la tête du spermatozoïde. C'est une protéine transmembranaire avec un domaine *immunoglobulin-like*. IZUMO interagit avec la protéine Juno, située au niveau de la membrane plasmique de l'oocyte et cette interaction est nécessaire à la fusion (Bianchi *et al.* 2014).

2. Différenciation cellulaire

2.1. Placentation

Le placenta est un organe transitoire qui est indispensable pour le développement du fœtus, qui permet la connexion entre le fœtus et l'utérus, le passage des nutriments et l'élimination des déchets (Gerbaud and Pidoux 2015). La placentation se déroule lors de l'implantation de l'embryon au niveau de l'endomètre. A ce stade, le blastocyste est composé de trophoblastes (à l'origine des enveloppes et des parties du placenta d'origine fœtale) et d'embryoblastes (à l'origine de l'embryon). Afin de se nicher au niveau de l'endomètre, les trophoblastes vont se différencier en deux types cellulaires distincts : les cytotrophoblastes (couche de cellules internes avec une forte activité mitotique) et le syncytiotrophoblaste primaire, syncytium issu de la fusion cellulaire homotypique de trophoblastes. Le syncytiotrophoblaste primaire comporte une activité protéolytique importante qui va permettre la dégradation des cellules de l'endomètre afin de permettre l'implantation de l'embryon. Deux semaines après l'implantation, un syncytiotrophoblaste secondaire est formé issu de la fusion continue de cytotrophoblastes au syncytiotrophoblaste voisin et permet alors une perpétuelle régénération du syncytium.

Plusieurs protéines vont être impliquées dans ce processus comme des cadhérines ou encore des protéines permettant le remodelage du réseau d'actine (détaillé dans la partie **1.III.B.1.1.2**). La protéine ADAM-12 joue également un rôle important lors de l'étape de pré-fusion, en permettant le clivage de la E-cadhérine et l'expression du complexe de fusion (Aghababaei *et al.* 2015). La syncytine-1 va alors

pouvoir être exprimée et promouvoir la fusion suite à son interaction avec les récepteurs ASCT1 et ASCT2 (Mi *et al.* 2000 ; Blond *et al.* 2000).

2.2. Formation des muscles squelettiques

La formation des fibres squelettiques peut impliquer plusieurs milliers de myoblastes et doit, par conséquent, être très régulée. Deux étapes sont observées au cours du développement : la myogenèse primaire où les myoblastes embryonnaires vont fusionner afin de former des fibres musculaires primaires et la myogenèse secondaire où des myoblastes vont s'aligner le long des myofibres primaires afin de leur donner de la masse (Deng *et al.* 2017).

La myogenèse se déroule en trois étapes : la reconnaissance et l'adhésion, le renforcement de la proximité cellulaire via des protrusions d'actine F et la formation du pore de fusion (Krauss *et al.* 2017). L'étape de reconnaissance va permettre une modification du transcriptome des myoblastes et de leur morphologie cellulaire grâce à la protéine Cdon qui est un corécepteur de surface cellulaire (Kang *et al.* 1997, 1998). Il va pouvoir se lier en *trans* à la N-cadhérine (Kang *et al.* 2003 ; Lu and Krauss 2010). Cette liaison va conduire à l'assemblage d'un complexe de signalisation au niveau de la région intracellulaire de Cdon et permettre l'activation de p38 α/β et l'expression de gènes de différenciation tels que MyoD (Wu *et al.* 2000 ; Takaesu *et al.* 2006 ; Tran *et al.* 2012).

La protéine Dock1 va activer la GTPase Rac1 et induire le remodelage du cytosquelette d'actine en permettant le recrutement de Arp2/3 et de l'actine F au niveau du site de contact (Laurin *et al.* 2008). Les réseaux d'actines et d'actomyosines vont ainsi être modifiés et permettre la formation de protrusions du cytosquelette (Vasyutina *et al.* 2009).

Enfin, l'étape de fusion va être finalisée grâce à l'interaction de Myomaker et de Minion/Myomerger/Myomixer.

2.3. Fusion des macrophages

Les macrophages sont des cellules hématopoïétiques présentes dans tous les tissus et qui peuvent fusionner afin de donner deux types de cellules multi-nucléées : les ostéoclastes et les cellules géantes multi-nucléées (MGC pour *Multinucleated Giant Cell* ; Vignery 2005). Cette multi-nucléation est essentielle à la différenciation des macrophages, dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

Les ostéoclastes vont permettre la résorption des os minéralisés (Walker 1975a, b). Ils jouent un rôle essentiel, avec les ostéoblastes, dans le remodelage des os, permettant une balance entre résorption et formation des os tout en empêchant l'accumulation de micro dommages (Pereira *et al.* 2018). En revanche, la formation des MGC est observée lors de la réponse immunitaire innée contre des corps étrangers, les macrophages dans les tissus étant majoritairement sous forme mononucléée (Vignery 2005). La formation de ces cellules multi-nucléées permet alors d'augmenter l'activité de phagocytose des macrophages. Les MGC peuvent être classés en différents types en fonction de leur morphologie, mais leur rôle reste encore incertain. Il est établi que les MGC et les ostéoclastes dérivent d'un progéniteur commun et que le choix de différenciation est guidé par le microenvironnement et par des stimuli externes (Pereira *et al.* 2018).

La multi-nucléation des macrophages est catégorisée en quatre étapes : 1/ la programmation de la cellule, 2/ la migration, l'adhésion et le remodelage du cytosquelette, 3/ la fusion membranaire et 4/ la reprogrammation post-fusion. La formation des ostéoclastes et des MGC va se dérouler suite à l'activation de voies de signalisation commune, mais des facteurs vont être spécifiques à chaque entité (**Figure 26** ; McInnes 1988; Miyamoto *et al.* 2012). RANKL (RANK ligand) est une cytokine qui participe à la différenciation macrophagique vers le lignage ostéoclastique en se liant à son récepteur et en activant la transcription du *nuclear factor of activated T-cells 1* (NFATc1 ; Kim and Kim 2014). La formation des MGC va être dictée par les interleukines IL-4 et IL-3 qui vont se lier au niveau du récepteur IL-4, permettant ainsi l'activation du facteur de transcription STAT6 (McInnes 1988 ; Miyamoto *et al.* 2012).

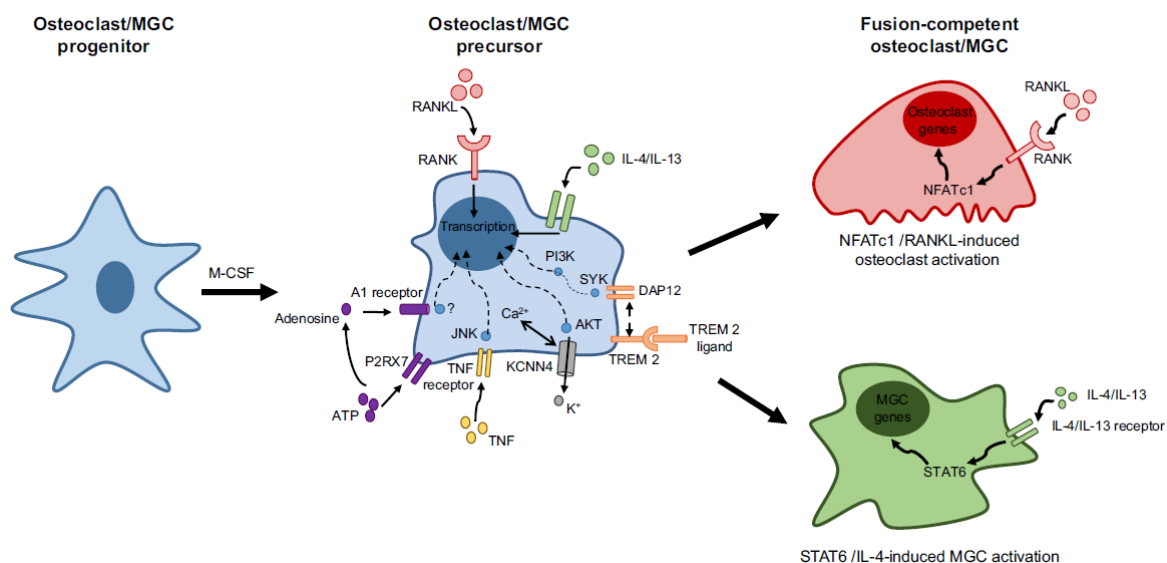


Figure 26 : Mécanismes moléculaires de la fusion des macrophages en ostéoclastes ou en MGC. La formation de ces deux cellules multinucléées va être guidée par un ensemble de mécanismes en commun. Deux voies vont être spécifiques : la voie RANKL/NFATc1 pour les ostéoclastes et la voie IL-4/STAT6 pour les MGC (Pereira *et al.* 2018).

Bien que le fusogène impliqué dans la formation des ostéoclastes et des MGC n'a pas encore été identifié, il a été démontré que le mécanisme de fusion était régulé par la protéine DC-STAMP dont l'expression est régulée par les voies RANKL/NFATc1 et IL-4/ STAT6 (Yagi *et al.* 2006).

3. Régénération et restauration cellulaire

Des tissus tels que les muscles, le foie, le cœur ou encore les os sont capables de régénération suite à une blessure. Alors que le rôle des cellules souches dans ces processus via leur capacité de différenciation a été bien étudié, des mécanismes de fusion cellulaire peuvent également contribuer à la régénération des tissus et à la restauration de la fonction de certaines cellules (Ogle *et al.* 2005).

Il est bien établi que les muscles squelettiques sont régénérés suite à la fusion de cellules souches satellites avec des myofibres, des fusions hétérotypiques peuvent également participer à la régénération de ce tissu (Yusuf and Brand-Saberi 2012). Ainsi, une étude a démontré une régénération musculaire suite à la fusion de cellules de la moelle osseuse avec des myofibres (Ferrari *et al.* 1998).

Les muscles sont composés de cellules compétentes pour la fusion, ce mécanisme, associé à leur physiologie, contribue aussi à leur réparation. En revanche, la fusion cellulaire peut être impliquée dans la régénération de tissus alors que ce mécanisme n'est pas observé lors de leur développement. Des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques marquées ont été transplantées dans des souris pour lesquelles la rétine a été altérée par du N-méthyl-D-aspartate (NMDA ; Sanges *et al.* 2013). Suite à cette altération, il a été observé la formation d'hybrides issus de la fusion entre cellules souches et neurones rétiniens, de même qu'une restauration du tissu endommagé. De manière intéressante, les auteurs ont observé que cette fusion conduisait à l'expression de la voie Wnt/ β -caténine et induisait un état souche embryonnaire avant la différenciation. Ce ne serait donc pas une trans-différenciation mais une dédifférenciation des cellules hématopoïétiques suivie d'une différenciation neuronale qui s'opérerait.

Une étude chez la drosophile adulte a également démontré que, suite à la formation d'une blessure au niveau de l'épithélium abdominal, les cellules de la brèche formaient un syncytium afin de refermer l'ouverture et de la protéger (Losick *et al.* 2013). Cette couche protectrice permet alors aux cellules souches d'être recrutées et de refermer cette blessure.

La fusion cellulaire peut également permettre de restaurer des fonctions altérées. La première observation date de 1995 chez des souris *mdx*^{-/-} (homologue murin du gène de la dystrophine, *DMD*) qui présentaient un phénotype similaire à celui des malades atteints de la dystrophie de Duchenne (Gibson *et al.* 1995). Suite à la transplantation de fibroblastes dermiques sains, des fibres musculaires exprimant *mdx* ont été observées. Après analyse de ces fibres, des noyaux du donneur et de l'hôte ont été identifiés dans le même compartiment cellulaire, étant alors la conséquence de la fusion des fibroblastes et des fibres musculaires altérées. L'expression restaurée de *mdx* dans ces hétérokaryons permet de compléter la fonction des fibres musculaires (Relvas *et al.* 1997). Des études similaires ont été réalisées suite à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, démontrant la formation d'hétérokaryons entre les cellules du donneur et celles de l'hôte (Bittner *et al.* 1999 ; Gussoni *et al.* 1999). En 2002, la contribution de la fusion cellulaire dans la restauration fonctionnelle

a été identifiée chez l'Homme. Un patient souffrant de la maladie de Duchenne et souffrant d'immunodéficience a été traité par transplantation de moelle osseuse. Suite à une biopsie musculaire, des fibres exprimant la dystrophine contenant des noyaux du donneur et de l'hôte ont été observées (Gussoni *et al.* 2002).

Des processus de restauration fonctionnelle ont également été identifiés dans le foie. Des souris *Fah*^{-/-}, présentant des défaillances hépatiques suite à l'inactivation de la fumarylacétate hydrolase, ont été transplantés avec des cellules souches de la moelle osseuse (Vassilopoulos *et al.* 2003). Une restauration de la fonction hépatique a été observée avec la présence de nodules hépatiques présentant une histologie normale et contenant les ADN de l'hôte et du donneur.

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de fusion de cellules dérivées de la moelle osseuse avec divers types de cellules. Des cellules cardiaques issues de la fusion de cardiomyocytes et de cellules de la moelle osseuse ont été retrouvées dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (Nygren *et al.* 2004). Ces cellules présentent la morphologie de cardiomyocytes normaux, mais dans cette étude, les cellules résultant de la fusion ne semblent pas être impliquées dans la réparation du myocarde. Les cellules de la moelle peuvent également fusionner avec des neurones de Purkinje (Alvarez-Dolado *et al.* 2003). Des fusions entre cellules souches mésenchymateuses et cellules épithéliales gastro-intestinales ont également été identifiées avec acquisition de caractères épithéliaux dans les cellules souches (Rizvi *et al.* 2006 ; Ferrand *et al.* 2011).

De manière intéressante, le recrutement de ces cellules au niveau de différents organes serait favorisé par une inflammation chronique au niveau des tissus et permettrait alors la fusion de ces cellules avec celles du tissu (Johansson *et al.* 2008 ; Nygren *et al.* 2008 ; Davies *et al.* 2009).

D. Fusion et cancer

En plus de son rôle physiologique, la fusion cellulaire aurait un rôle dans des pathologies et notamment dans celle du cancer (Bastida-Ruiz *et al.* 2016). En 1911, Otto Aichel, un pathologiste allemand, est le premier à faire l'hypothèse que la fusion cellulaire jouerait un rôle fondamental dans

la progression tumorale (Aichel 1911). Selon lui, la fusion d'une cellule cancéreuse avec un leucocyte permettrait de générer les anomalies chromosomiques caractéristiques des cellules tumorales et d'acquérir les capacités de migration du leucocyte à travers la circulation sanguine. Pendant longtemps cette hypothèse a été discréditée, et ce sont les travaux de Götz et Goldenberg en 1968 qui ont permis de la réhabiliter en rapportant la formation d'hybrides hautement malins suite à l'injection de cellules tumorales humaines chez le hamster. Aujourd'hui, de nombreuses observations montrent l'implication de la fusion cellulaire dans un contexte tumoral, favorisant la progression tumorale, la résistance à des drogues ou encore l'aneuploïdie, que ce soit suite à une fusion entre deux cellules tumorales ou entre une cellule tumorale et une cellule du stroma (Dittmar and Zänker 2015).

1. Fusion et altérations génomiques

1.1. Aneuploïdie et instabilité génomique des hybrides

La première conséquence de la fusion cellulaire est de générer des cellules polyploïdes en regroupant les génomes de plusieurs cellules dans une même entité. Alors que la fusion cellulaire permet de générer différents types de cellules, l'étude de Zhou *et al.* en 2015 indique que seuls les synkaryons sont capables de proliférer et que les cellules multi-nucléées (au moins tri-nucléées) sont incapables d'entrer en mitose. La formation de ces synkaryons permettrait alors d'obtenir des cellules tétraploïdes.

Dans l'étude de Zhou *et al.*, les hybrides formés à partir de cellules intestinales normales de rat présentent des altérations chromosomiques comme des cassures d'ADN double brin, des translocations robertsoniennes ainsi qu'une perte de chromosomes : ils ne présentent pas la somme exacte des chromosomes des deux parents. La présence de chromosomes anormaux a également été décrite dans l'étude de Goldenberg *et al.* en 1974, dans laquelle la fusion de cellules humaines et de hamster induit la formation de translocations. Les réarrangements trop importants de ces chromosomes n'ont d'ailleurs pas permis aux auteurs d'identifier leur origine chromosomique. Dans ces études, la fusion permet donc de générer des hybrides aneuploïdes, présentant des altérations chromosomiques numériques et structurales.

En plus de ces altérations, les hybrides présentent également une instabilité génétique. Ainsi, une réduction progressive de la ploïdie d'hépatocytes normaux, cellules pouvant se retrouver à l'état polyploïde de manière physiologique, a été observée (Duncan *et al.* 2009, 2010). La même observation a été réalisée dans des hybrides de lignées de cancer du sein/cellules souches : alors que les hybrides présentaient un nombre de chromosomes équivalent à la somme des chromosomes des deux parents au départ, au bout de 60 jours ils présentaient une réduction de leur contenu chromosomique (Rappa *et al.* 2012).

1.2. Formation d'altérations dans les hybrides

1.2.1. Transition « hétérokaryon-synkaryon »

La formation de synkaryons induit des réarrangements génomiques et structuraux (Bastida-Ruiz *et al.* 2016). Ces hybrides sont issus d'hétérokaryons dans lesquels les deux génomes parentaux vont être regroupés dans un seul noyau ; cette étape est appelée transition « hétérokaryon-synkaryon ».

La formation de synkaryon serait issue soit de la fusion des noyaux soit de l'entrée en mitose de la cellule hybride à l'état d'hétérokaryon, induisant la perte de l'enveloppe nucléaire et ainsi le regroupement des deux génomes parentaux dans le cytoplasme. Alors que, à ma connaissance, aucune étude n'a confirmé la première hypothèse, la formation de synkaryon suite à une entrée en mitose a été reportée (Zhou *et al.* 2015 ; Sottile *et al.* 2016).

Le passage de l'état d'hétérokaryon à celui de synkaryon serait à l'origine des altérations observées dans les hybrides. Un des principaux problèmes de l'entrée en mitose de ces cellules polyploïdes est la présence de quatre centrosomes qui vont induire la formation d'un fuseau multipolaire et des erreurs de ségrégation (Ganem *et al.* 2009 ; Godinho and Pellman 2014).

La formation de mitoses multipolaires consécutives à la fusion a pu être observée (Zhou *et al.* 2015). Ces anomalies ont également été identifiées à des passages plus tardifs dans des hybrides, participant alors à l'instabilité génomique de ces cellules (Duncan *et al.* 2010 ; Rappa *et al.* 2012).

1.2.2. Cycle cellulaire et fusion

En 1970, Rao et Johnson réalisent des expériences de fusion de cellules à différentes phases du cycle (hétérophasique) et identifient une condensation prématurée des chromosomes (PCC pour *Premature Chromosome Condensation*) lors de fusion entre des cellules en phase mitotique (M) et des cellules interphasiques (G1, S ou G2; Rao and Johnson 1970, 1972). Ceci va alors conduire à la formation de chromosomes condensés à une chromatide pour les G1, de chromosomes à deux chromatides pour les G2 et à la fragmentation des chromosomes pour les cellules en phase S (**Figure 27**). Cette pulvérisation serait la conséquence d'une condensation précoce des chromosomes et la cassure des séquences simple-brin au niveau des origines de réplication, induisant alors la formation de cassures au niveau de l'ADN. Les autres combinaisons réalisées dans cette étude ont montré que la fusion entre une cellule en phase G1 et une en phase S allait conduire à une entrée précoce du noyau G1 en phase de réplication. Lors de la fusion entre les phases G1 et G2 ou S et G2, les noyaux en G2 arrêtent leur cycle, attendant que les noyaux plus précoces soient également en G2.

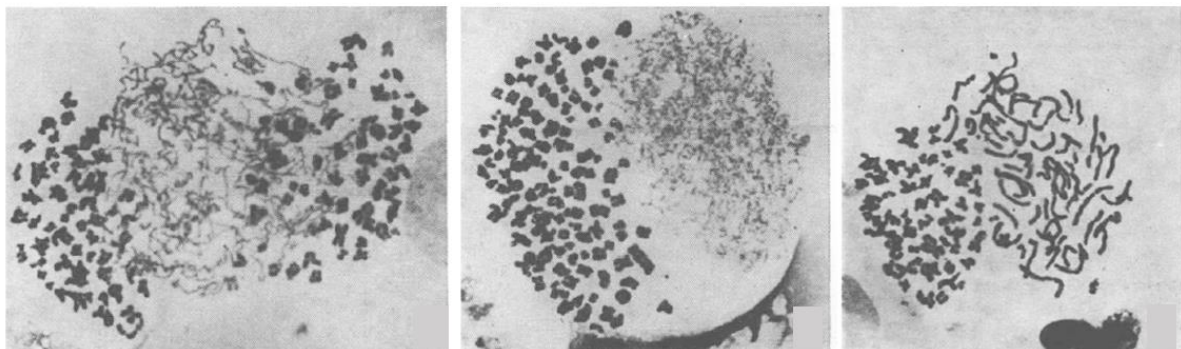


Figure 27 : Condensation prématurée de chromosomes dans des cellules issues de fusions hétérophasiques.

A gauche, un étalement chromosomique d'un hybride issu de la fusion d'une cellule en phase G1 (au centre de la photo) et de deux cellules en phase M est représenté. Au milieu, étalement chromosomique d'un hybride issu de la fusion d'une cellule en phase S et d'une cellule en phase M. Les chromosomes de la cellule en phase S sont pulvérisés. A droite, étalement chromosomique d'une cellule contenant des chromosomes G2 condensés (droite) et des chromosomes de phase M (gauche ; Johnson and Rao 1970).

Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de certains facteurs cytoplasmiques dans le bon déroulement du cycle cellulaire. Le cycle est unidirectionnel : il va toujours se dérouler

selon le même ordre, sans retour en arrière possible. Lors de la fusion entre des cellules mitotiques et des cellules interphasiques, le *mitosis promoting factor* (MPF), complexe protéique impliqué dans le déroulement de la phase M, va conduire à la condensation prématurée des chromosomes (Miake-Lye and Kirschner 1985).

D'autres études ont également étudié ce mécanisme afin de déterminer la répartition des chromosomes précocement condensés lors de la première mitose. Alors que certaines protéines du kinétochore semblent se localiser au niveau des chromosomes précocement condensés, la plupart de ces chromosomes présente un défaut de recrutement du fuseau mitotique (Rao and Johnson 1972 ; Ghosh and Paweletz 1987). Les fragments observés lors de la fusion entre des cellules en phase S et M sont aléatoirement répartis dans les cellules filles, pouvant alors conduire à une perte de chromosomes.

La PCC dans des cellules fusionnées a été observée dans certains cancers et pourrait être génératrice d'altérations génétiques (Kovacs 1985).

2. Héritage et acquisition de propriétés par les hybrides

2.1. Instabilité et évolution tumorale via la fusion cellulaire

En 1976, Nowell décrit un modèle de l'évolution clonale dans laquelle la variabilité génétique et la sélection permettent l'expansion de cellules tumorales de plus en plus malignes (Nowell 1976). L'évolution tumorale suit un modèle darwinien d'évolution, dans lequel une cellule acquerrait une altération lui conférant un avantage sélectif (Zellmer and Zhang 2014).

Le modèle d'Aichel place alors la fusion cellulaire comme mécanisme contribuant à cette évolution tumorale. Le regroupement des cellules conduit à un transfert génétique horizontal, permettant l'héritage des propriétés cellulaires de chaque parent à l'hybride (Bastida-Ruiz *et al.* 2016). Selon lui, la fusion entre une cellule tumorale et un leucocyte permettrait la dispersion de cette cellule au niveau de sites secondaires, lui attribuant alors un avantage sélectif. De plus, les hybrides obtenus sont polyploïdes et génèrent des altérations génétiques, mécanisme qui permettrait l'acquisition de nouvelles propriétés.

Lazebnik relie la capacité de ces hybrides à acquérir de nouvelles propriétés à des mécanismes d'évolution identifiés dans les plantes (Lazebnik 2014). La polyplœidie est fréquemment observée dans les plantes selon deux mécanismes : l'autopolyploïdie, résultante de la duplication du génome d'une même espèce, ou l'allopolyplœidie, combinaison des génomes de plusieurs espèces. Alors que l'autopolyploïdie peut être sans conséquence, l'allopolyplœidie permet de générer une plasticité phénotypique et contribue à l'évolution des espèces. Ce mécanisme peut générer de nombreuses altérations génomiques (duplication, inversion, délétion, translocation, *etc.*), favorisant alors l'émergence de nouveaux phénotypes.

La formation de cellules tétraploïdes consécutives à la fusion permettrait, selon le modèle d'instabilité génétique « diploïdie-tétraploïdie-aneuploïdie », de contribuer à l'instabilité génétique, à l'hétérogénéité tumorale et à la progression tumorale (Gerlinger *et al.* 2014 ; **Figure 28**).

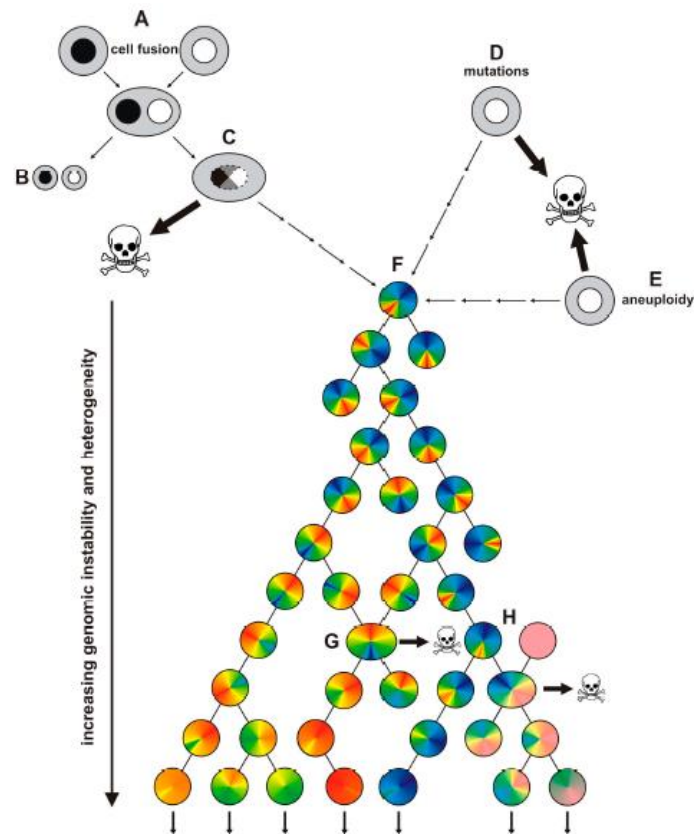


Figure 28 : Induction d'instabilité génétique dans les cancers par mutation, aneuploïdie ou par fusion cellulaire.

La fusion cellulaire conduit à la formation d'hétérokaryons (A), qui peuvent soit réaliser une réduction chromosomique avec formation de deux cellules filles (B) soit former un synkaryon (C). Si, la plupart des synkaryons va mourir, certains peuvent toutefois survivre et proliférer. La fusion comme les mutations (D) ou l'aneuploïdie (E) peuvent contribuer à l'instabilité génétique et former une cellule cancéreuse avec de nouvelles capacités (F). Des mécanismes de fusion peuvent se dérouler lors de la progression tumorale entre deux cellules cancéreuses (G) ou entre une cellule normale et une cellule cancéreuse (H), et ainsi favoriser l'hétérogénéité tumorale (Dittmar and Zänker 2015).

Il était donc important de comprendre le rôle de la fusion dans la tumorigenèse, notamment en identifiant si elle était un processus pro ou anti-tumoral. La fusion a longtemps été utilisée comme outil afin de caractériser des mécanismes de trans-différenciation notamment dans des modèles d'hétérokaryons, afin de comprendre le rôle de certains facteurs cytoplasmiques (Ogle *et al.* 2005). Ce mécanisme a permis de définir si le caractère malin était récessif ou non. Les premières études réalisées en 1968 ont démontré que les hybrides formés entre cellules du stroma et les cellules tumorales étaient plus agressifs, soutenant alors la conclusion que ce caractère serait dominant (Götz and Goldenberg 1968). Cependant, d'autres études ont démontré une perte des capacités tumorales suite à la fusion

entre cellules tumorales et cellules normales (Harris *et al.* 1969 ; Harris 1971 ; Stanbridge 1976). La présence de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules normales conduisait à l'inhibition de la progression tumorale. De manière intéressante, les hybrides retrouvaient cette capacité au cours du temps, suite à la perte successive de chromosomes. Ces études ont été les premières qui ont permis d'identifier les gènes suppresseurs de tumeurs (Harris 1993). En induisant des altérations génétiques et en regroupant dans une seule entité les génomes des deux parents, la fusion permettrait aux cellules tumorales d'évoluer, soit par un héritage, soit par une acquisition de nouvelles propriétés (**Figure 29**).

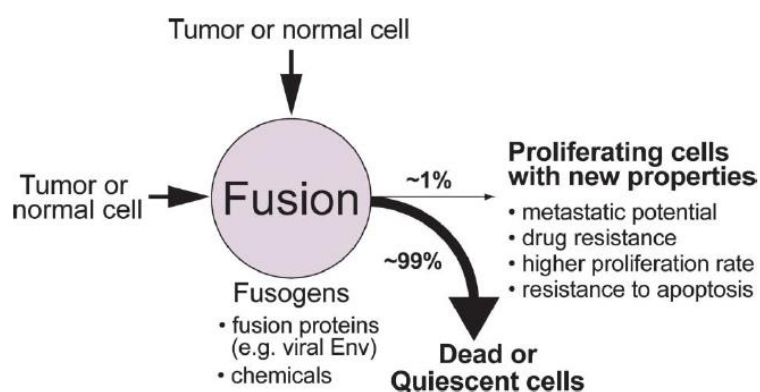


Figure 29 : La fusion cellulaire permet de générer de la diversité cellulaire.
(Duelli and Lazebnik 2003)

La fusion peut également être délétère pour la cellule. Le phénotype obtenu par la fusion cellulaire n'est pas prévisible, l'instabilité générée peut être en défaveur de l'hybride en ne conservant pas des gènes participant à la progression tumorale (Mohr *et al.* 2015). Les différentes études réalisées *in vitro* et *in vivo* indiquent que 1% des cellules tumorales fusionnent (Miller *et al.* 1988 ; Fortuna *et al.* 1989 ; Wakeling *et al.* 1994 ; Duelli and Lazebnik 2003). De plus, parmi les hybrides, seuls 1% survivent et exhibent de nouvelles propriétés, représentant alors 0,01% des cellules tumorales issues de fusion cellulaire (Dittmar and Zänker 2015). Cependant, une étude de 2016 indique que, suite à une xénogreffe sur souris, 6% des cellules tumorales seraient des hybrides issus d'une fusion avec les cellules murines (Yan *et al.* 2016).

2.2. Participation à la progression tumorale

2.2.1. Développement métastatique

Les métastases sont la principale cause de décès des patients atteints de cancer. L'acquisition de capacités métastatiques va conduire à une modification du comportement des cellules tumorales, incluant la migration, l'invasion, la circulation dans les systèmes sanguin ou lymphoïde, et la capacité de pouvoir rejoindre et se loger au niveau d'un site secondaire (Seyfried and Huysentruyt 2013). Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant ce changement de comportement des cellules tumorales à l'origine de la formation de métastases : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, pour *epithelial to mesenchymal transition*), une accumulation de mutations ou encore la contribution du microenvironnement, notamment via les macrophages ou encore la fusion cellulaire entre un macrophage et une cellule tumorale (Pawelek and Chakraborty 2008).

Les macrophages sont des cellules très importantes de l'environnement tumoral, pouvant jouer un rôle pro ou anti-tumoral (Seyfried and Huysentruyt 2013). Ces cellules sont hautement fusogènes, et il a été démontré qu'elles pouvaient également fusionner avec des cellules tumorales chez l'Homme (Chakraborty *et al.* 2004 ; Yilmaz *et al.* 2005 ; Andersen *et al.* 2007 ; Shabo *et al.* 2008 ; Clawson *et al.* 2012, 2015 ; Lazova *et al.* 2013 ; Ramakrishnan *et al.* 2013 ; **Tableau 6**).

Authors	Tumor Cells	Normal Cells	Marker
Chakraborty <i>et al.</i> , 2004	Renal cell carcinoma	BMDCs	PCR analysis of blood group alleles *
Yilmaz <i>et al.</i> , 2004	Renal cell carcinoma	BMDCs	FISH analysis of Y chromosome *
Andersen <i>et al.</i> , 2007	Multiple myeloma	Osteoclasts	FISH analysis
Shabo <i>et al.</i> , 2008, 2009, 2011, 2013	Breast cancer, colorectal cancer	Macrophages	CD163, MAC387, DAP12
Clawson <i>et al.</i> , 2012	Melanoma, colorectal cancer	Macrophages	CD45, CD14, Cytokeratin (KRT)
Lazova <i>et al.</i> , 2013	Melanoma cells	BMDCs	STR analysis *
Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2013	Epithelial ovarian carcinoma	BMDCs	CD45, CXCR4
Clawson <i>et al.</i> , 2015	Melanoma	Macrophages	CD14, CD68, CD163, CD204, CD206, CXCR4, CD44, ALCAM, MLANA

* Cancer patients that once received a BMT—Analysis of donor DNA in recipient cancer samples.

Tableau 6 : Liste d'études relatant l'identification de fusion entre des cellules tumorales et des cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) ou des macrophages.

BMT : *Bone Marrow Transplant* (Dittmar and Zänker 2015)

Certaines des études rapportant l'identification de fusions entre cellules tumorales et macrophages se basent sur l'expression de marqueurs macrophagiques par les cellules tumorales. Cependant, ceci porte à controverse car pourrait être expliqué par une modification transcriptomique des cellules tumorales, permettant l'expression de ces marqueurs à leur surface. Les études confirmant la présence de cellules issues de fusion dans des tumeurs ont été obtenues à partir de tumeurs de patients ayant subis au préalable une transplantation de moelle osseuse et dans lesquelles sont retrouvées des hybrides présentant des marqueurs génétiques du donneurs et de l'hôte (Chakraborty *et al.* 2004 ; Yilmaz *et al.* 2005 ; Lazova *et al.* 2013). L'étude de Lazova *et al.*, a notamment permis de démontrer que toutes les cellules tumorales d'une métastase cérébrale de mélanome présentaient des marques génétiques du patient et du donneur, et ceci indiquerait alors l'importance de la fusion cellulaire dans la formation de métastases. Le rôle des macrophages dans la dissémination métastatique suite à la formation d'hybrides a été observé dans de nombreuses études (Götz and Goldenberg 1968 ; Rachkovsky *et al.* 1998 ; Sodi *et al.* 1998 ; Pawelek *et al.* 1999 ; Chakraborty *et al.* 2001 ; Goldenberg *et al.* 2012). Il a pu aussi être démontré que la fusion de cellules dérivées de la moelle avec des cellules tumorales conduisait à la perte d'expression de la E-cadhérine dans les hybrides qui gagneraient en caractères mésodermiques, avec une perte d'adhérence et une activation des mécanismes de mobilité (Bastida-Ruiz *et al.* 2016).

Selon Duelli et Lazebnick, la fusion entre macrophages et cellules tumorales suivrait un modèle qu'ils appellent « le loup dans la bergerie » : l'environnement tumoral riche en macrophages favoriserait cette fusion (Duelli and Lazebnik 2003). De plus, les modifications phénotypiques des cellules métastatiques sont similaires à celles retrouvées dans des cellules myéloïdes, notamment les macrophages. Les cellules métastatiques présentent alors des comportements similaires aux macrophages comme la phagocytose, la fusion cellulaire, l'expression d'antigènes (Seyfried and Huysentruyt 2013). La fusion entre cellules cancéreuses et macrophages permettrait alors d'expliquer ces similitudes.

La fusion modifie également le tropisme cellulaire. La fusion de lignées tumorales non-métastatiques de plasmacytome et de myélome avec des cellules normales (lymphocytes, cellules dendritiques et macrophages) conduit à l'acquisition de propriétés métastatiques, avec des sites de développement de métastases différents en fonction du type de cellules normales fusionnées (De Baetselier *et al.* 1984). De plus, la fusion entre une lignée tumorale d'un cancer du sein permettant la formation de métastases dans les os et d'une autre qui dissémine au niveau du poumon conduit à la formation d'hybrides développant des métastases dans les os et dans le poumon (Lu and Kang 2009). De manière intéressante, les principaux sites de développement de métastases humaines (poumon et foie) sont également les sites principaux de localisation de macrophages (Seyfried and Huysentruyt 2013).

2.2.2. Résistance aux drogues

La fusion cellulaire participerait à des processus de résistance aux drogues. Miller *et al.* en 1989 décrivent la fusion spontanée de deux lignées issues de sous-populations de la même lignée tumorale et présentant une résistance pour le méthotrexate ou pour le 5-fluorouracil. La lignée hybride obtenue est résistante pour les deux drogues, mais présente également une résistance au melphalan. Les capacités métastatiques de l'hybride sont augmentées comparées à celles des cellules tumorales parentales.

Une étude récente de fusion entre des fibroblastes murins embryonnaires normaux et des cellules tumorales de mélanomes a mis en évidence que certains hybrides présentaient une nouvelle résistance à la doxorubicine et au paclitaxel (Searles *et al.* 2018). Cette résistance est également montrée *in vivo* : le pourcentage d'hybrides dans les tumeurs serait augmenté suite au traitement avec ces chimiothérapies. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans une étude de fusion de cellules tumorales de cancer du sein, dans laquelle le pourcentage d'hybrides dans les tumeurs développées chez la souris était deux fois plus important lorsque les souris étaient traitées avec de l'épirubicine (Yan *et al.* 2016).

3. Mécanisme de fusion des cellules tumorales

Bien que le mécanisme impliqué dans la fusion des cellules cancéreuses ne soit pas précisément identifié, plusieurs voies ont été proposées.

Des virus peuvent être à l'origine du développement tumoral (Duelli and Lazebnik 2007). Il a d'ailleurs été observé l'association entre le HHV-8 et le sarcome de Kaposi (Chang *et al.* 1994). Les virus associés à des processus tumoraux induisent tous des mécanismes de fusion, précédemment décrits dans la partie 1.III.2.2. (Tableau 7).

Family	Human oncogenic virus	Cancer association	Causes cell fusion?	Cytopathological evidence of tetraploidization?
Flaviviridae	Hepatitis C virus	Hepatocellular carcinoma (increased incidence of lymphoma)	Yes	Yes ¹³⁰
Hepadnaviridae	Hepatitis B virus	Hepatocellular carcinoma	Yes	Yes ¹³⁰
Herpesviridae	Epstein-Barr virus (HHV-4)	Burkitt lymphoma Hodgkin lymphoma	Yes	Near diploid ^{131,132}
		Naso pharyngeal carcinoma Gastric carcinoma	Yes	Yes ^{131,132}
	Kaposi sarcoma virus (HHV-8)	Kaposi sarcoma	Yes	Primarily near diploid
Retroviridae	Human T-lymphotropic virus 1	Adult T-cell leukaemia or lymphoma	Yes	Primarily near diploid
Papillomaviridae *	Human papillomavirus	Anogenital cancers	Unknown	Yes ⁵⁸

Tableau 7 : Virus oncogéniques humains.

(adapté de Duelli and Lazebnik 2007)

*L'implication du papillomavirus humain dans la formation de cellules de fusion a été identifié après l'écriture de cette revue (Hu *et al.* 2009).

La contribution à l'oncogénèse de la fusion cellulaire effectuée par des virus n'est pas encore bien définie. En 2007, une étude a démontré que les hybrides formés par une infection virale présentaient des altérations génomiques et étaient capables d'initier des tumeurs (Duelli *et al.* 2007). La fusion induite par des virus permettrait aussi de transformer des cellules normales contrairement à la fusion spontanée qui conduirait à la mort cellulaire (Duelli *et al.* 2005).

Des protéines impliquées dans des processus physiologiques de fusion ont également été observées comme exprimées dans des cancers. La syncytine-1 est ainsi surexprimée dans de nombreux

cancers comme des lymphomes et certains carcinomes (Bastida-Ruiz *et al.* 2016). L'inhibition de cette protéine empêche la formation de fusion entre des cellules de cancer du sein et des cellules endothéliales (Bjerregaard *et al.* 2006). Cependant, cette surexpression dans un contexte tumoral n'a pas été démontrée comme associée à la formation de cellules fusionnées.

L'inflammation chronique contribue au recrutement et à la fusion des cellules de la moelle osseuse avec des cellules de tissus endommagés. Ce processus pourrait également être impliqué dans la fusion de cellules tumorales. Il a ainsi pu être montré que la cytokine pro-inflammatoire TNF- α favorisait le pourcentage de fusion entre des lignées cellulaires de sein et des cellules cancéreuses mammaires et entre des cellules endothéliales et des cellules de carcinomes (Song *et al.* 2012 ; Mohr *et al.* 2015). L'étude de Mohr montre également que la fusion cellulaire induite par TNF- α était augmentée en condition hypoxique ; l'induction de l'inflammation par l'hypoxie est par ailleurs connue et permet notamment l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Eltzschig and Carmeliet 2011). De plus, l'apoptose induite par des conditions hypoxiques favorise également la formation d'hybrides (Noubissi *et al.* 2015).

E. Conclusion

La fusion cellulaire contribue à de nombreux processus physiologiques, que ce soit lors de la fécondation ou lors de la différenciation cellulaire. Elle permet alors aux cellules de pouvoir réaliser leurs fonctions. Ce mécanisme participe également à la régénération cellulaire, notamment via la formation d'hétérokaryons de deux cellules différenciées. L'état différencié serait donc non-figé, et celui-ci peut être modifié via des processus de fusion. La fusion permet donc de définir le devenir d'une cellule.

Ce mécanisme va permettre de générer des cellules polyploïdes. Le regroupement de plusieurs génomes dans le même compartiment est essentiel pour la réalisation de leur fonction, mais permet également de restaurer des phénotypes.

Cette polyploïde peut aussi conduire à l'évolution de certaines espèces, la contribution de la fusion cellulaire dans l'évolution des plantes est d'ailleurs reconnue. En regroupant différents

géotypes, elle favorise l'adaptation des espèces à leur environnement et l'acquisition de nouvelles fonctions en modifiant les génomes des cellules parentales.

La fusion cellulaire serait alors un évènement évolutif, et ce notamment dans un contexte pathologique. En 1911, Aichel faisait l'hypothèse que ce mécanisme pouvait contribuer à l'oncogenèse. Aujourd'hui, de nombreuses études ont démontré le rôle de la fusion dans la génération de l'instabilité génétique et la progression tumorale. Les tumeurs peuvent détourner les mécanismes physiologiques de fusion à leur avantage, en exprimant des fusogènes ou en fusionnant avec des cellules du stroma compétentes pour la fusion. Ce mécanisme pourrait alors contribuer à l'évolution tumorale, en accord avec le modèle d'évolution défini par Peter C. Nowell.

La fusion cellulaire physiologique est retrouvée dans deux types de cellules mésenchymateuses, les myoblastes et les macrophages. Appliqué aux sarcomes à « génétique complexe », ce mécanisme pourrait alors expliquer l'instabilité chromosomique de ces cellules.

Lorsque j'ai débuté ma thèse, les études relatives à la génétique des sarcomes à « génétique complexe » avaient été réalisées à l'aide de puces génomiques, de puces d'expression et des techniques de cytogénétique. Ces travaux avaient conduit à l'identification d'altérations récurrentes mais l'oncogenèse de ces tumeurs restait encore mal comprise. Il était néanmoins établi que ces tumeurs sont caractérisées par une haute complexité chromosomique.

Le premier objectif de ma thèse était de savoir si ces tumeurs présentaient des altérations récurrentes et spécifiques, qui n'auraient pas pu être identifiées, faute de techniques adaptées. Pour cela, le séquençage du transcriptome par séquençage des ARNm (*RNA sequencing* ou RNA-seq) a été réalisé sur 112 sarcomes pléomorphes. A l'aide de ces données, j'ai alors recherché des gènes de fusion spécifiques à ces tumeurs.

Puis, je me suis intéressée au mécanisme induisant ces altérations. Des données obtenues préalablement dans mon laboratoire d'accueil avaient démontré que les lignées de sarcomes pouvaient fusionner spontanément. Ce mécanisme est par ailleurs impliqué dans la différenciation cellulaire de certaines cellules mésenchymateuses. Dans des conditions tumorales, la fusion cellulaire conduit à l'aneuploïdie et à l'instabilité génétique. Le deuxième objectif de ma thèse était donc de déterminer si la fusion cellulaire permettait de générer une instabilité chromosomique similaire à celles des sarcomes à « génétique complexe ».

Partie 2 : Résultats expérimentaux

I. ÉTUDE DE TRANSCRITS CHIMÉRIQUES DANS LES SARCOMES A « GENETIQUE COMPLEXE »

A. Identification de transcrits chimériques récurrents avec conservation du cadre de lecture

Le génome des sarcomes est caractérisé par des anomalies chromosomiques. Dans le sous-groupe des sarcomes à « génétique simple », des translocations sont notamment à l'origine de gènes de fusion récurrents et spécifiques à chaque entité histologique (Mitelman *et al.* 2007; Taylor *et al.* 2011). Ces gènes de fusion sont des *drivers* forts.

A l'inverse, l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe » n'est pas encore bien comprise. Les différentes entités de ce groupe de tumeurs se distinguent par leur différenciation cellulaire, mais celle-ci n'est pas associée à une altération génétique spécifique. Les sarcomes à « génétique complexe » partagent toutefois une génétique assez semblable. Leur génome est hautement remanié et des altérations récurrentes sont retrouvées dans l'ensemble des types histologiques, comme la perte de *RBI*, l'inactivation systématique de la voie p53 ou l'amplification du bras court du chromosome 5 (Chibon *et al.* 2000 ; Adamowicz *et al.* 2006 ; Pérot *et al.* 2010 ; Gibault *et al.* 2011). L'origine génétique et cellulaire de ces différents types histologiques est encore inconnue.

L'analyse génomique des sarcomes à « génétique complexe » a été majoritairement réalisée par des techniques de cytogénétique moléculaire, comme la CGH-*array* et la FISH 24 couleurs (**Figure 17**, partie **1.II.2**). Ce sont d'ailleurs ces deux techniques qui ont mis en évidence leurs altérations génétiques récurrentes et la complexité de leur génome. Cependant, elles présentent des limites : la FISH 24 couleurs ne permet pas l'identification de réarrangements intra-chromosomiques et la CGH-*array* informe sur le nombre de copies de régions génomiques, sans indiquer comment ces régions chromosomiques sont organisées dans le génome (échange inter-chromosomique, inversion, insertion, *etc.*). Il était donc nécessaire d'utiliser de nouveaux outils pour mieux caractériser ces génomes.

La technique de séquençage RNA-seq permet d'investiguer les conséquences transcriptomiques majeures de réarrangements chromosomiques (Bainbridge *et al.* 2006 ; Mortazavi *et al.* 2008 ; Marioni *et al.* 2008). En effet, cette technique de séquençage haut-débit permet la détection de transcrits chimériques, dont l'expression est la conséquence d'altérations chromosomiques structurales. Aussi, l'utilisation du RNA-seq a conduit à l'identification d'une altération récurrente, issue de ce type de réarrangement, dans deux sous-types histologiques de sarcomes : les gènes de fusion *NAB2-STAT6* dans les tumeurs fibreuses solitaires (Chmielecki *et al.* 2013; Robinson *et al.* 2013) et *BCOR-CCNB3* dans un sous-type de sarcomes à petites cellules rondes (Pierron *et al.* 2012). La biologie de ces tumeurs est aujourd'hui mieux comprise grâce à l'identification de ces altérations.

Les sarcomes à « génétique complexe » présentant de nombreux réarrangements structuraux, nous avons donc voulu déterminer qu'elles étaient leurs conséquences. L'objectif de ce premier travail était alors de rechercher des gènes de fusion spécifiques des sarcomes à « génétique complexe ». Pour cela, le séquençage du transcriptome d'une cohorte de 112 tumeurs et de cinq lignées a été réalisé par RNA-seq.

1. Article 1 : *Recurrent TRIO fusion in nontranslocation-related sarcomas*

Delepaul L, Lesluyes T, Pérot G, Brulard C, Lartigue L, Baud J, Lagarde P, Le Guellec S, Neuville A, Terrier P, Vince-Ranchère D, Schmidt S, Debant A, Coindre JM, Chibon F.

Manuscrit publié dans *Clinical Cancer Research* (2017).

Résumé

Les sarcomes à « génétique complexe » sont caractérisés par une importante complexité génomique mais ne possèdent pas d'altération génétique spécifique et récurrente. Les analyses de cytogénétique ont conduit à l'identification de gains, de pertes et d'échanges chromosomiques dans le génome de ces tumeurs. Cependant, les conséquences de cette complexité restent encore peu connues. Le but de cette étude était d'identifier des nouvelles altérations récurrentes dans ce groupe de sarcomes. La moitié des sarcomes à « génétique simple » étant associée à un gène de fusion spécifique, nous avons donc recherché si le groupe de sarcomes à « génétique complexe » pouvait également être caractérisé par ce type d'altération. Pour cela, l'analyse par RNA-seq de 112 tumeurs et cinq lignées a été réalisée. Un seul gène de fusion, issu de la fusion entre les exons 33 ou 34 de *TRIO* et les exons 2 ou 3 de *TERT*, a été identifié comme récurrent dans ces tumeurs. Il est retrouvé dans cinq sarcomes à « génétique complexe », de types histologiques différents. Ce gène de fusion entraîne la formation d'un gène *TRIO* tronqué avec une perte du cadre de lecture de *TERT*. Une analyse complémentaire a ensuite conduit à l'identification de deux autres tumeurs exprimant des transcrits chimériques impliquant le gène *TRIO*, fusionné avec d'autres partenaires. Les gènes de fusion de *TRIO* sont associés à une modification transcriptomique et sont impliqués dans la prolifération cellulaire. Ils conduiraient ainsi à la production d'une protéine tronquée et sont spécifiques des sarcomes à « génétique complexe ».

Recurrent *TRIO* Fusion in Nontranslocation-Related Sarcomas

Lucile Delespaul^{1,2}, Tom Lesluyes^{1,2}, Gaëlle Pérot^{1,3}, Céline Brulard¹, Lydia Lartigue^{1,2}, Jessica Baud^{1,2}, Pauline Lagarde¹, Sophie Le Guellec⁴, Agnès Neuville^{1,3}, Philippe Terrier⁵, Dominique Vince-Ranchère⁶, Susanne Schmidt⁷, Anne Debant⁷, Jean-Michel Coindre^{1,2,3}, and Frédéric Chibon^{1,3}

Abstract

Purpose: Despite various differences, nontranslocation-related sarcomas (e.g., comprising undifferentiated pleomorphic sarcoma, leiomyosarcoma, myxofibrosarcoma) are unified by their complex genetics. Extensive analysis of the tumor genome using molecular cytogenetic approaches showed many chromosomal gains, losses, and translocations per cell. Genomic quantitative alterations and expression variations have been extensively studied by adapted high-throughput approaches, yet translocations still remained unscreened. We therefore analyzed 117 nontranslocation-related sarcomas by RNA sequencing to identify fusion genes.

Experimental design: We performed RNA sequencing and applied a bioinformatics pipeline dedicated to the detection of fusion transcripts. RT-PCR and Sanger sequencing were then applied to validate predictions and to search for recurrence and specificity.

Results: Among the 6,772 predicted fusion genes, 420 were in-frame. One recurrent rearrangement, consistently involving *TRIO*

with various partners, was identified in 5.1% of cases. *TRIO* translocations are either intrachromosomal with *TERT* or inter-chromosomal with *LINC01504* or *ZNF558*. Our results suggest that all translocations led to a truncated *TRIO* protein either directly or indirectly by alternative splicing. *TRIO* rearrangement is associated with a modified transcriptomic program to immunity/inflammation, proliferation and migration, and an increase in proliferation.

Conclusions: *TRIO* fusions have been identified in four different sarcoma histotypes, likely meaning that they are not related to a primary oncogenic event but rather to a secondary one implicated in tumor progression. Moreover, they appear to be specific to nontranslocation-related sarcomas, as no such rearrangement was identified in sarcomas with simple genetics. More cases could lead to a significant association of these fusions to a specific clinical behavior. *Clin Cancer Res*; 23(3): 857–67. ©2016 AACR.

Introduction

Sarcomas represent a heterogeneous group of rare tumors accounting for approximately 1% of adult cancers with more than 50 histologic subtypes. These tumors, derived from mesenchymal tissues (i.e., soft tissue, bone, or muscle), are classified on the basis of their line of differentiation, following the World Health Organization (WHO) recommendations (1). Along with this histologic heterogeneity, sarcoma genetics is also highly heterogeneous in terms of oncogene-specific driver

alterations and whole-genome instability. Sarcomas can be classified into two groups depending on genome stability. One group consists of sarcomas with a relatively stable genome with specific oncogenic alterations (rare gains and losses involving mainly full chromosomes). Among these, gastrointestinal stromal tumors (GIST; *KIT* or *PDGFRA* mutations; ref. 2) and sarcomas with a specific translocation (e.g., Ewing sarcoma, synovial sarcoma, and alveolar rhabdomyosarcoma; refs. 3–5) represent 20% and 30% of sarcomas, respectively. The second group consists of nontranslocation-related sarcomas with higher chromosomal instabilities and pleomorphic histologic patterns. There is no specific genetic alteration described so far in those sarcomas. Nevertheless, we can distinguish well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma (20% of sarcomas) with recurrent *MDM2* and *CDK4* amplification within a moderately rearranged profile (6, 7). The remaining 30% mainly comprise leiomyosarcoma, undifferentiated pleomorphic sarcoma, myxofibrosarcoma, pleomorphic liposarcoma, and pleomorphic rhabdomyosarcoma. Although their genomic instability has not been deciphered yet, some recurring genetic alterations have been identified in these tumors: the 13q14-21 region is frequently lost in leiomyosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcoma targeting *RBI* deletion/inactivation (8); the TP53 pathway is consistently inactivated, mainly by TP53 deletions/mutations (9); and a gain of 5p region is also frequent and triggers *TRIO* amplification (10, 11). Extensive

¹Inserm U916, Bergonié Cancer Institute, Bordeaux, France. ²University of Bordeaux, Bordeaux, France. ³Department of Pathology, Bergonié Cancer Institute, Bordeaux, France. ⁴Department of Pathology, University Cancer Institute Toulouse-OncoPole, Toulouse, France. ⁵Department of Pathology, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France. ⁶Department of Pathology, Léon Bérard Center, Lyon, France. ⁷Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier, CRBM, CNRS-UMR 5237, University of Montpellier, Montpellier, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Frédéric Chibon, Institut Bergonié, 229 Cours de l'Argonne, Bordeaux 33000, France. Phone: 055-633-4443; Fax: 055-633-4438; E-mail: F.chibon@bordeaux.unicancer.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0290

©2016 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Nontranslocation-related sarcoma is one of the most common and aggressive subtype of soft tissue sarcomas. Despite extensive quantitative and structural characterization of their genome and transcriptome, it remains the largest sarcoma group without any specific genetic alteration that can be targeted for therapy. Therefore, treatment is still based on surgery with wide margins. Previous high-throughput studies based on quantitative analysis failed to identify such specific alteration. We thus applied RNA sequencing on a large cohort of nontranslocation-related sarcomas from the French Sarcoma Group and identified recurrent, and so far specific, *TRIO* fusions with various partners. Fusion-positive tumors belong to four different histotypes, likely meaning that fusions are not related to a specific primary oncogenic event but rather to a secondary one implicated in tumor progression. Our data suggest that fusion triggers a modified transcriptomic and phenotypic program that could lead to an increase in cell proliferation.

analysis of the tumor genome by molecular cytogenetic approaches showed many breakpoints [array comparative genomic hybridization (aCGH)] and translocations per cell (chromosome painting; refs. 12, 13). Breakpoints located in coding regions are supposed to produce chimeric transcripts with potent oncogenic effects. It has been demonstrated that RNA sequencing (RNA-seq) is an efficient approach to identify fusion transcripts in tumors, particularly in sarcomas (14–16). Hence, we subjected 117 nontranslocation-related sarcomas to RNA-seq to identify fusion transcripts.

Materials and Methods

Ethics statement

The samples used in this study are part of the Biological Resources Center of Institut Bergonié (CRB-IB; Bordeaux, France). In accordance with the French Public Health Code (articles L. 1243-4 and R. 1243-61), the CRB-IB has received the agreement from the French authorities to deliver samples for scientific research (number AC-2008-812). The samples come from care and are requalified for research. The project was approved by the Institut Bergonié ethics committee (scientific advisory board). Every case was histologically reviewed by the pathologist subgroup from the French Sarcoma Group and classified according to the 2013 WHO classification by histology, IHC, and molecular genetics and cytogenetics when needed.

Sample description

The screened series was composed of 112 sarcomas with complex genomics and five cell lines (CL; CL1 derived from an undifferentiated pleomorphic sarcoma T1; CL2 derived from a dedifferentiated liposarcoma; CL3 derived from a myxofibrosarcoma; and CL4 and CL5 derived from two leiomyosarcomas) for the first cohort.

The second and the third cohorts are composed of 27 synovial sarcomas and 74 GIST, respectively. All tumors have been histologically reviewed by a pathologist panel from the French Sarcoma Group.

Cell line establishment and culture

Cell line establishment was performed as described previously (17). Authentication of cell line is analyzed by aCGH by comparing the cell line with the corresponding tumor origin.

The culture medium was composed of RPMI1640 with GlutaMAX (Gibco BRL, Life Technologies) supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco BRL, Life Technologies). All cell lines were tested for mycoplasma by PCR (Sigma; LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit) according to the manufacturer's recommendations.

RNA extraction, sample preparation, and RNA-seq

RNA extraction from frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples, sample preparation, and RNA-seq were performed as described previously (18).

Bioinformatics pipeline for fusion detection and gene expression

Bioinformatics analysis was performed as described previously (18).

Briefly, deFuse (v0.6.1; ref. 19) was used on curated FastQ files with ENSEMBL GRCh37.74 annotations. We kept candidate fusions with the following criteria: probability >50%, non-read-through, non-read-through like (same chromosome, indicated as deletion, coding/coding gene region, and genomic distance <20,000) and breakpoint homology <30.

TopHat-Fusion (v2.1.0; ref. 20) was used on curated FastQ files with the same annotations as described by Lesluyes et al. in 2016 (18). Fusion minimum distance was set to 10,000, and fusion anchor length was set to 13. Other parameters were similar to the expression processing.

ChimeraScan (v0.4.5; ref. 21) algorithm was used on raw FastQ files (equal-length reads restriction) with UCSC (fixed on 2016/02/09) annotations. Multiple hits parameter was set to 50. We kept fusions with the following criteria: non-read-through, score >5, spanning reads >2, and non-HLA/HLA fusions (due to sequence homology).

For the three detection algorithms, duplicated entries (same genes) and non-ORF conservation fusions were discarded.

Unsupervised clustering method was performed with Wald algorithm and Euclidean distance available in the *cluster* R package (v2.0.3). Differential gene expression analysis was performed with *DESeq2* R package (1.8.1; ref. 22). Gene interaction was performed using BioGRID (23). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; v2.2.0; refs. 24, 25) was used with Hallmarks gene sets from MSigDB (v5.0), gene set permutation type, RefSeq chip platform without gene symbol collapse, and a minimum set size of 10. Differentially exonic expression was performed by DEXSeq (6 vs. 40; ref. 26).

RT-PCR and Sanger sequencing

Total RNA was reverse transcribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

For PCR, primers were designed using Primer3 program (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and are presented in Supplementary Table S1. Touchdown 60°C program has been used (TD 60°C; two cycles at 60°C, followed by two cycles at 59°C, two cycles at 58°C, three cycles at 57°C, three cycles at 56°C, four cycles at 55°C, four cycles at 54°C, five cycles at 53°C, and finally 10 cycles at 52°C). PCR was performed on 50 ng of cDNA using AmpliTaqGold DNA

Polymerase (Applied Biosystems). PCR products were then purified using ExoSAP-IT PCR Purification Kit (GE Healthcare), and sequencing reactions were performed with the Big Dye Terminator V1.1 Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. Samples were then purified using the Big Dye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, and sequencing was performed on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis was performed with SeqScape software v2.5 (Applied Biosystems).

Quantitative RT-PCR

Expression of different *TRIO-TERT* and *TRIO* transcripts was studied with probes and primers listed in Supplementary Table S2. Normalization of expression was carried out with two reference genes: *ACTB* and *RPLP0*. Probes and primers (TaqMan Gene Expression Assay, Life Technologies) of these genes are Hs99999903_m1 and Hs99999902_m1, respectively. Reaction was performed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies) using StepOnePlus (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. Expression was calculated with the formula: $\Delta C_t = C_{t_{TRIO-TERT}} - C_{t_{reference\ gene}}$ (27). Subsequently, difference of expression between both transcripts was calculated with the formula $2^{\Delta C_t_{transcript\ 1 - transcript\ 2}}$.

FISH

FISH assay on FFPE cases T1, S867, and S909 was performed using the Histology FISH Accessory Kit (Dako) as described previously (28) on a 4- μ m paraffin-embedded section. Regarding metaphase chromosome spreading on CL1, cells were incubated with colchicine overnight and resuspended in isotonic KCl buffer. Cells were finally fixed in standard 3:1 methanol:acetic acid final fixative. After several washes, cells were spread on a glass slide. Denaturation (5 minutes at 82°C for paraffin-embedded tissues and 1 minute at 73°C for chromosome spreading) and hybridization (overnight at 37°C) were achieved by placing the slides into a hybridizer (Dako). For the identification of the *TRIO* fusion, one BAC clone covering 5' part of *TRIO* (RP11-1134M22; red signal) and two BAC clones covering 3' part of *TRIO* (RP11-81P9, RP11-1079G4; green signals) were used; green and red fluorescent signals were analyzed in tumors using a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope with appropriate filters. Pictures were captured using a Hamamatsu C4742-95 CCD camera and analyzed with the Genikon software. A *TRIO* rearrangement was detected when red and green signals were separated in the nucleus. A *TRIO* rearrangement was considered as present if at least 10% of tumor cells showed a rearrangement pattern. Unbalanced rearrangements (fusion signal associated with at least one supernumerary red signal) are considered as positive case when chimeric transcript has been validated by RT-PCR and Sanger sequencing and with at least 10% rearranged signals.

Affymetrix CytoScan HD Array

Genomic DNA was isolated using a standard phenol-chloroform extraction protocol. Affymetrix CytoScan HD Array (Affymetrix) was used according to the manufacturer's instructions. The test was conducted on DNA samples from *TRIO* translocated cases. CEL files obtained by scanning the CytoScan arrays were analyzed using the Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix) and the annotations of the genome version GRCH37 (hg19).

Immunofluorescence

Tissues were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of ethanol baths. For antigen retrieval, slides were incubated in DAKO Target Retrieval Solution, pH 9 (DAKO), for 20 minutes in a microwave oven. The primary antibodies and dilutions (dilution in DAKO REAL antibody diluent, DAKO) used in this study are as follows: anti-PML (PG-M3, 1:200, sc-966, Santa Cruz Biotechnology) and anti-TERF2 antibody (1:200, HPA001907, Sigma). All primary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Secondary antibodies and dilutions used are as follows: anti-mouse immunoglobulins/FITC (1/400, Dako) and anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594 conjugate (1/500, Invitrogen). Slides were mounted with VECTASHIELD/DAPI medium (Vector Laboratories) and were then analyzed using a Nikon Eclipse 80i fluorescent microscope with appropriate filters. Pictures were captured using a Hamamatsu C4742-95 CCD camera.

Design and infection of *TRIO-TERT* shRNA

Short hairpin RNA (shRNA) sequences targeting *TRIO*_{33'}-*TERT*_{2'} and a nontargeting control sequence (Supplementary Table S3) were cloned into the doxycycline-inducible pLKO.1-neo lentiviral shRNA vector (Addgene). VSV-G-pseudotyped lentiviral particles were produced by cotransfection of 293T cells with pLKO.1 constructs and the compatible packaging plasmids psPAX2 and pSVg. Cell lines were incubated overnight with lentiviral supernatants in the presence of 8 μ g/mL polybrene (Sigma H9268), and stably transduced cells were selected with neomycin (0.1–1 mg/mL, Sigma 4727894001) for 10 days. Downregulation of *TRIO*_{33'}-*TERT*_{2/3} mRNA expression was controlled by qRT-PCR.

Proliferation assay

Proliferation measurement was performed using the InCuCyte Live Cell Imaging System (Essen BioScience). CL1s were seeded at 3,000 cells per well in a 96-well plate with eight replicates for each condition. Cells were pretreated with or without doxycycline (1 μ g/mL, Sigma D3072) for 48 hours before proliferation analysis. Treatment was maintained during 5 days of experiment. Proliferation was monitored according to the manufacturer's recommendations (two pictures every 2 hours for each well).

Data access

RNA-seq raw files (FastQ) are available on Sequence Read Archive under the accession numbers SRP057793 (contains 112 tumors) and SRP059536 (contains the five sarcoma cell lines: CL1 is M965, CL2 is M969, CL3 is M961, CL4 is M963, and CL5 is M964).

Expression data for the 117 samples are available on Gene Expression Omnibus under accession number GSE75885.

Results

RNA-seq analysis and fusion prediction

To identify fusion transcripts, we performed RNA-seq on 112 sarcomas with complex genetics (Table 1) and 5 sarcomas cell lines. Means of 78.34 (\pm 18.71) and 74.97 (\pm 17.83) million reads per sample were obtained after library sequencing following low quality 5' and 3' trims and overlap correction, respectively. DeFuse (19) analysis predicted a total of 10,382 fusion transcripts for all samples with a fusion mean of 88.74 (\pm 52.7) per sample

Table 1. Nontranslocation-related sarcomas cohort description (N = 112)

Characteristics	Cohort (N = 112)
Median follow-up (years)	2.94 (95% CI, 2.11–3.77)
Median age (years)	64.5 (95% CI, 62–67)
Sex	
Female	56 (50%)
Male	56 (50%)
FNCLCC grade (%)	
1	3 (2.68%)
2	29 (25.89%)
3	76 (67.86%)
Unknown	4 (3.57%)
Histologic type (%)	
UPS	36 (32.14%)
LMS	33 (29.46%)
DDLPS	18 (16.07%)
MFS	15 (13.39%)
PLPS	4 (3.57%)
PRMS	4 (3.57%)
Other	2 (1.79%)
Location	
Lower limb	45 (40.18%)
Internal trunk	25 (22.32%)
Trunk wall	18 (16.07%)
Upper limb	16 (14.29%)
GI tract	3 (2.68%)
Gynecologic area	3 (2.68%)
Head and neck	2 (1.79%)
Relapse events (%)	
Metastasis	38 (33.93%)
Local recurrences	34 (30.36%)
Median size of tumor (mm; n = 109)	100 (95% CI, 80–100)

Abbreviations: CI, confidence interval; DDLPS, dedifferentiated liposarcoma; FNCLCC, Fédération Française des Centres de Lutte Contre le Cancer; GI, gastrointestinal; LMS, leiomyosarcoma; MFS, myxofibrosarcoma; PLPS, pleomorphic liposarcoma; PRMS, pleomorphic rhabdomyosarcoma; UPS, undifferentiated pleomorphic sarcoma.

(Fig. 1). Among them, 3,610 detected chimeric transcripts were actually read-throughs (chimeric transcripts between two adjacent genes and induced by transcription; ref. 29) according to deFuse and were consequently discarded from further processing. Following this selection, 6,772 potential fusion transcripts were kept. To identify in-frame fusion transcripts, we filtered this selection and focused on the 420 in-frame predicted fusions with conserved open reading frame (ORF) for each partner. Among these transcripts, eight presented a potential recurrence: *CTSC-RAB38* (13 samples), *GSE1-RP11-680G10.1* (12 samples), *NSUN4-FAAH* (8 samples), *CTBS-GNG5P2* (8 samples), *TRIO-TERT* (4 samples), *FARSA-SYCE2* (2 samples), *RPL11-TCEB3* (2 samples), and *TFG-GPR128* (2 samples). Among these eight transcripts, five are known to be read-throughs but evaded the deFuse filter: *CTSC-RAB38* and *TFG-GPR128* have been reported as read-throughs (30, 31), whereas *CTBS-GNG5P2*, *RPL11-TCEB3*, and *NSUN4-FAAH* are referenced in the ConjoinG database (32), which contains detailed information about identified read-throughs in the human transcriptome. *FARSA-SYCE2* and *GSE1-RP11-680G10.1* fusions have been identified in normal human tissues (RT-PCR and Sanger sequencing; Supplementary Fig. S1) and the two genes implicated in the fusion are on the same chromosome and transcribed on the same genomic strand. As they share similar characteristics as read-throughs, we discarded them from further analysis. The last potential in-frame recurrent chimeric transcript predicted by deFuse, *TRIO_{33/34}-TERT_{2/3}* (fusion between *TRIO* either exon 33 or 34 and either *TERT* exon 2 or 3), occurred in four samples (CL1, S867, S829, and S822) and has not been detected in normal tissues (Fig. 2A and B). In addition, *TRIO-TERT* gene fusion has been validated by RT-PCR and Sanger sequencing in T1, the primary tumor of CL1 (Fig. 2A). No reciprocal transcript has been detected for these fusions (data not shown). Same

Workflow

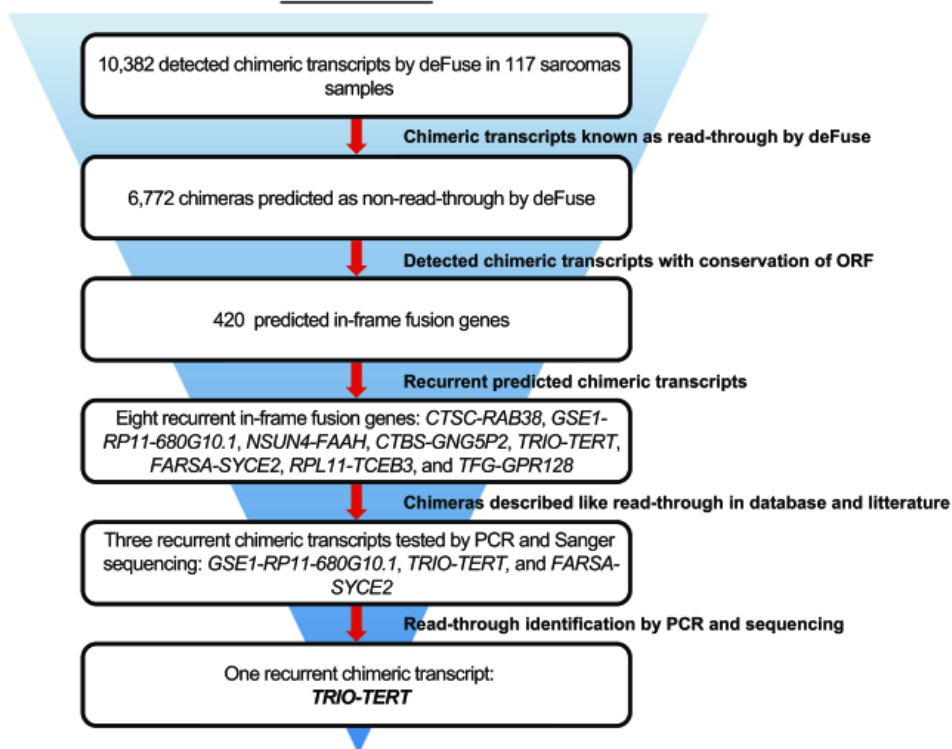


Figure 1. Candidate fusion gene selection.

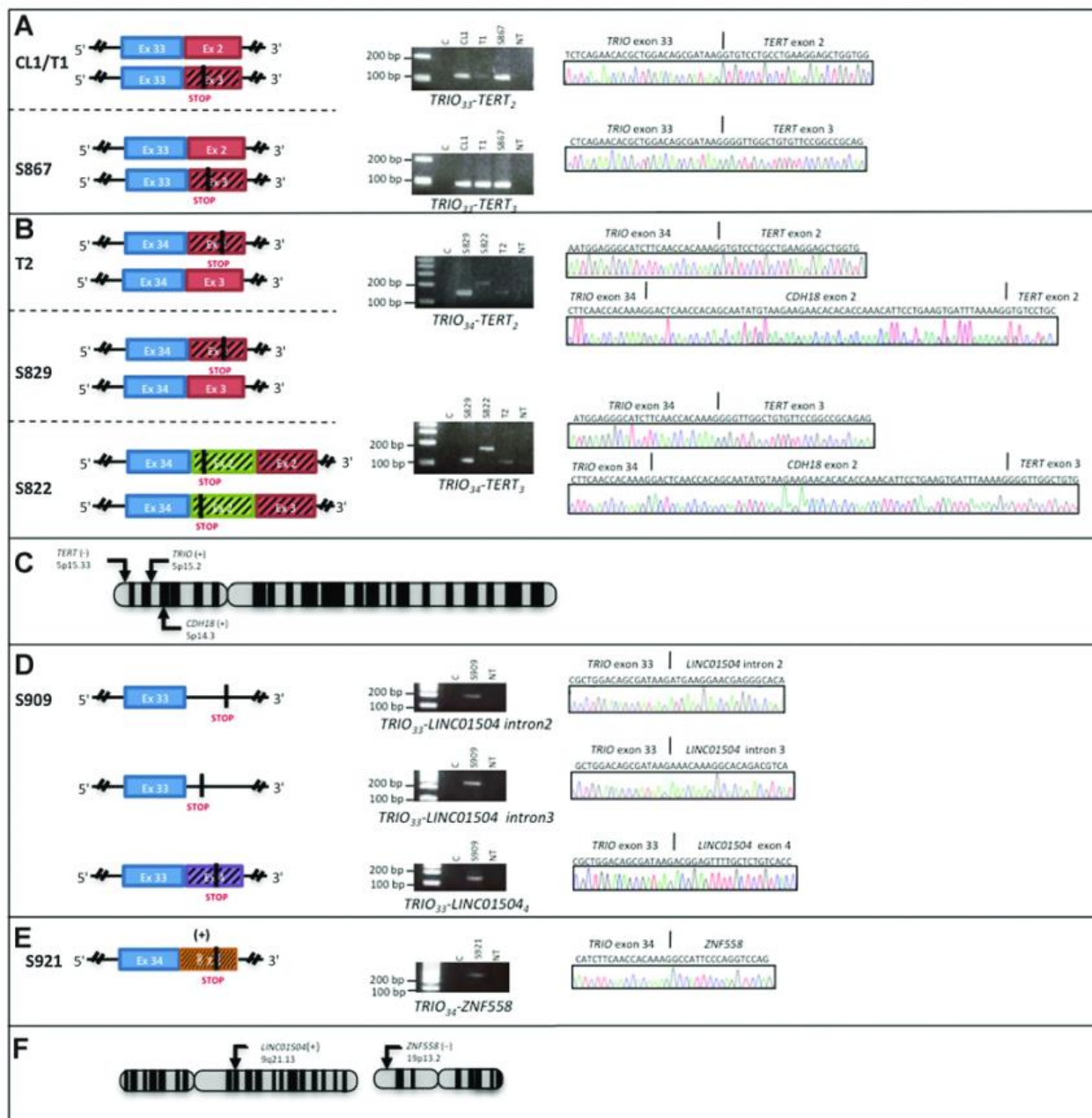


Figure 2. Identification of seven fused *TRIO* cases. RT-PCR and chromatograms obtained with the four exon combinations involving *TRIO*, *TERT*, *LINC01504*, and *ZNF558* genes. **A and B**, Cases with *TRIO*₃₃-*TERT*_{2/3} (**A**), *TRIO*₃₄-*TERT*_{2/3}, *TRIO*₃₄-*CDH18*-*TERT*_{2/3} (**B**) expressions. **C**, Genomic location of *TRIO*, *TERT*, and *CDH18*. **D and E**, *TRIO*₃₃-*LINC01504* (**D**) and *TRIO*₃₄-*ZNF558* (**E**) expressions. **F**, Genomic location of *LINC01504* and *ZNF558*. **C**, PCR control; NT, normal tissue; bp, base pairs. Vertical black lines above chromatograms indicate sequence fusion between the two genes. All chimeric transcripts are represented by scheme for each case. Out-of-frame exons are indicated by black hatches. New STOP codons are indicated by a vertical black line on the scheme. *TRIO*, *TERT*, *CDH18*, *ZNF558*, and *LINC01504* exons are indicated in blue, red, green, orange, and purple respectively. + and – symbols (brackets), genomic strands.

analyses have been performed with two supplementary algorithms, TopHat-Fusion (20) and ChimerScan (21). *TRIO-TERT* is also the only recurrent in-frame chimeric transcript detected with these algorithms.

Consequently, *TRIO-TERT* fusion is the only recurring in-frame fusion identified in this cohort.

What is the genomic alteration that results in the *TRIO-TERT* fusion transcript?

aCGH analysis of three translocated cases (T1, S829, and S822) with high quality DNA available demonstrated that the *TRIO* (5p15.2) and *TERT* (5p15.33) loci (Fig. 2C) were rearranged (gain and/or amplification) in two of three cases (e.g., presented in

Supplementary Fig. S2A and S2B). Interestingly, in the *TRIO* gene, the copy number variation break is located in the region of fusion. We therefore hypothesized that the frequently observed chromosome 5p/*TRIO* amplification in sarcomas (11) could be associated, at least in some cases, to *TRIO* rearrangements. We thus reexamined the genomic profile of the 112 sarcomas tumors of RNA-seq cohort and 24 supplementary cases of nontranslocation-related sarcomas (Supplementary Table S4). Three cases presented a comparable *TRIO* amplification profile (T2, S909, and S921). Specifically, in T2, *TRIO*₃₄-*TERT*₃ fusion was detected by RT-PCR and Sanger sequencing (Fig. 2B). The two new remaining cases with *TRIO* amplification did not express *TRIO-TERT* gene fusion. We performed RNA-seq on these two additional samples, and deFuse analysis indicated that they both expressed a fusion gene involving *TRIO*, but not *TERT*. In sample S909, *TRIO*₃₃ is fused to *LINC01504*, and in sample S921, *TRIO*₃₄ is fused to *ZNF558*; both were subsequently validated by RT-PCR and Sanger sequencing (Fig. 2D–F).

To validate the genomic origin of the fusion, we performed FISH analysis in four cases with available and good enough quality FFPE blocks. A break-apart approach targeting *TRIO* validated rearrangement in the three interpretable cases (CL1/T1, S867, and S909) with 84%, 36%, and 58% of positive cells, respectively (Fig. 3).

Analysis of *TRIO* fusion isoforms

In all cases, regardless of the partner, either *TRIO* exon 33 or exon 34 is fused. In five cases, fusion joined either *TRIO* exon 33 (*TRIO*₃₃-*TERT*: T1 and S867) or exon 34 (*TRIO*₃₄-*TERT*: cases S829, S822, and T2) to *TERT*, an exception being case S822, in which *CDH18* exon 2 is inserted in between *TRIO* exon 34 and *TERT*. Whatever the *TRIO* (or *CDH18* for case S822) exon, fusions occurs either with *TERT* exon 2 or exon 3 (*TRIO-TERT*₂ or *TRIO-TERT*₃).

As it has been reported that *TERT* exon 2 is subjected to alternative splicing (33), the expression of both isoforms should be due to alternative splicing instead of two translocation events (a much rarer genomic event).

Among these six distinct chimeric transcripts of the *TRIO-TERT* fusion, four (*TRIO*₃₃-*TERT*₃, *TRIO*₃₄-*TERT*₂, *TRIO*₃₄-*CDH18*₂-*TERT*₂, and *TRIO*₃₄-*CDH18*₂-*TERT*₃) did not conserve the *TERT* ORF with a stop codon after the last fused *TRIO* exon at 77, 353, 23, and 23 bp, respectively (Fig. 2A and B).

Given that all cases expressed both isoforms (*TRIO*_{33/34}-*TERT*₂ and *TRIO*_{33/34}-*TERT*₃), we sought to determine which isoform is

preferentially expressed. Isoform-specific quantitative RT-PCR analysis showed that chimeric transcripts with *TERT* exon 3 were at least 15 times more expressed regardless the *TERT* ORF conservation (Supplementary Fig. S3).

In case S909, *TRIO* exon 33 is fused to *LINC01504*, leading to the expression of three isoforms: *TRIO*₃₃-*LINC01504*_{intron2}, *TRIO*₃₃-*LINC01504*_{intron3}, or to *TRIO*₃₃-*LINC01504*₄, resulting in the loss of the ORF after the breakpoint with a stop codon after the last *TRIO* exon at 146, 84, and 113 bp, respectively (Fig. 2D). Different transcripts observed in S909 could be explained by alternative splicing mechanisms as sequences near the fusion break-points in *LINC01504* introns 2 and 3 are predicted to be splicing sequences by Human Splicing Finder (34) with 66.9% and 74% of consensus value, respectively (Supplementary Fig. S4).

In case S921, *TRIO* exon 34 is fused to *ZNF558* exon 8 (*TRIO*₃₄-*ZNF558*) but on the *ZNF558* opposite strand resulting in the nonconservation of ORF of *ZNF558* with a stop codon after the breakpoint at 287 bp (Fig. 2E).

Seven cases have been identified: five expressing two isoforms of *TRIO-TERT* and two others cases expressing *TRIO* gene fusion with out-of frame interchromosomal gene partner. For *TRIO-TERT* cases, the preferential expressed isoform is *TRIO*_{33/34}-*TERT*₃ and not the isoform with *TERT* ORF conservation. All these results indicated that *TRIO* gene fusion lead to the formation of truncated *TRIO* protein.

Unfortunately, we could not detect these fusion proteins by Western blot analysis of sarcoma cell line lysates, due to the lack of sensitivity/specificity of the *TRIO* antibody available that recognize these fusion proteins (data not shown).

Are *TRIO* fusions specific to sarcomas with complex genetics?

The seven identified translocated cases belong to different histotypes: three undifferentiated pleomorphic sarcomas, two dedifferentiated liposarcomas, one pleomorphic rhabdomyosarcoma, and one myxofibrosarcoma. According to the *Fédération Française des Centres de Lutte Contre le Cancer* grading system, five of them were classified as grade 3 (T1, S867, S829, S822, and S909) and two as grade 2 tumors (T2 and S921). Three tumors presented a metastatic relapse and two presented a local recurrence (Table 2). These results indicate a trend toward tumor aggressiveness without reaching significance considering the number of cases.

Specificity of all *TRIO* chimeric transcripts has been tested on two independent cohorts of 74 GISTs and 24 synovial sarcomas by RT-PCR. None have been identified in these nonpleomorphic

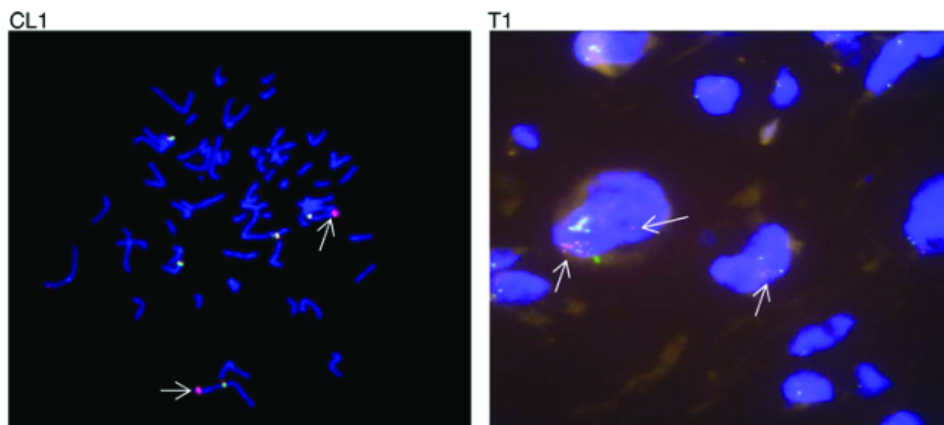


Figure 3. FISH on one *TRIO* fusion gene case. On the representative picture of FISH, we could observe unbalanced rearrangement of *TRIO* highlighted by arrows in metaphase cell of CL1 and interphase cell of T1. BAC clone covering 5' part of *TRIO* (red signal) and two BAC clones covering 3' part of *TRIO* (green signals) were used.

Table 2. Clinical and pathologic data for individuals harboring TRIO gene fusion

Case	Histotype	Grade	Location	Metastasis	Local recurrence	Local	Chimeric transcripts	Chromosome gene 1	Chromosome gene 2	Break position gene 1	Break position gene 2	ORF conservation	New aa before stop codon
T1	UPS	3	Trunk wall	Y	N	F	TRIO(ex33)-TERT(ex2)	5	5	14406781	1294781	Y	1
S867	DD LPS	3	Lower limb	N	N	M	TRIO(ex33)-TERT(ex3)	5	5	14406781	1282739	N	24
T2	DD LPS	2	Extremities	N	N	M	TRIO(ex33)-TERT(ex2)	5	5	14406781	1294781	Y	1
S829	PRMS	3	Lower limb	Y	Y	M	TRIO(ex33)-TERT(ex3)	5	5	14406781	1282739	N	24
S822	UPS	3	Upper limb	N	Y	M	TRIO(ex34)-TERT(ex2)	5	5	14420130	1294781	N	117
							TRIO(ex34)-TERT(ex3)	5	5	14420130	1282739	Y	1
							TRIO(ex34)-CDH18(ex2)-TERT(ex2)	5	5	14420130	1294781	N	7
							TRIO(ex34)-CDH18(ex2)-TERT(ex3)	5	5	14420130	1282739	N	7
S909	UPS	3	Internal trunk	Y	N	F	TRIO(ex33)-LINC01504(intron2)	5	9	14406781	74939905	N	37
							TRIO(ex33)-LINC01504(intron3)	5	9	14406781	74948537	N	28
							TRIO(ex33)-LINC01504(exon4)	5	9	14406781	74950306	N	98
S921	MFS	2	Lower limb	N	N	F	TRIO(ex34)-ZNF558	5	19	14420130	8932224	N	196

Abbreviations: aa: amino acid; DDLPS, dedifferentiated liposarcoma; F, female; M, male; MFS, myxofibrosarcoma; N, no; PRMS, pleomorphic rhabdomyosarcoma; UPS, undifferentiated pleomorphic sarcoma; Y, yes.

sarcoma cohorts associated to a specific oncogenic event (*KIT/PDGFR*A mutations and t(X;18) translocation, respectively; refs. 2–5).

TRIO gene fusion appears, thus, specific so far to nontranslocation-related sarcomas.

Do *TRIO* fusions induce a specific transcriptomic program?

To test whether the presence of chimeric *TRIO* transcripts could be associated with a peculiar transcriptional profile of the fused *TRIO* samples (FTS), we applied unsupervised clustering method on 117 sarcomas with RNA-seq expression, including the six fused *TRIO* cases and the 111 nonfused *TRIO* samples (non-FTS; Supplementary Fig. S5). Our results indicate that FTSs do not have similar transcriptomic profiles as they did not cluster together. FTSs are localized within a subgroup of nonmuscular sarcomas, located in the extremities (adjusted Fisher $P = 0.014$ for both tumor differentiation and location).

We then performed a supervised differential gene expression analysis comparing fused and nonfused cases and identified 423 significant genes (Supplementary Fig. S6), out of which 69 were overexpressed in the FTS (Supplementary Table S5) and 354 overexpressed in non-FTS (Supplementary Table S6). We observed that *TRIO* and *TERT* were significantly more expressed (4.88 and 16.20 times, respectively) in FTS (adjusted Wald's $P = 4 \times 10^{-7}$ and 4.66×10^{-3} , respectively). To establish whether *TRIO* overexpression is due to wild-type or fused *TRIO*, we measured *TRIO* differential exonic expression of FTS versus non-FTS using DEXSeq (Supplementary Fig. S7; ref. 26). As the analysis could not be done on the whole non-FTS cohort ($n = 111$), we selected the 40 (maximum analysis capacity) samples that highly expressed *TRIO*. This analysis did not measure any differentially expressed exon in FTS versus non-FTS. However, we can see a slight exonic usage switch in layer "exon usage" starting at exon 34. Exons before this point are a bit more expressed in FTS, where *TRIO* expression is due to wild-type and fused *TRIO*. The trend is inverted after the breakpoint; exons 34 at 58 are a bit more expressed in non-FTS. In addition, this result shows that as no reciprocal fusions were observed in FTS and exons beyond 34 are expressed, wild-type *TRIO* is expressed in FTS. Genes interacting with *TRIO* and *TERT* were not identified as differentially expressed according to BioGRID (23).

GSEA (24, 25) was then applied on the Hallmarks new collection included in the MSidDB v5.0 database (containing 50 referenced gene sets). In fused *TRIO* samples, 16 significantly enriched gene sets were identified, mainly implicated in immunity/inflammation (6/16 gene sets), regulation of cell cycle (3/16), and cell proliferation and migration (3/16; Supplementary Fig. S8). Immunity gene set enrichment due to immune cell infiltration has been ruled out following a histologic review indicating that there was no significant difference between translocated and nontranslocated cases in terms of immune cell infiltration. In non-FTS, overexpressed gene sets are implicated, notably in myogenesis and adipogenesis (Supplementary Fig. S9).

These data suggest that *TRIO* fusion events are associated with overexpression of genes involved in immunity and inflammation, regulation of cell cycle, cell proliferation, and migration.

Do fusions trigger *TERT* reactivation?

In a tumoral context, telomere length is maintained by two exclusive ways, either by telomerase reactivation or by the alternative lengthening of telomeres mechanism (ALT mechanism),

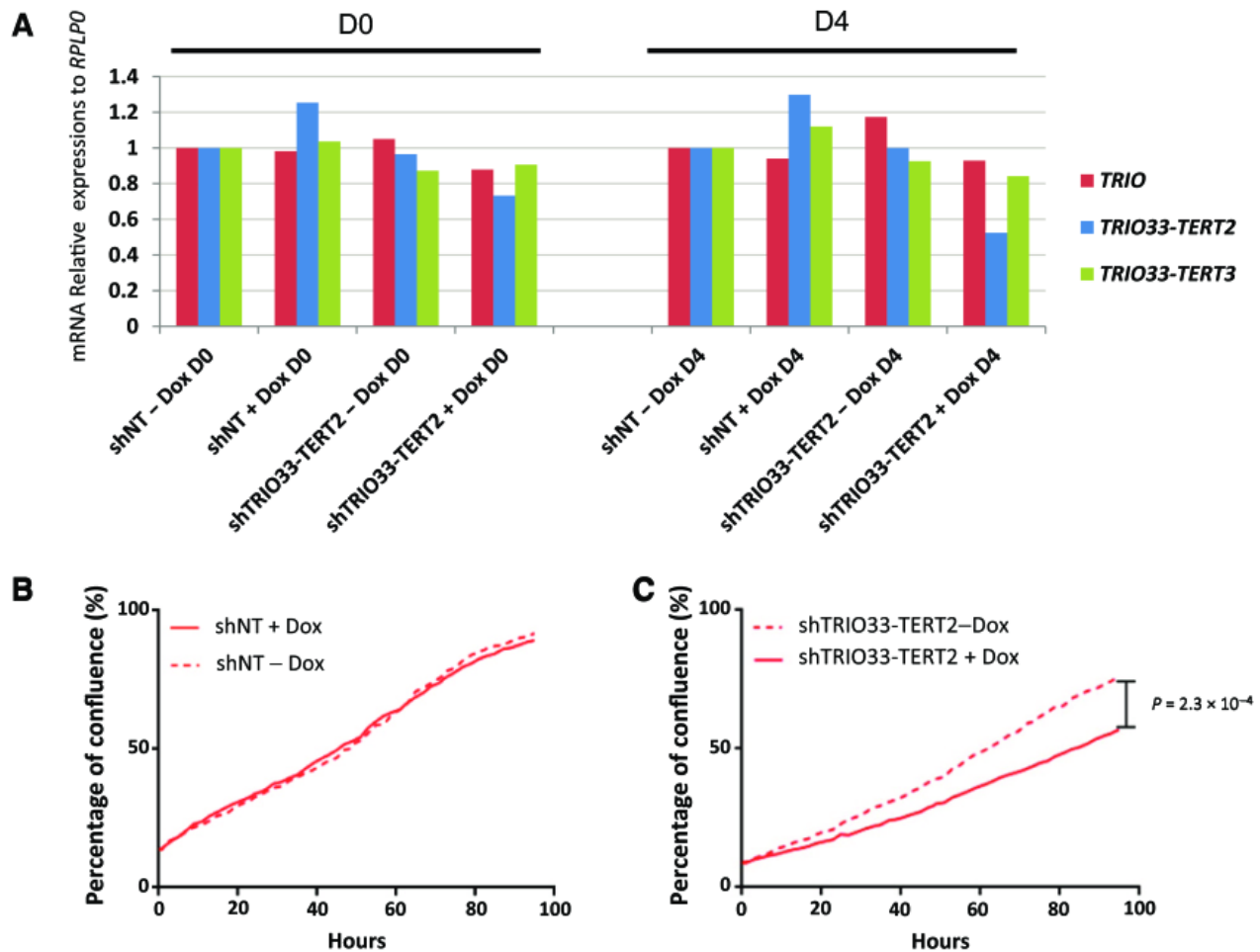


Figure 4. Effect of *TRIO33-TERT2* knockdown on cell proliferation. **A**, *TRIO33-TERT2*, *TRIO33-TERT3*, and *TRIO* mRNAs relative expression levels have been determined by qRT-PCR at day 0 (D0) and day 4 (D4) in the cell line expressing doxycycline-inducible shRNA-targeting *TRIO33-TERT2* isoform (*shTRIO33-TERT2*) and the cell line expressing control shRNA (shNT, nontargeting shRNA). These cell lines have been treated (+) or not (-) with doxycycline (Dox) for 2 days before D0. ShNT-Dox is used as control. **B** and **C**, Proliferation assay has been performed during 4 days on CL1 with shRNA control (**B**) or *shTRIO33-TERT2* (**C**) treated or not with doxycycline (representative of one experiment; $n = 2, 8$ replicates per condition). P values between *shTRIO33-TERT2* - and + doxycycline conditions are significantly different (Wilcoxon's P with Benjamini-Hochberg adjustment < 0.05) from 27 hours of experiment. P value at 96 hours is indicated by the vertical line in graph.

and both mechanisms appear to be mutually exclusive (35, 36). In pleomorphic sarcomas, the ALT mechanism is very frequent (60% of cases; ref. 37). To test whether *TRIO-TERT* fusion could be associated with TERT reactivation, we evaluated the colocalization of PML and TERF2 as a hallmark of the ALT mechanisms, which, if negative, means that it is the telomerase reactivation pathway (38). The four *TRIO-TERT* interpretable cases were negative for PML/TERF2 colocalization and, consequently, negative for ALT mechanism. Moreover, S921 (*TRIO34-ZNF558*) presented the same results and was also declared ALT negative (Supplementary Fig. S10).

Do *TRIO* fusions trigger phenotype modifications?

To uncover the role of *TRIO* fusions, we performed *TRIO33-TERT2/3* knockdowns in CL1 using lentivirally delivered shRNA constructs. Two shRNAs for each isoform were tested at day 0 and day 4 and only one allowed the specific decrease of *TRIO33-TERT2*

(50%) at 4 days without decreasing *TRIO* and *TRIO33-TERT3* expressions (Fig. 4A). With respect to transcriptomic analysis, we thus used it to run proliferation assays in CL1. As shown in Fig. 4B and C, contrary to the nontargeting shRNA, knocking down *TRIO33-TERT2* significantly reduces cell proliferation.

Discussion

Sarcomas with complex genetics are tumors that harbor a high number of chromosomal rearrangements. To better understand the biology of these tumors, we searched for recurrent chimeric transcripts.

Chimeric transcripts in nontranslocation-related sarcomas

In the current study, 10,382 potential chimeric transcripts have been predicted, and 3,604 of them were considered read-throughs by the detection algorithm deFuse. Although read-throughs were

not considered in this study, it has been reported that tumor-specific read-through expression could be involved in oncogenesis (39).

More than 80 filtered fusion transcripts were predicted per case in nontranslocation-related sarcomas, and most of the chimeric transcripts detected arose from intrachromosomal rearrangements and were not in-frame (96%). This is in agreement with data reported by Yoshihara and colleagues, regarding fusion transcript prediction in a large series of 4,366 cancers (various types excluding sarcomas; ref. 40). They showed that the high complexity of tumor genome is associated with a higher number of predicted fusion transcripts. Our results are consistent with the high genomic complexity levels of nontranslocation-related sarcomas. On the contrary, according to the data presented by Yoshihara and colleagues, approximately 36% of detected fusion transcripts were predicted to be in-frame in their cohort compared with 4.13% in our study. This suggests that chimeric transcripts could have other role(s) in nontranslocation-related sarcomas as they would mainly produce a truncated protein or no protein product at all.

TRIO gene fusions lead to truncated TRIO protein expression

Here, we report recurrent *TRIO* fusions identified by RNA-seq and validated in 6 poorly differentiated pleomorphic sarcomas out of 117 (5.1%) and one dedifferentiated liposarcoma (T2) identified in aCGH analysis out of 26 nontranslocation-related sarcomas (3.8%). Three different *TRIO* fusion partners have been identified in this study, *TERT*, *LINC01504*, and *ZNF558*. Whatever the fusion partner, breakpoints in *TRIO* are consistently either after exons 33 or 34. This likely suggests that either these conserved domains, in the fused *TRIO* proteins, are essential or that genomic location of the breakpoint is specifically targeted by an unknown mechanism. Furthermore, two of the partners (*LINC01504* and *ZNF558*) are fused out-of-frame, suggesting that translocation leads to a truncated *TRIO* protein and that this truncated form is of a selective advantage for tumor cell. This hypothesis is strengthened by the isoform-specific quantitative analysis, showing that chimeric transcripts with an out-of-frame *TERT* fusion are the most expressed. It is even more strengthened by the differential expression analysis. For statistical consideration, GSEA (50 cancer Hallmarks) was applied instead of Gene Ontology (41) analysis, and we evidenced that *TRIO*-translocated cases significantly overexpressed genes involved in immunity/inflammation, cell proliferation, and migration.

TRIO protein has two GEF domains (42). While GEF1 mediates GDP to GTP exchange, leading to Rac1 and RhoG activation, GEF2 domain triggers RhoA activation. In addition to these domains, *TRIO* has a SEC14 domain, several spectrin repeats, two SH3 domains, an Ig-like domain, and a serine kinase domain. Unlike the GEF domains, the roles of these latter domains are still unclear. Rac1 and RhoG are members of Rho proteins controlling several pathways leading to cytoskeletal rearrangements, kinase activation, and gene transcription. They are implicated in cell proliferation and motility (43).

All *TRIO* fusions encode for *TRIO* N-terminal domains Sec14, spectrin, and GEF1 domain (Supplementary Fig. S11), which triggers Rac1 activation. Rac1 has been demonstrated to be directly involved in transformation and tumor progression (44). Rac1 acts by promoting anchorage-independent growth (45), proinflammatory pathway (46), proliferation, cell spread-

ing, and migration by regulating lamellipodia formation (47, 48). Interestingly, *TRIO* gene fusions lead to the loss of the C-terminal GEF2, suggesting that the GEF2 domain is not associated to the process of tumor progression in sarcoma. This is consistent with the observation that most processes induced by *TRIO* depend on the activation of Rac1 by GEF1 and not on the activation of RhoA by GEF2 (49). Moreover, the depletion of *TRIO*₃₃-*TERT*₂ isoform demonstrates that *TRIO* fusion has an impact on cell proliferation. As this isoform is the least expressed in all cases, we hypothesize that the effect would be stronger if the *TRIO*₃₃-*TERT*₃ isoform was downregulated concomitantly (no shRNA available).

TRIO encodes at least seven different isoforms (49) and two of them (B and C), containing only the Sec14, spectrin, GEF1, and SH3 domains, are exclusively expressed in nervous system (50). Interestingly, the *TRIO* exons involved in the fusions (exons 1 to 33-34) are exactly the same as the ones observed in the two neuronal isoforms B and C, and as a consequence, they share the same protein domains. The role(s) of these two isoforms is unknown. Salhia and colleagues (51) have demonstrated that the transcriptional activation of the nervous system-specific *TRIO* isoform, through transfer in a different cellular context, could be an efficient way to hijack and remodel existing metabolic pathways for the benefit of tumor cells as demonstrated in glioblastoma (51).

Telomerase reactivation in *TRIO*-fused cases

TRIO gene has been identified in fusion with three partners: *TERT*, *LINC01504*, and *ZNF558*. Although *TERT*'s role on elongation of telomeres is well known, the role of *LINC01504* and *ZNF558* is unknown. Stransky and colleagues (52) identified *TRIO*₃₃-*TERT*₂ fusion in two dedifferentiated liposarcomas. The authors suggest that this gene fusion could permit the expression of *TERT* in these tumors. In our study, the length of telomeres is maintained by telomerase reactivation and not by ALT mechanism in the *TRIO* gene fusions. *TERT* is overexpressed in these samples regardless of the *TRIO* fusion partner (i.e., *TERT*, *LINC01504*, and *ZNF558*), suggesting that, in these cases at least, telomerase activation is not associated with *TRIO* rearrangements. Moreover, in-frame *TERT* chimeric transcript loses the TEN domain of *TERT* permitting the fixation of *TR* RNA, the matrix for telomeres elongation (32). This prompts us to conclude that *TRIO*-*TERT* fusions do not trigger *TERT* reactivation in these tumors.

***TRIO* gene fusion is specific to nontranslocation-related sarcomas**

TRIO fusion transcripts have been detected exclusively in a cohort of sarcomas with complex genetics. We did not detect any *TRIO* chimeric transcript in large cohorts of GISTs and synovial sarcomas, which are both sarcoma subtypes associated with a specific genetic alteration and a very low genomic complexity. Moreover, in Yoshihara and colleagues' study (40), chimeric RNA-seq data of 4,366 tumor samples have been submitted to fusion detection, and *TRIO* fusion transcripts have not been detected in the whole cohort of various tumors (excluding sarcomas). *TRIO* fusions could therefore be quite specific to nontranslocation-related sarcomas, with an incidence of around 5%. It is the unique recurrent gene fusion so far identified in these aggressive nontranslocation-related sarcomas. Within this large sarcoma category, *TRIO* fusions are not limited to a specific histologic

subtype. This suggests that, unlike sarcomas with simple genetics and a recurrent specific translocation (e.g., Ewing sarcoma, synovial sarcoma, and alveolar rhabdomyosarcomas), which are associated to a specific transcriptomic profile (14), this chromosomal event is certainly not an initiating one but a secondary one caused by genetic instability of nontranslocation-related sarcomas and involved in tumor progression via cell proliferation enhancement. However, we did not have sufficient statistical evidence with seven cases to highlight this point, and we cannot exclude the possibility that more cases would permit to refine the biological and/or clinical context associated with these *TRIO* rearrangements.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: L. Lartigue, J.-M. Coindre, F. Chibon

Development of methodology: S. Schmidt, F. Chibon

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): L. Delepaul, T. Lesluyes, G. Pérot, J. Baud, P. Lagarde, S. Le Guellec, A. Neuville, P. Terrier, A. Debant, J.-M. Coindre, F. Chibon, D. Vince-Ranchère

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Delepaul, T. Lesluyes, G. Pérot, C. Brulard, L. Lartigue, J. Baud, J.-M. Coindre, F. Chibon

Writing, review, and/or revision of the manuscript: L. Delepaul, T. Lesluyes, L. Lartigue, S. Le Guellec, S. Schmidt, A. Debant, F. Chibon
Study supervision: F. Chibon

Acknowledgments

Computer time for this study was provided by the computing facilities MCIA (Mésocentre de Calcul Intensif Aquitain) of the Université de Bordeaux and of the Université de Pau et des Pays de l'Adour. The authors thank Andreas Bikfalvi laboratory for granting access to IncuCyte. We are grateful to the people involved in the French Sarcoma Group (GSF) for clinical annotations and access to their samples: L. Guillou, F. Collin, A. Leroux, Y.-M. Robin, M. C. Chateau, I. Peyrottes, and F. Mishellany. The authors would also like to thank Dr. Ravi Nookala of Institut Bergonié for the medical writing services.

Grant Support

This work was supported by euroSARC (FP7-HEALTH-2011), Fondation ARC pour la recherche Contre le Cancer (to A. Debant), Ligue Contre le Cancer (Comité régional Gironde to F. Chibon and Comité régional Languedoc Roussillon to A. Debant) Inserm, and Integrated Cancer Research Site (SIRIC) of Bordeaux (BRIO-Bordeaux Oncology research).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

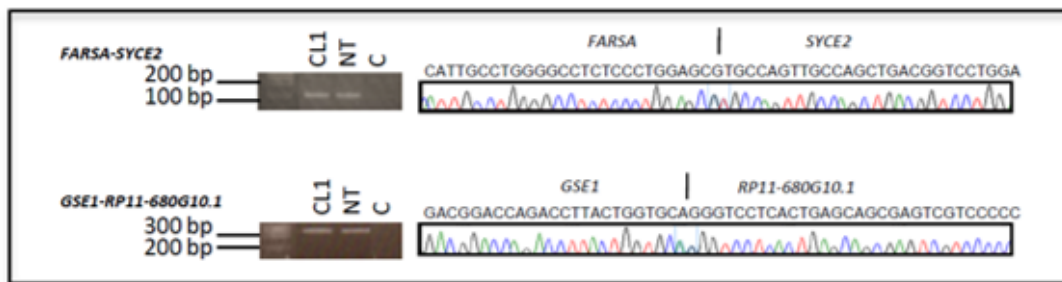
Received February 2, 2016; revised June 27, 2016; accepted July 27, 2016; published OnlineFirst August 15, 2016.

References

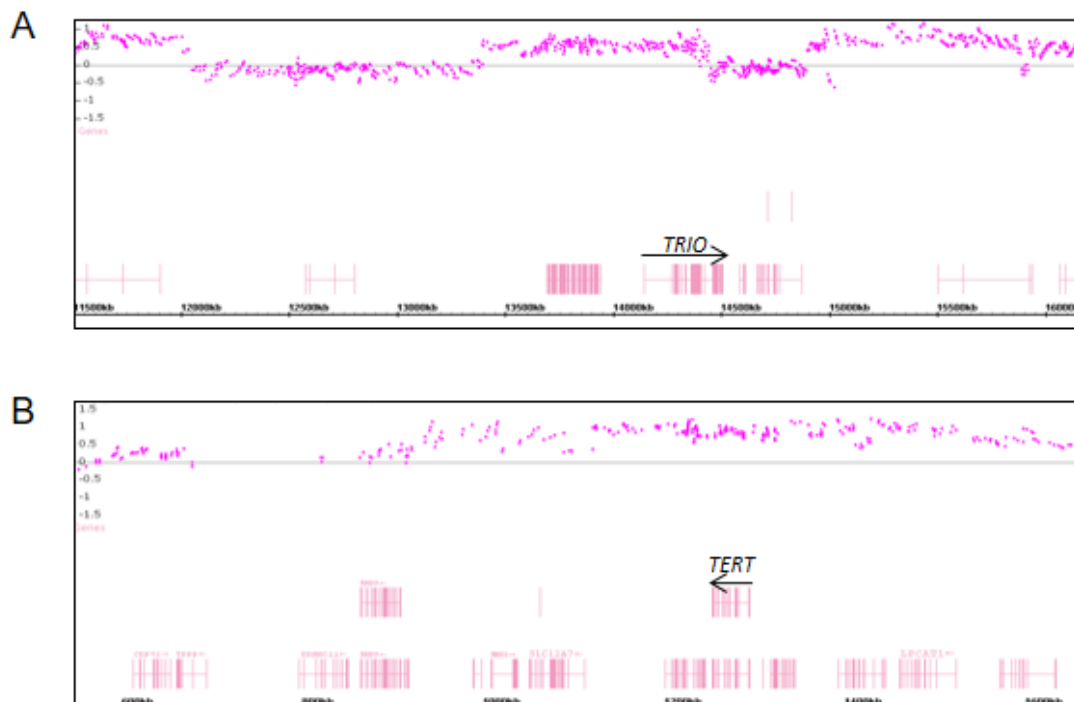
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2013.
- Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, et al. A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 1998;115:1090-5.
- Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, et al. The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331:294-9.
- Guillou L, Coindre J, Gallagher G, Terrier P, Gebhard S, de Saint Aubain Somerhausen N, et al. Detection of the synovial sarcoma translocation t(X;18)(SYT;SSX) in paraffin-embedded tissues using reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a reliable and powerful diagnostic tool for pathologists. A molecular analysis of 221 mesenchymal tumors fixed in different fixatives. *Hum Pathol* 2001;32:105-12.
- Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20:2672-9.
- Chibon F, Mariani O, Derré J, Malinge S, Coindre JM, Guillou L, 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.
- Coindre J-M, Mariani O, Chibon F, Mairal A, De Saint Aubain Somerhausen N, Favre-Guillevin E, et al. Most malignant fibrous histiocytomas developed in the retroperitoneum are dedifferentiated liposarcomas: a review of 25 cases initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol* 2003;16:256-62.
- Chibon F, Mairal A, Fréneaux P, Terrier P, Coindre JM, Sastre X, et al. The RB1 gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Res* 2000;60:6339-45.
- Pérot G, Chibon F, Montero A, Lagarde P, de Thé H, Terrier P, et al. Constant p53 pathway inactivation in a large series of soft tissue sarcomas with complex genetics. *Am J Pathol* 2010;177:2080-90.
- Adamowicz M, Radlwimmer B, Rieker RJ, Mertens D, Schwarzbach M, Schraml P, et al. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:829-38.
- Gibault L, Pérot G, Chibon F, Bonnini S, Lagarde P, Terrier P, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J Pathol* 2011;223:64-71.
- Chibon F, Mariani O, Mairal A, Derré J, Coindre J-M, Terrier P, et al. The use of clustering software for the classification of comparative genomic hybridization data: an analysis of 109 malignant fibrous histiocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;141:75-8.
- Mairal A, Chibon F, Rousselet A, Couturier J, Terrier P, Aurias A. Establishment of a human malignant fibrous histiocytoma cell line, COMA. Characterization by conventional cytogenetics, comparative genomic hybridization, and multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121:117-23.
- Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, Reynaud S, Ballet S, Cohen-Gogo S, et al. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* 2012;44:461-6.
- Chmielecki J, Crago AM, Rosenberg M, O'Connor R, Walker SR, Ambrogio L, et al. Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nat Genet* 2013;45:131-2.
- Robinson DR, Wu Y-M, Kalyana-Sundaram S, Cao X, Lonigro RJ, Sung Y-S, et al. Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nat Genet* 2013;45:180-5.
- Lagarde P, Brulard C, Pérot G, Mauduit O, Delepaul L, Neuville A, et al. Stable instability of sarcoma cell lines genome despite intra-tumoral heterogeneity: a genomic and transcriptomic study of sarcoma cell lines. *Austin J Genet Genomic* 2015;2:1014.
- Lesluyes T, Pérot G, Largeau MR, Brulard C, Lagarde P, Dapremont V, et al. RNA sequencing validation of the Complexity Index in SARCOMas prognostic signature. *Eur J Cancer* 2016; 57:104-11.
- McPherson A, Hormozdiari F, Zayed A, Giuliani R, Ha G, Sun MGF, et al. deFuse: an algorithm for gene fusion discovery in tumor RNA-Seq data. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1001138.
- Kim D, Salzberg SL. TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol* 2011;12:R72.
- Iyer MK, Chinnaiyan AM, Maher CA. ChimeraScan: a tool for identifying chimeric transcription in sequencing data. *Bioinformatics* 2011; 27:2903-4.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15:550.

23. Chatr-Aryamontri A, Breitkreutz B-J, Oughtred R, Boucher L, Heinicke S, Chen D, et al. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D470–8.
24. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34:267–73.
25. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15545–50.
26. Anders S, Reyes A, Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Res* 2012;22:2008–17.
27. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen B, et al. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol* 2002; 15:159–66.
28. Terrier-Lacombe MJ, Guillou L, Chibon F, Gallagher G, Benhattar J, Terrier P, et al. Superficial primitive Ewing's sarcoma: a clinicopathologic and molecular cytogenetic analysis of 14 cases. *Mod Pathol* 2009;22:87–94.
29. Akiva P, Toporik A, Edelheit S, Peretz Y, Diber A, Shemesh R, et al. Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome Res* 2006;16:30–6.
30. Grosso AR, Leite AP, Carvalho S, Matos MR, Martins FB, Vitor AC, et al. Pervasive transcription read-through promotes aberrant expression of oncogenes and RNA chimeras in renal carcinoma. *Elife* 2015;4:pii: e09214.
31. Nacu S, Yuan W, Kan Z, Bhatt D, Rivers CS, Stinson J, et al. Deep RNA sequencing analysis of readthrough gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples. *BMC Med Genomics* 2011;4:11.
32. Prakash T, Sharma VK, Adati N, Ozawa R, Kumar N, Nishida Y, et al. Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes. *PLoS One* 2010;5:e13284.
33. Withers JB, Ashvetiya T, Beemon KL. Exclusion of exon 2 is a common mRNA splice variant of primate telomerase reverse transcriptases. *PLoS One* 2012;7:e48016.
34. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
35. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Ann Rev Biochem* 2006;75:493–517.
36. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010;11:319–30.
37. Marzec P, Armenise C, Pérot G, Roumelioti F-M, Basyuk E, Gagos S, et al. Nuclear-receptor-mediated telomere insertion leads to genome instability in ALT cancers. *Cell* 2015;160:913–27.
38. Hu J, Hwang S-S, Liesa M, Gan B, Sahin E, Jaskelioff M, et al. Anti-telomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell* 2012; 148:651–63.
39. Varley KE, Gertz J, Roberts BS, Davis NS, Bowling KM, Kirby MK, et al. Recurrent read-through fusion transcripts in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014;146:287–97.
40. Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, Zheng S, Vegesna R, Kim H, et al. The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene* 2015;34:4845–54.
41. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 2009;10:48.
42. Debant A, Serra-Pagès C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH, et al. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5466–71.
43. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509–14.
44. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 2002;84:57–80.
45. Seipel K, Medley QG, Kedersha NL, Zhang XA, O'Brien SP, Serra-Pages C, et al. Trio amino-terminal guanine nucleotide exchange factor domain expression promotes actin cytoskeleton reorganization, cell migration and anchorage-independent cell growth. *J Cell Sci* 1999;112:1825–34.
46. Van Rijssel J, Timmerman I, Van Alphen F, Hoogenboezem M, Korchyanskiy O, Geerts D, et al. The Rho-GEF Trio regulates a novel pro-inflammatory pathway through the transcription factor Ets2. *Biol Open* 2013; 2:569–79.
47. Vaqué JP, Dorsam RT, Feng X, Iglesias-Bartolome R, Forsthoefel DJ, Chen Q, et al. A genome-wide RNAi screen reveals a Trio-regulated Rho GTPase circuitry transducing mitogenic signals initiated by G protein-coupled receptors. *Mol Cell* 2013;49:94–108.
48. van Rijssel J, Hoogenboezem M, Wester L, Hordijk PL, Van Buul JD. The N-terminal DH-PH domain of Trio induces cell spreading and migration by regulating lamellipodia dynamics in a Rac1-dependent fashion. *PLoS One* 2012;7:e29912.
49. Schmidt S, Debant A. Function and regulation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio. *Small GTPases* 2014;5:e29769.
50. Portales-Casamar E, Briançon-Marjollet A, Fromont S, Triboulet R, Debant A. Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell* 2006;98:183–93.
51. Salhia B, Tran NL, Chan A, Wolf A, Nakada M, Rutka F, et al. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma. *Am J Pathol* 2008;173:1828–38.
52. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* 2014;5:4846.

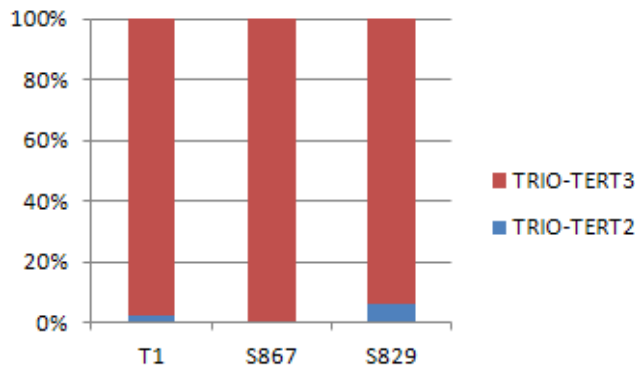
Supplementary Figure 1: Identification of *FARSA-SYCE2* and *GSE1-RP11-680G10.1* read-throughs in sarcoma CL1 and normal tissue. RT-PCR and chromatograms obtained with *FARSA-SYCE2* or *GSE1-RP11-680G10.1* primers. Vertical black lines indicate sequence merge between the two genes. Legend: C refers to PCR control, NT is normal tissue and bp is base pairs.



Supplementary Figure 2: aCGH (SNP-array) profile of CL1 which present a genomic rearrangement of *TRIO* and *TERT* genes. Horizontal black line represent chromosome 5 from 11500 kb to 16000 kb (A) and 600 kb to 1600kb (B). The log ratios of tumor versus reference are indicated on the y axis. Each purple point is a probe representing a short genomic region status. Above the aCGH plot, genomic location of genes are shown in pink, exons are represented in vertical lines and introns in horizontal. *TRIO* (A) and *TERT* (B) genes are indicated by arrows showing the strand orientations. For both *TRIO* and *TERT* genes genomic regions are amplified. Legends: kb is kilo base.



Supplementary Figure 3: Expression percentage of the two *TRIO-TERT* isoforms in three cases. *TRIO-TERT*₂ expression percentage is indicated in red and *TRIO-TERT*₃ expression percentage in blue.



Supplementary Figure 4: Predicted acceptor splicing regions in intron 2 and 3 of *LINC01504*.

LINC01504 intronic sequences (intron 2 and 3, respectively) with validated fusion point represented by the “|” character. Nucleic acids in red are acceptor splicing site predicted by Human Splicing Finder.

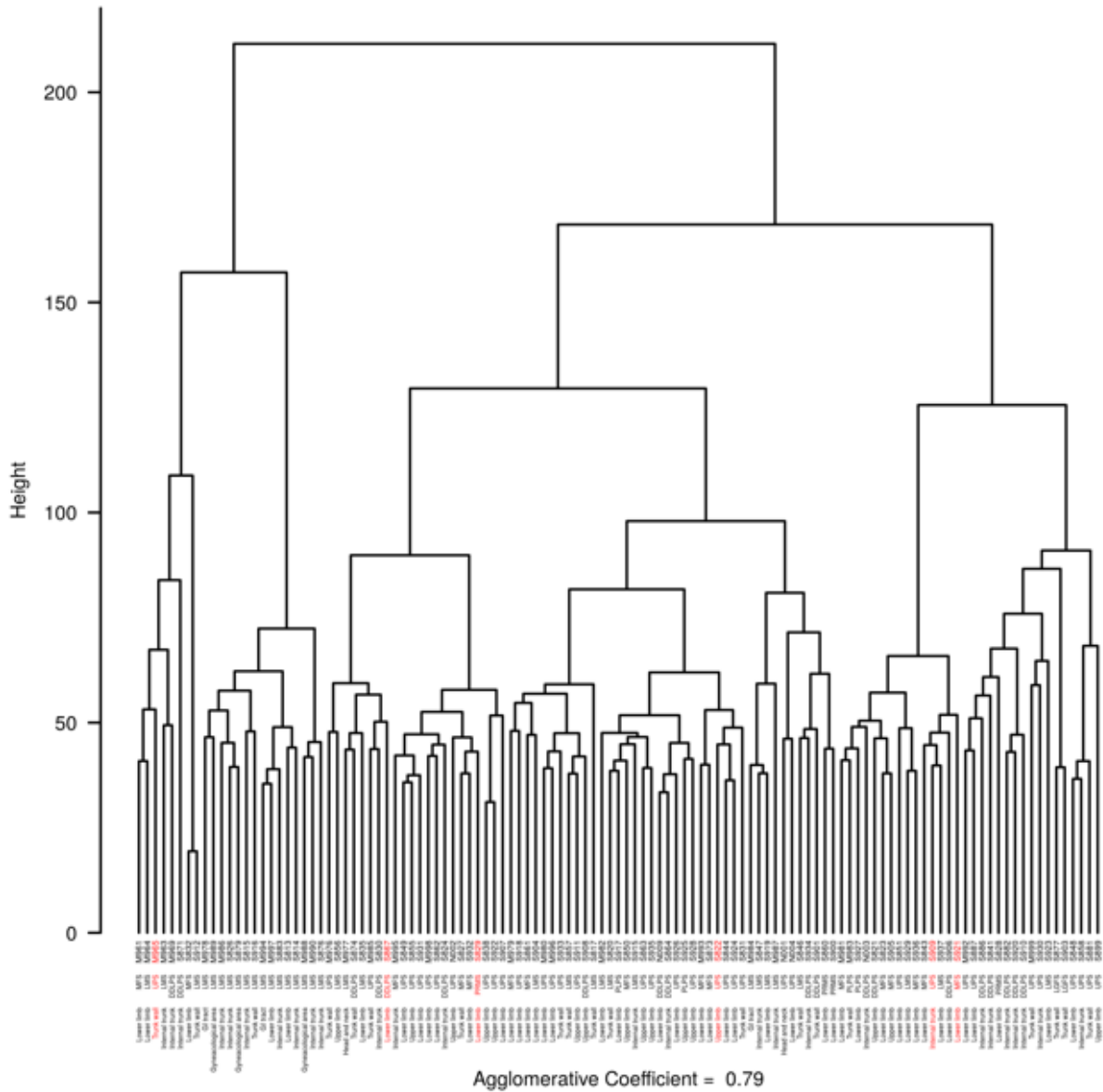
LINC01504 intron 2

ctctgagacatagataatattgttattcccattttacag|atgaaggaacgagggcacagagagattcgagttgtcacccaagctcacatagcacca

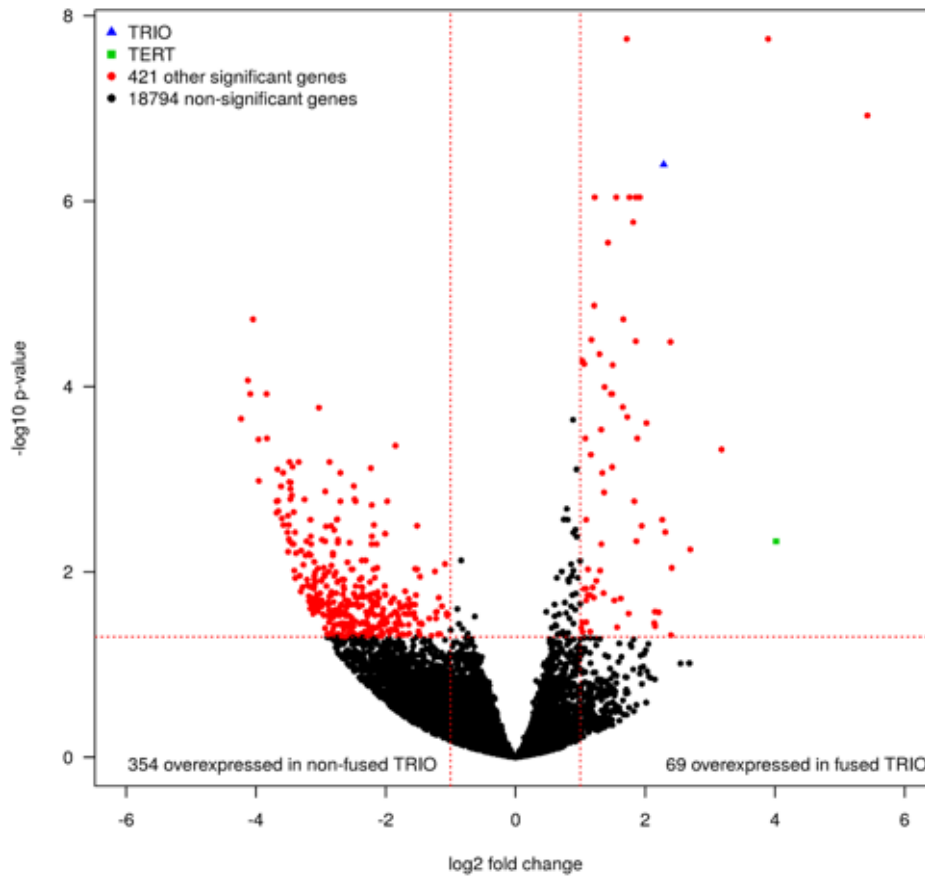
LINC01504 intron 3

ctctttcctctccgcctcagagtttacctatttattccag|aaacaaggcacagacgtcattgtcacgttgtgcacttgaatttcaactccgaactgacc

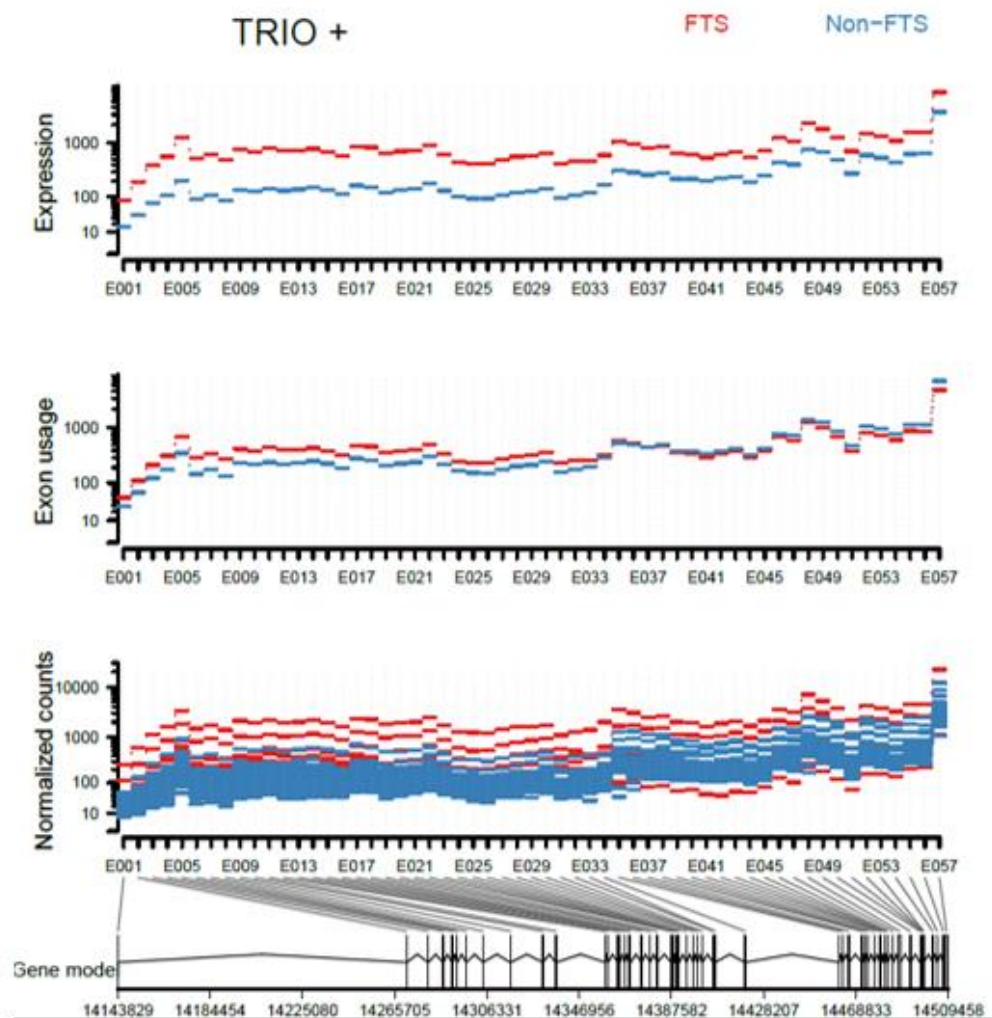
Supplementary Figure 5: Transcriptomic profile clustering of the 117 non-translocation-related sarcomas. Additional information were added above sample names (from top to bottom): red refers to fused TRIO samples, *UPS*, *LMS*, *DDLPS*, *MFS*, *PLPS*, *PRMS* and *Other* refer to sarcoma histotypes. This indicates fused *TRIO* samples do not share a similar transcriptomic profile. Legend: CI : UPS: Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma ; LMS: leiomyosarcoma ; DD LPS : Dedifferentiated Liposarcoma; MFS : Myxofirosarcoma ; PLPS : pleomorphic liposarcoma ; PRMS : pleomorphic Rhabdomyosarcoma.



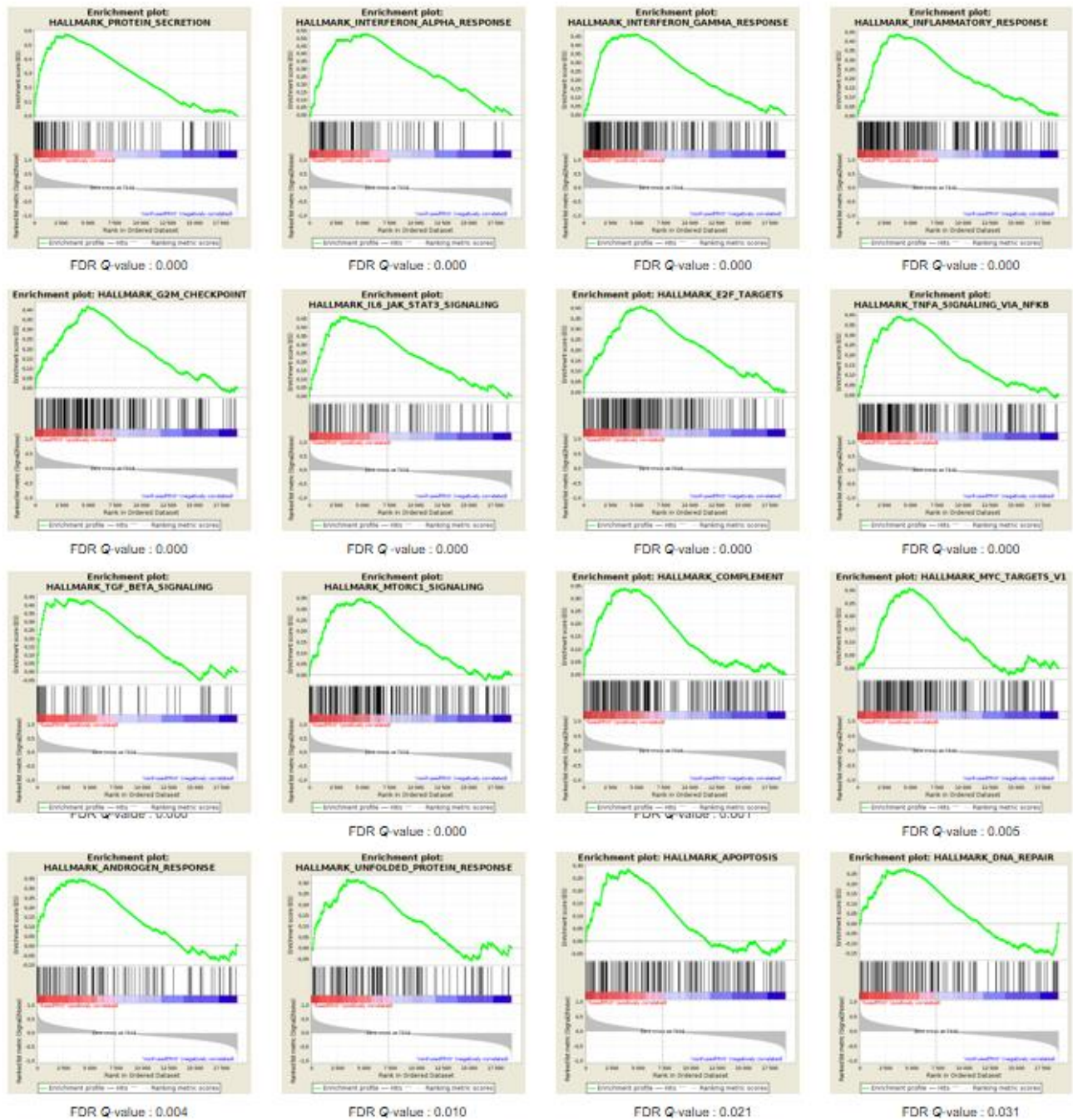
Supplementary Figure 6: Volcano plot of the 117 sarcomas with six fused *TRIO* cases versus 111 non-fused *TRIO* cases. Horizontal and vertical dashed red lines are \log_2 fold change and $-\log_{10}$ adjusted p-value thresholds ($1/-1$ and $\log_2(0.05)$ respectively). Red points are significant differently expressed genes according to the defined thresholds. *TRIO* gene is highlighted in blue triangular point and *TERT* gene in green square. *TRIO* and *TERT* genes are identified among the most differentially expressed genes with the higher expression in fused *TRIO* samples versus non-fused *TRIO* samples.



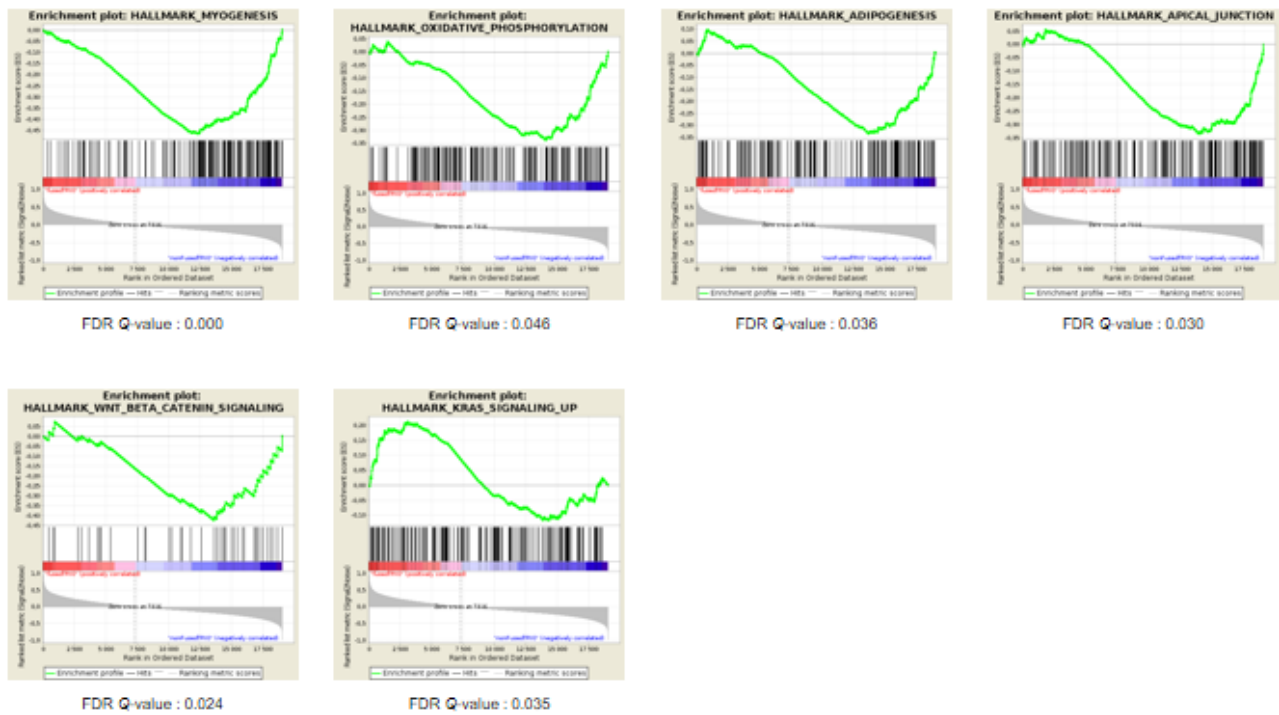
Supplementary Figure 7: Exonic expression of fused *TRIO* fused and non-fused *TRIO* cases. *TRIO* differential exonic expression of fused *TRIO* samples versus non-fused *TRIO* samples using DEXSeq. Since the analysis could not be done on the whole non-fused *TRIO* samples cohort (n=111), we selected the 40 (maximum analysis capacity) samples that highly expressed *TRIO*. Layer “Expression” represents the average exonic expression. Layer “Exon usage” represents the exon usage considering similar expression between fused *TRIO* samples and non-fused *TRIO* samples. Layer “Normalized counts” represents expression values for all tumors. Legends: FTS, fused *TRIO* samples; non-FTS, non-fused *TRIO* samples.



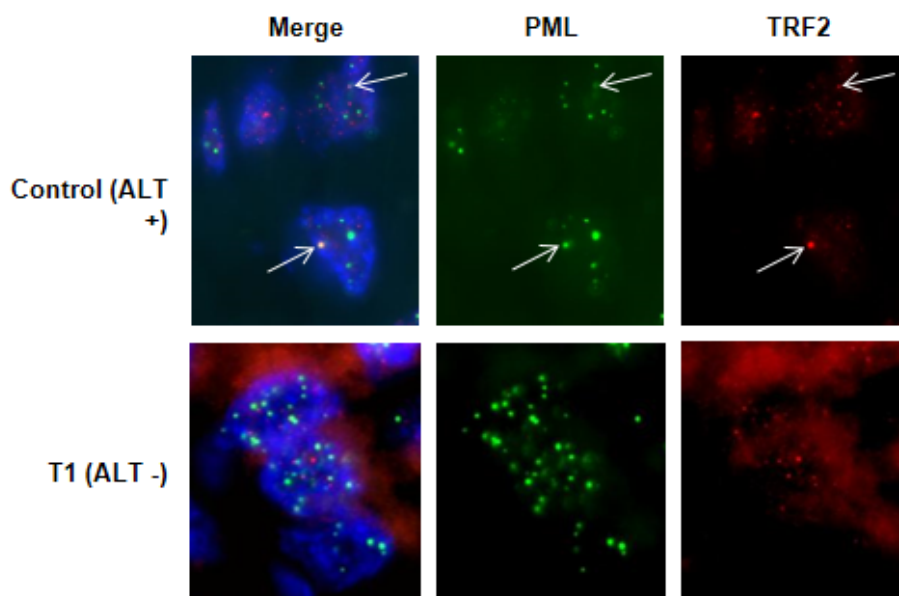
Supplementary Figure 8: Enrichment plot for significant *Hallmarks* in six fused *TRIO* samples included in the MSig5.0 database according to GSEA. Plots represent the distribution of differentially genes between fused *TRIO* versus non-fused *TRIO* samples (from left to right). Genes involved in the gene set are shown with vertical black lines. The green line represents the enrichment profile depending on gene distribution and tested gene set. Adjusted *P*-value for gene sets enrichments are indicated below each plot (FDR *Q*-value).



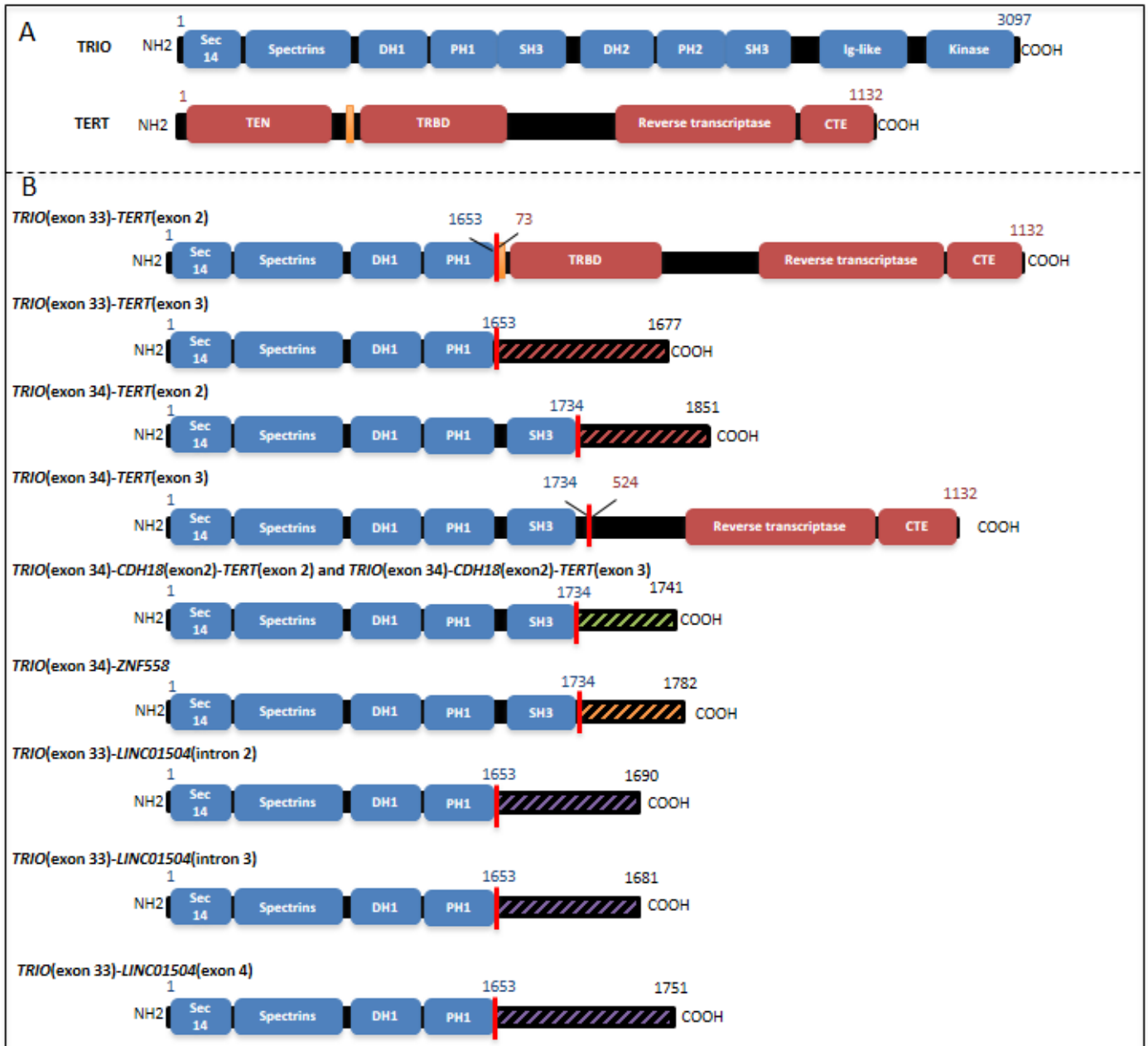
Supplementary Figure 9: Enrichment plot for significant *Hallmarks* in 111 non-fused *TRIO* samples included in the MSig5.0 database according to GSEA. Plots represent the distribution of differentially genes between fused *TRIO* versus non-fused *TRIO* samples (from left to right). Genes involved in the gene set are shown with vertical black lines. The green line represents the enrichment profile depending on gene distribution and tested gene set. Adjusted *P*-value for gene sets enrichments are indicated below each plot (FDR *Q*-value).



Supplementary Figure 10: ALT mechanism status determined by PML/TERF2 immunofluorescence analysis. IF showing an of an example of PML (green) and TERF2 signals (red) colocalization in a tumor sample (Control, ALT+) and an example of absence of PML and TERF2 proteins colocalization (T1, ALT-) indicating that the ALT mechanism should be inactive in this tumor (ALT-). Magnification: X1000.



Supplementary Figure 11: Schematics of predicted TRIO fusions proteins. A) is the representation of wild type TRIO (blue) and TERT (red) respectively. Orange line in wild type TERT indicates the nuclear location signal domain. B) are the fused TRIO combinations. New supplementary C-terminal domains issued of out-of frame chimeric transcripts are indicated in black hatches. Fusion point is represented by vertical red line. Legends: *DH* : Dbl Homology domain; *PH* : Pleckstrin Homology domain ; *SH3* : SRC Homology 3 domain ; *Ig-like* : Immunoglobulin-like domain; *TEN* : TERT N-terminal domain; *TRBD* : Telomerase RNA-binding domain ; *CTE* : C-terminal domain.



2. Conclusion

Cette première étude a permis d'identifier et de caractériser le premier transcrit chimérique spécifique et récurrent des sarcomes à « génétique complexe ». Depuis cette publication, deux autres études ont mis en évidence l'expression de gènes de fusion *TRIO*, détectés dans cinq cas d'une cohorte de 206 sarcomes incluant de 191 sarcomes à « génétique complexe » (trois cas présentant la fusion *TRIO-TERT* et deux cas exprimant la fusion de *TRIO* avec un autre gène ; Cancer Genome Atlas Research Network. 2017) et dans un cas d'une cohorte de 29 MFS (Ogura *et al.* 2018).

Alors que *TRIO* est le plus souvent fusionné avec *TERT*, sa fusion avec d'autres partenaires a été décrite. En revanche, la principale spécificité de ces gènes de fusion est la localisation du point de jonction de *TRIO* avec son partenaire, toujours situé au niveau des exons 33 ou 34. Une étude récente sur les données du TCGA de 33 types tumoraux montre ainsi que des transcrits chimériques impliquant *TRIO* sont identifiés dans d'autres tumeurs, mais, la fusion de ce gène avec *TERT* et le point de fusion de *TRIO* au niveau des exons 33/34 sont spécifiques aux sarcomes à « génétique complexe » (Gao *et al.* 2018).

L'origine de ces points de cassure est inconnue, leur spécificité indique néanmoins que leur formation est favorable ou favorisée dans ces tumeurs. Ces gènes de fusion participent à la prolifération cellulaire, leur formation participerait alors positivement à l'évolution tumorale. L'altération au niveau de ces exons et la conservation de domaines protéiques spécifiques pourrait alors présenter un avantage prolifératif sélectif, la sélection positive de ces réarrangements au cours de l'évolution tumorale expliquerait alors la spécificité locale de ces points de cassure. Les régions génomiques à proximité des exons 33 et 34 peuvent également présenter des caractéristiques prédisposant à la cassure génomique, comme une structure de l'ADN ou de la chromatine inhabituelle, ou encore la liaison de protéines au niveau de cette région génomique (Mehta and Haber 2014).

Les transcrits chimériques *TRIO* sont atypiques : ils ne conservent pas le cadre de lecture du second partenaire, ne sont pas spécifiques d'un type histologique et ne conduisent pas à un profil transcriptomique dirigé, reflétant une oncogenèse commune. Ces gènes de fusion sont alors différents

des gènes de fusion *drivers* et initiateurs du développement des sarcomes à « génétique simple ». Nous faisons alors l'hypothèse qu'ils participeraient à la progression tumorale plutôt qu'ils ne l'initieraient.

Alors que d'autres études ont conclu en une absence d'altérations génétiques spécifiques aux différents types histologiques des sarcomes à « génétique complexe », il apparaît également que ces tumeurs ne sont pas non plus associés à un gène de fusion (Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

En conclusion, les sarcomes à « génétique complexe » regroupent plusieurs types histologiques, ayant des lignes de différenciation différentes, et dont l'analyse moléculaire du génome n'a pas permis d'identifier d'altération génétique *driver* spécifique et récurrente qui leur est associée. Comment expliquer alors le développement de ces tumeurs ?

B. Etude de la relation entre complexité génomique et expression de transcrits chimériques

Nos données, ainsi que celles d'autres publications, ont ainsi conduit au constat suivant : le caractère malin des sarcomes à « génétique complexe » n'est pas la conséquence d'une altération génétique *driver* forte et spécifique. Alors que ces tumeurs ne sont pas associées à une anomalie génétique, elles présentent toutefois une certaine spécificité : le remaniement global de leur génome. Le nombre de réarrangements génomiques de ces sarcomes est par ailleurs largement supérieur à celui des autres types tumoraux (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Nous pourrions alors suggérer que cette complexité serait leur signature chromosomique. Mais, est-ce que celle-ci pourrait participer à l'oncogenèse ?

Lors des travaux sur les gènes de fusion *TRIO*, nous avons pu observer que la formation de cette altération est associée à l'amplification focale de la région chromosomique 5p (Adamowicz *et al.* 2006 ; Gibault *et al.* 2011). L'instabilité chromosomique de cette région serait vraisemblablement à l'origine de ces gènes de fusion, leur récurrence coïnciderait alors avec l'amplification fréquente de cette portion chromosomique dans ces tumeurs. La complexité génomique pourrait ainsi contribuer à la formation d'altérations génétiques, dont certaines seraient favorables au développement.

Alors que le génome est composé de 2% de séquences codantes (Alexander *et al.* 2010), est-ce que l'instabilité chromosomique de ces tumeurs pourrait être associée à la formation de gènes de fusion, et par conséquent l'expression de transcrits chimériques ?

Le sous-type histologique des DDLPS présente un profil génomique particulièrement intéressant pour tester cette hypothèse. Ces tumeurs ont en effet trois caractéristiques d'intérêt. Premièrement, elles possèdent la plus importante proportion d'altérations génomiques, nous permettant alors d'étudier si cette complexité génomique pouvait être associée à une augmentation de la complexité au niveau transcriptomique (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Deuxièmement, les DDLPS sont caractérisés par une amplification récurrente du chromosome 12 associée à une co-amplification du chromosome 1 ou du 6 (Pedeutour *et al.* 1994 ; Pilotti *et al.* 1998 ; Chibon *et al.* 2004 ; Mariani *et al.* 2007). Ces réarrangements sont donc localisés et nous permettrons de définir une association entre complexité génomique et conséquence transcriptomique. Dernièrement, les

amplifications récurrentes de ces tumeurs sont la conséquence d'un mécanisme de *chromothripsis*, générant une restructuration des chromosomes de ces régions (Garsed *et al.* 2014). Les altérations structurales étant à l'origine de gènes de fusion, nous pourrions alors étudier si elles induisent l'expression de transcrits chimériques.

1. Résultats

La validation de plusieurs transcrits chimériques dans la première étude nous a permis définir de nouveaux filtres à appliquer aux données de sortie de deFuse afin d'enrichir la sélection en vrais positifs. Ces nouveaux filtres, appliqués sur la cohorte de 111 sarcomes pléomorphes et détaillés dans la partie 4, conduisent à la détection de 2 890 transcrits chimériques. Un cas de la cohorte a été reclassé suite à l'étude publiée sur les gènes de fusion de *TRIO* en sarcomes à « génétique simple » et a donc été exclu de notre analyse.

Les transcrits chimériques de 18 DDLPS ont été analysés. Parmi les 2 890 transcrits chimériques détectés dans l'ensemble de la cohorte, 1 356 transcrits chimériques (46%) ont été identifiés dans les DDLPS. Ce groupe de tumeurs possède 75 transcrits chimériques en moyenne par échantillon. L'analyse comparative des trois autres types histologiques principaux de cette cohorte, les UPS, les LMS et les MFS, montre que respectivement 19, 13 et 19 transcrits chimériques sont détectés par échantillon (Figure 30, test de Kruskal-Wallis, ajustement corrigé avec test post-hoc de Dunn). Les DDLPS possèderaient alors entre 3,9 et 5,7 fois plus de transcrits chimériques que les autres types histologiques étudiés.

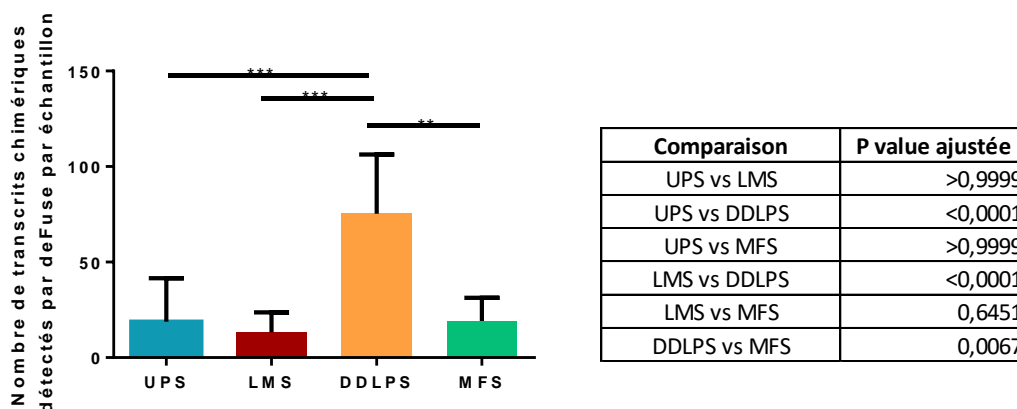


Figure 30 : Nombre de transcrits chimériques détectés par deFuse dans les quatre principaux types histologiques de la cohorte.

*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$. Les *P value* sont indiquées pour chaque combinaison.

Nous avons ensuite recherché si les gènes de fusion à l'origine de ces transcrits chimériques ont une localisation génomique particulière, et notamment s'ils sont associés aux amplifications des DDLPS. Parmi les 1 356 transcrits chimériques détectés dans ces tumeurs, 828 gènes de fusion (61%) ont au moins l'un des deux partenaires situés sur le chromosome 12 (486 gènes de fusion sont issus d'un réarrangement intra-chromosomique et 155 sont des réarrangements inter-chromosomiques impliquant le chromosome 12 et les chromosomes 1 ou 6 ; **Figure 31**).

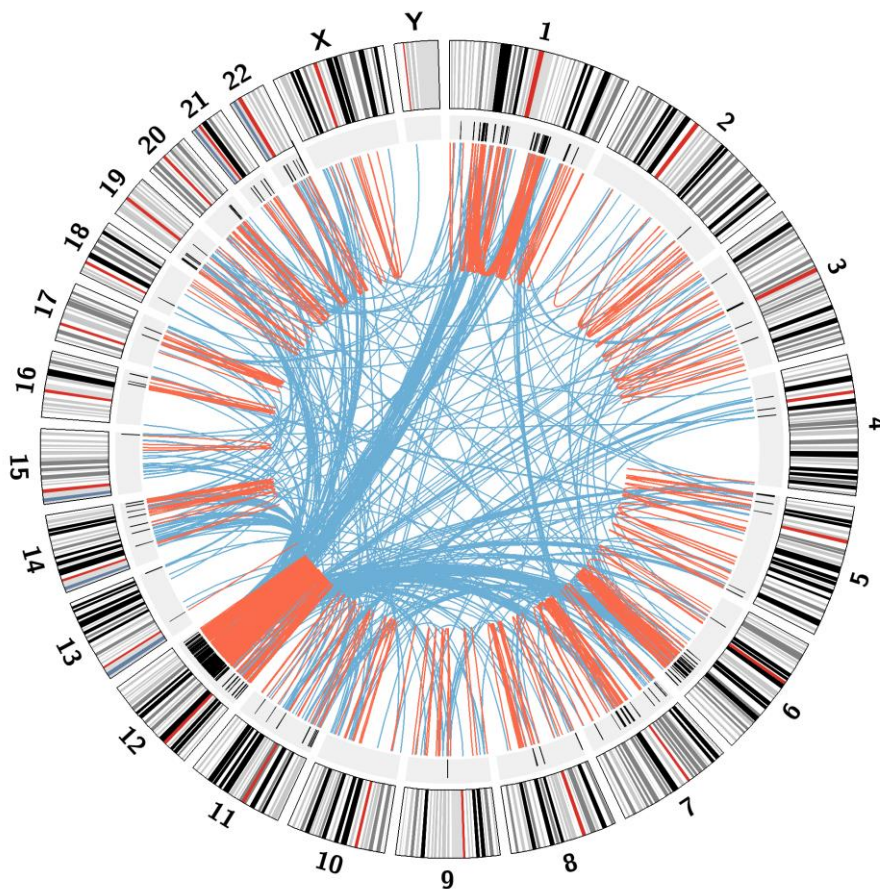


Figure 31 : Plot circulaire représentant les transcrits chimériques détectés dans les DDLPS.
Le cercle externe représente les chromosomes ; celui interne indique les régions chromosomiques enrichies en transcrits chimériques présentés en noir. Les lignes internes relient les gènes détectés comme fusionnés par l'algorithme, en rouge sont représentés les gènes de fusions issus d'un réarrangement intra-chromosomique et les bleues représentent ceux issus d'un réarrangement inter-chromosomique.

Quatre régions chromosomiques sont particulièrement enrichies en gènes de fusion : 12q, 1p32-21, 1q21-24 et 6q22-25. Les régions 12q, 1p32-21 et 6q22-25 sont les régions amplifiées de façon récurrente dans les DDLPS, avec pour cible respective les gènes *MDM2*, *JUN* et *ASK1* (Pedeutour *et al.* 1994 ; Pilotti *et al.* 1998 ; Chibon *et al.* 2004 ; Mariani *et al.* 2007). Ces trois gènes sont d'ailleurs impliqués dans des transcrits chimériques : dix cas expriment des transcrits chimériques impliquant *MDM2*, deux tumeurs des transcrits chimériques de *JUN* et trois tumeurs de *ASK1*. Le gène *FRS2* est également identifié dans des transcrits chimériques détectés dans 11 tumeurs et est fréquemment amplifié dans les DDLPS (Jing *et al.* 2018).

La complexité génétique observée dans les régions amplifiées des DDLPS est alors associée à la formation de gènes de fusion, et donc à l'expression de transcrits chimériques.

Nous avons ensuite voulu déterminer si un enrichissement en gènes de fusion dans des régions spécifiques était également observable dans d'autres types histologiques de sarcomes à « génétique complexe » (**Figure 32**).

Dans les UPS, nous observons un enrichissement au niveau des régions 12q14-21, 1q21-23, 5p13-ter, 7q31 et au niveau du chromosome 17. Ces régions sont décrites comme étant perdues dans ces tumeurs à l'exception de la région 5p13-ter qui est amplifiée (Adamowicz *et al.* 2006 ; Guillou and Aurias 2010 ; Gibault *et al.* 2011). De manière intéressante, la région 5p13-ter favorise la formation de gènes de fusion, dont ceux impliquant *TRIO*.

Dans les MFS, les régions 17p et 13q présentent significativement plus de gènes de fusion que les autres régions chromosomiques. Cette répartition n'est pas aléatoire et ces deux régions sont parmi les plus fréquemment altérées dans ce type de tumeurs.

Les régions 17p et 19p sont enrichies en gène de fusion dans les LMS. Ces deux régions sont également fréquemment altérées (Guillou and Aurias 2010).

Un enrichissement en gènes de fusion sur le chromosome 17 est observé dans ces trois types histologiques. Une perte de ce chromosome est fréquente dans ces tumeurs, altération dont la cible connue est le gène *TP53*, lui-même altéré dans neuf cas de la cohorte (Pérot *et al.* 2010).

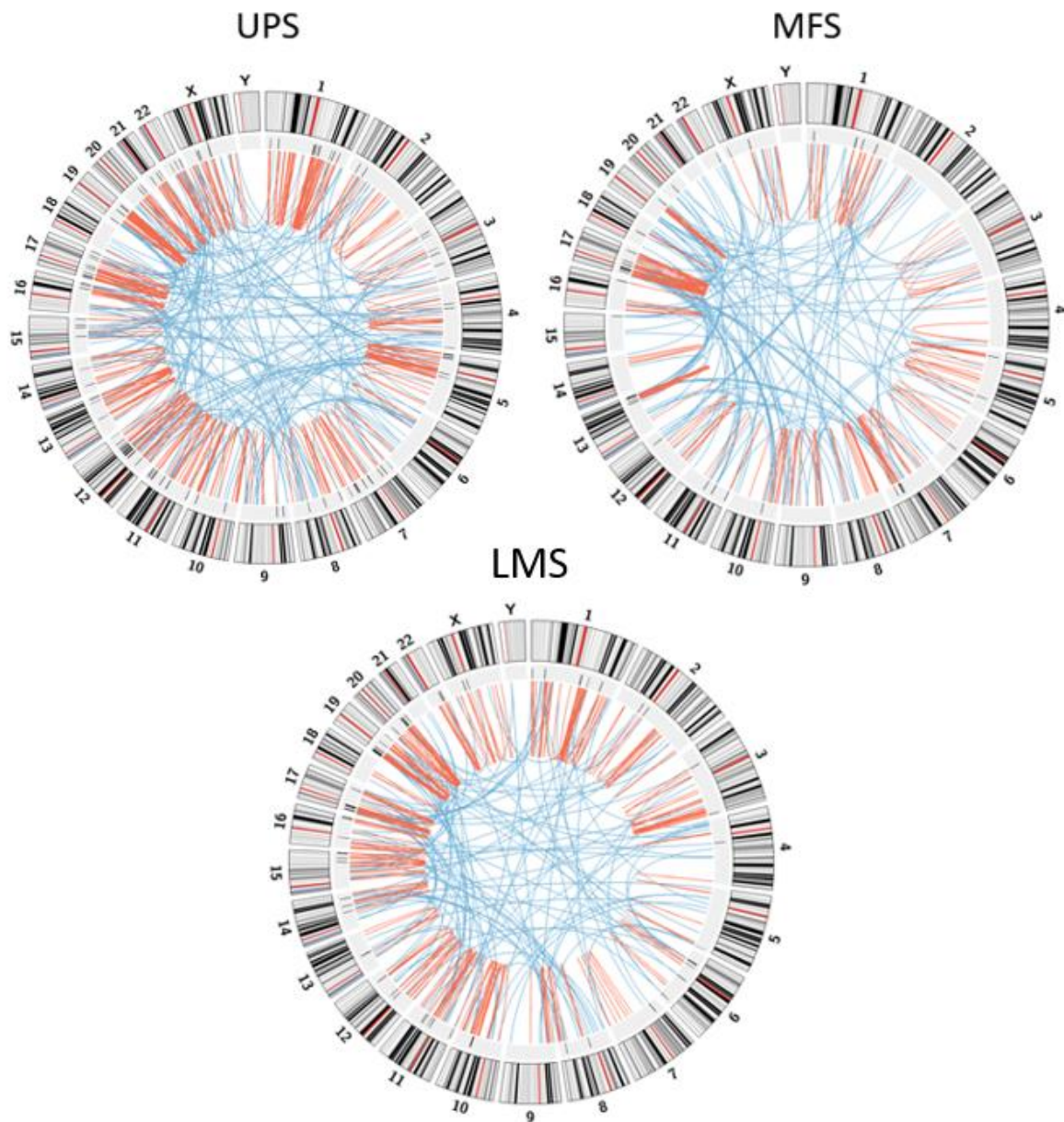


Figure 32 : Plots circulaires représentant le nombre de transcrits chimériques détectés dans les UPS, les MFS et les LMS.

Le cercle externe représente les chromosomes ; celui interne indique les régions chromosomiques enrichies en transcrits chimériques présentés en noir. Les lignes internes relient les gènes détectés comme fusionnés par l'algorithme, en rouge sont représentés les gènes de fusion issus d'un réarrangement intra-chromosomique et les bleues représentent ceux issus d'un réarrangement inter-chromosomique.

2. Conclusion

Dans les sarcomes à « génétique complexe », le réarrangement du génome est à l'origine d'altérations transcriptomiques. Les régions les plus fréquemment altérées définissent des « *hot-spots* » de gènes de fusion et ceux-ci sont le plus souvent privés, identifiés dans une seule de tumeur puisque la recherche de récurrence de gènes de fusion a conduit à la seule récurrence des gènes de fusion *TRIO*.

La présence importante de transcrits chimériques dans les DDLPS est la conséquence transcriptomique d'un évènement de *chromothripsis*. Lors de notre analyse, nous avons identifié des gènes de fusion issus de réarrangements inter-chromosomiques entre les chromosomes 1/6 et 12, indiquant que cet évènement structural induit des échanges de matériel génomique entre ces chromosomes. Le *chromothripsis* est un évènement « catastrophique », ne concernant que quelques régions génomiques et entraînant le réassemblage aléatoire des fragments génomiques générés (Stephens *et al.* 2011). Les gènes de fusion inter-chromosomiques indiquent alors que ces chromosomes sont réarrangés ensemble. Ils seraient issus d'un évènement chromothriptique impliquant ces locus génomiques, induisant alors la formation d'une nouvelle séquence génomique contenant des fragments chromosomiques du 1/6 et du 12. En plus d'être réarrangées ensemble, ces régions sont également co-amplifiées. Un évènement d'amplification suite à celui de *chromothripsis* pourrait expliquer ces amplifications communes. En effet, il est plus probable qu'un évènement d'amplification unique de régions chromosomiques contenant ces locus soit observé, plutôt que plusieurs amplifications des chromosomes 1, 6 et 12, suivi par un évènement de *chromothripsis*. Ce modèle est d'ailleurs similaire à celui décrit par Garsed *et al.*, en 2014.

Alors que les DDLPS sont caractérisés par des réarrangements structuraux spécifiques, la principale caractéristique génomique des autres types histologiques de sarcomes à « génétique complexe » est l'aneuploïdie (Taylor *et al.* 2011). Cette différence de type d'altération chromosomique pourrait alors expliquer les variations observées du nombre de transcrits chimériques entre les DDLPS et les LMS, les UPS et les MFS.

A l'inverse des sarcomes à « génétique simple » dont le génome peu remanié est associé à une altération spécifique, et donc à un réarrangement génomique ciblé, les altérations des sarcomes à « génétique complexe » sont associées au réarrangement global du génome. Ce résultat, bien qu'assez intuitif, indiquerait alors que l'acquisition de caractères favorables à leur oncogenèse pourrait être obtenue suite à une restructuration du génome. Nos données, décrites dans ces deux premières sous-parties, indiquent également que, hormis pour les gènes de fusion *TRIO*, toutes ces altérations sont privées. Dans un génome tumoral sans altération génomique *driver* forte, dont le message oncogénique n'est pas défini, l'acquisition d'altérations oncogénique consécutivement au remaniement du génome pourrait expliquer l'absence d'un profil transcriptomique spécifique (Gibault *et al.* 2011).

Ainsi, nous pourrions alors émettre l'hypothèse que l'absence d'altérations génétiques spécifiques serait compensée par la complexité génomique elle-même, qui permettrait d'acquérir les altérations favorables à l'oncogenèse. Dans ce modèle, le remaniement du génome serait alors un acteur majeur de leur développement. Il nous paraissait ainsi plus pertinent d'identifier le mécanisme permettant la formation de ces réarrangements génomiques plutôt que de continuer dans l'identification d'altérations génétiques spécifiques. C'est la recherche des mécanismes inducteurs de cette complexité génomique qui a guidé les travaux de la deuxième partie de ma thèse.

II. RESTRUCTURATION DU GENOME : ETUDE DE LA FUSION CELLULAIRE COMME MECANISME INITIATEUR

A. Implication de la fusion cellulaire dans l'initiation tumorale

Sans altération génétique associée à leur développement, la complexité du génome des sarcomes à « génétique complexe » est alors la principale caractéristique génomique de ces tumeurs. Cette complexité pourrait permettre aux cellules tumorales d'acquérir des altérations favorables à leur oncogénèse. Ce postulat nous a alors conduits à poser les questions suivantes : comment la complexité de leur génome pourrait être générée ? Est-ce que cette complexité est un évènement initiateur de leur oncogénèse ?

La première hypothèse serait que le remaniement du génome soit la conséquence d'une anomalie génétique. Dans les sarcomes à « génétique complexe », les deux altérations récurrentes sont l'inactivation de p53 et pRb. L'induction de ces altérations dans des modèles murins permet le développement de tumeurs aux caractéristiques cliniques et histologiques similaires aux tumeurs humaines (Tsumura *et al.* 2006 ; Hernando *et al.* 2007 ; Kirsch *et al.* 2007 ; Lin *et al.* 2009 ; Dodd *et al.* 2015). Cependant ces modèles ne reproduisent pas leur complexité génomique. Des données similaires ont également été obtenues dans le modèle de transformation cellulaire de Weinberg, avec l'expression de trois oncogènes (hTERT, SV40-LargeT et HRAS muté) dans des lignées de fibroblastes humains (Hahn *et al.* 1999). Ceci indique alors que ces altérations ne peuvent pas être à l'origine de la complexité génomique de ces tumeurs. La déstabilisation du génome serait alors la conséquence d'une origine non-génétique. Nous avons donc recherché un mécanisme cellulaire inducteur de cette instabilité.

Des travaux de mon équipe d'accueil, obtenus avant mon arrivée, avaient démontré que les lignées de sarcomes avaient la capacité de fusionner spontanément. Les résultats, présentés dans la partie **2.II.1** démontraient que les cellules hybrides possédaient de nouvelles capacités agressives. La

fusion cellulaire est un mécanisme physiologique, dont la contribution lors de l'oncogenèse a été proposée pour la première fois par Otto Aichel puis confirmée dans de nombreuses études, démontrant principalement l'acquisition de capacités métastatiques par les cellules hybrides (Aichel 1911 ; Götz and Goldenberg 1968 ; Rachkovsky *et al.* 1998 ; Sodi *et al.* 1998 ; Pawelek *et al.* 1999 ; Chakraborty *et al.* 2001 ; Goldenberg *et al.* 2012). La conséquence directe de la fusion cellulaire est de générer des cellules tétraploïdes, cet état génomique est observé à des phases précoces du développement de certaines tumeurs, induisant notamment l'aneuploïdie des cellules tumorales selon le modèle d'instabilité génétique « diploïde-tétraploïde-aneuploïde » (Gerlinger *et al.* 2014 ; Bastida-Ruiz *et al.* 2016). Dans ce modèle, la tétraploïdie participe à l'initiation tumorale. Bien que la fusion cellulaire soit décrite comme un évènement évolutif de l'oncogenèse, sa contribution à des étapes précoces de l'oncogenèse n'a été démontrée que dans deux études (Duelli *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2015).

En plus des données obtenues dans les lignées de sarcomes, la fusion cellulaire apparaissait comme un mécanisme cellulaire inducteur d'instabilité génétique particulièrement intéressant dans un contexte mésenchymateux. En effet, ce mécanisme a un rôle fondamental dans la différenciation d'un type de cellules mésenchymateuses, les myoblastes et, par ailleurs, d'autres cellules mésenchymateuses tels que les fibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses ou les cardiomyocytes possèdent des capacités fusogéniques (Relvas *et al.* 1997 ; Ferrari *et al.* 1998 ; Alvarez-Dolado *et al.* 2003 ; Camargo *et al.* 2003).

L'objectif de cette partie était donc d'établir si la fusion cellulaire pouvait être un mécanisme initiateur du développement tumoral des sarcomes à « génétique complexe » et de la complexité génomique de ces tumeurs.

1. Travaux antérieurs de l'équipe

Ces premiers travaux, réalisés en 2012, avaient pour but initial d'étudier l'impact de l'hétérogénéité tumorale et le comportement de différentes sous-populations l'une sur l'autre. Pour cela, deux lignées primaires d'un UPS humain, IB105 et IB106 ont été mélangées dans des proportions équivalentes et cultivées ensemble. Ces deux lignées cellulaires ont été établies dans l'équipe. Elles proviennent de la même tumeur, issues de régions tumorales distinctes (Lagarde *et al.* 2015).

Chaque lignée a été préalablement marquée à l'aide d'un fluochrome afin de les distinguer (IB105 marqué avec de la DsRed et IB106 avec de la GFP). Au bout de 72h de co-culture, l'analyse du comportement de ces deux populations l'une sur l'autre a mis en évidence des cellules doublement marquées (**Figure 33 A**). Ces cellules DsRed+/GFP+ ont ensuite été isolées par cytométrie en flux. L'analyse génétique, réalisée par étalements chromosomiques, a montré qu'elles possèdent un seul noyau avec en moyenne 123 chromosomes, les parentales ayant 68 et 58 chromosomes pour les IB105 et IB106 respectivement.

La caractérisation génomique a été poursuivie par l'analyse du profil génomique des cellules parentales et des cellules DsRed+/GFP+ à l'aide de puces à ADN, afin de déterminer, pour chaque région génomique, le contenu en ADN de la lignée d'intérêt. Les profils des cellules parentales et des cellules DsRed+/GFP+ (indiqué IB105/IB106) montrent que les cellules doublement positives présentent, en plus d'un doublement génomique, l'ensemble des altérations génomiques des deux lignées parentales (**Figure 33 B**). De nouvelles altérations sont également identifiables dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats indiquent alors que ces cellules possèdent les caractéristiques génomiques combinées des deux cellules parentales et sont donc issues d'un événement de fusion cellulaire, obtenue de manière spontanée.

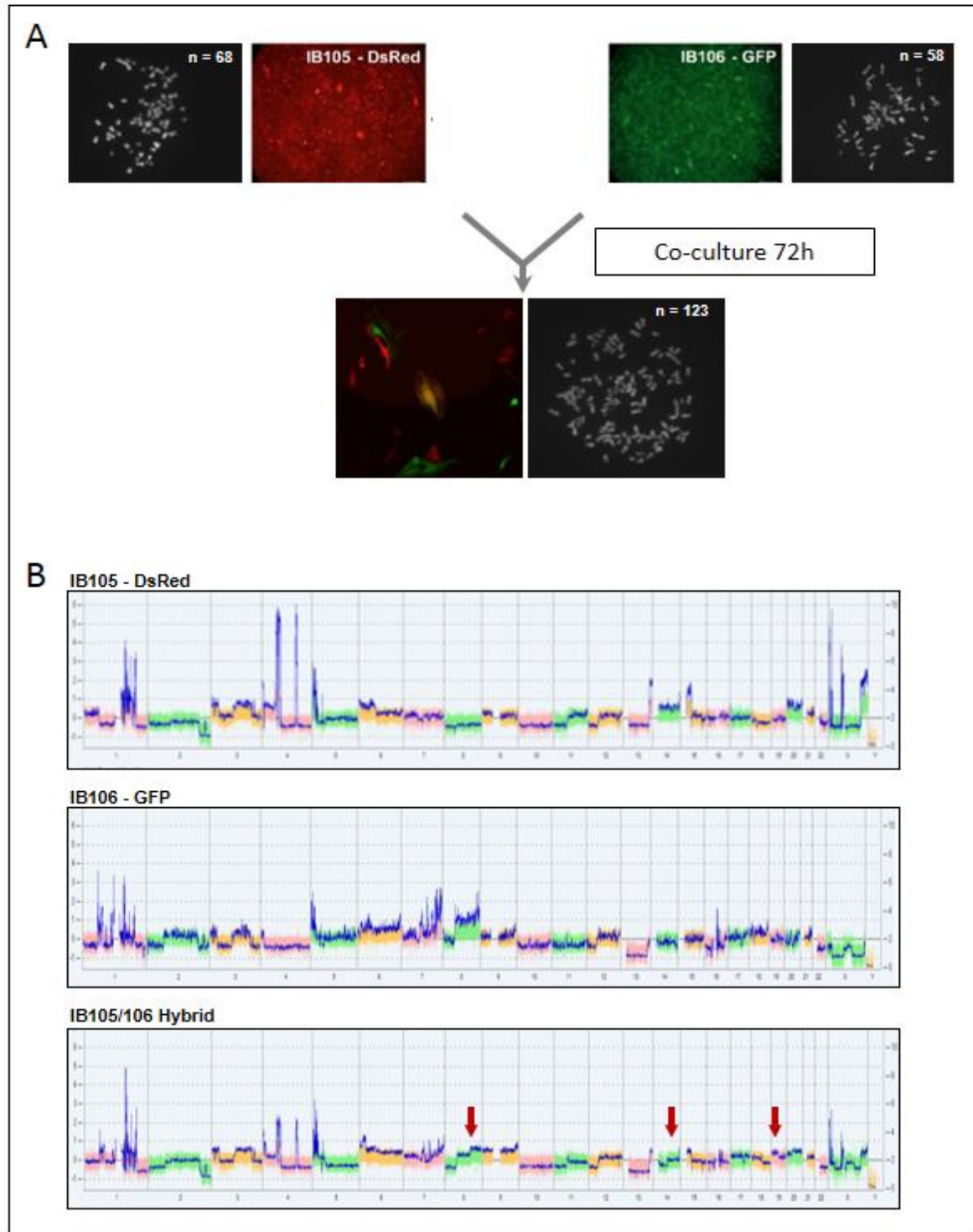


Figure 33 : Caractéristiques génomiques des IB105-DsRed et IB106-GFP et des hybrides.
A/ Les hybrides obtenus suite à la co-culture de lignées parentales sont doublement marqués et ont un contenu en chromosomes presque équivalent à la somme du nombre de chromosomes des lignées parentales. Le nombre moyen de chromosomes pour chaque lignée est indiqué au niveau de l'image d'étalements chromosomiques (moyenne sur dix métaphases). B/ Profil génomique des lignées parentales et de l'hybride. Les flèches rouges indiquent les nouvelles altérations. L'axe des abscisses représente les chromosomes de 1 à Y, l'axe des ordonnées indique le ratio log₂ indiquant la quantité d'ADN de la lignée d'intérêt comparé à un ADN de référence. La ligne bleue indique le signal lissé.

Afin de déterminer quelles étaient les caractéristiques phénotypiques de ces hybrides, ces lignées ont ensuite été caractérisées par des analyses de prolifération, de migration et de clonogénicité (Figure 34). Les résultats obtenus montrent qu'elles présentent une prolifération intermédiaire comparée aux parentales. En revanche, les cellules hybrides acquièrent des capacités de clonogénicité et présentent une augmentation des capacités de migration.

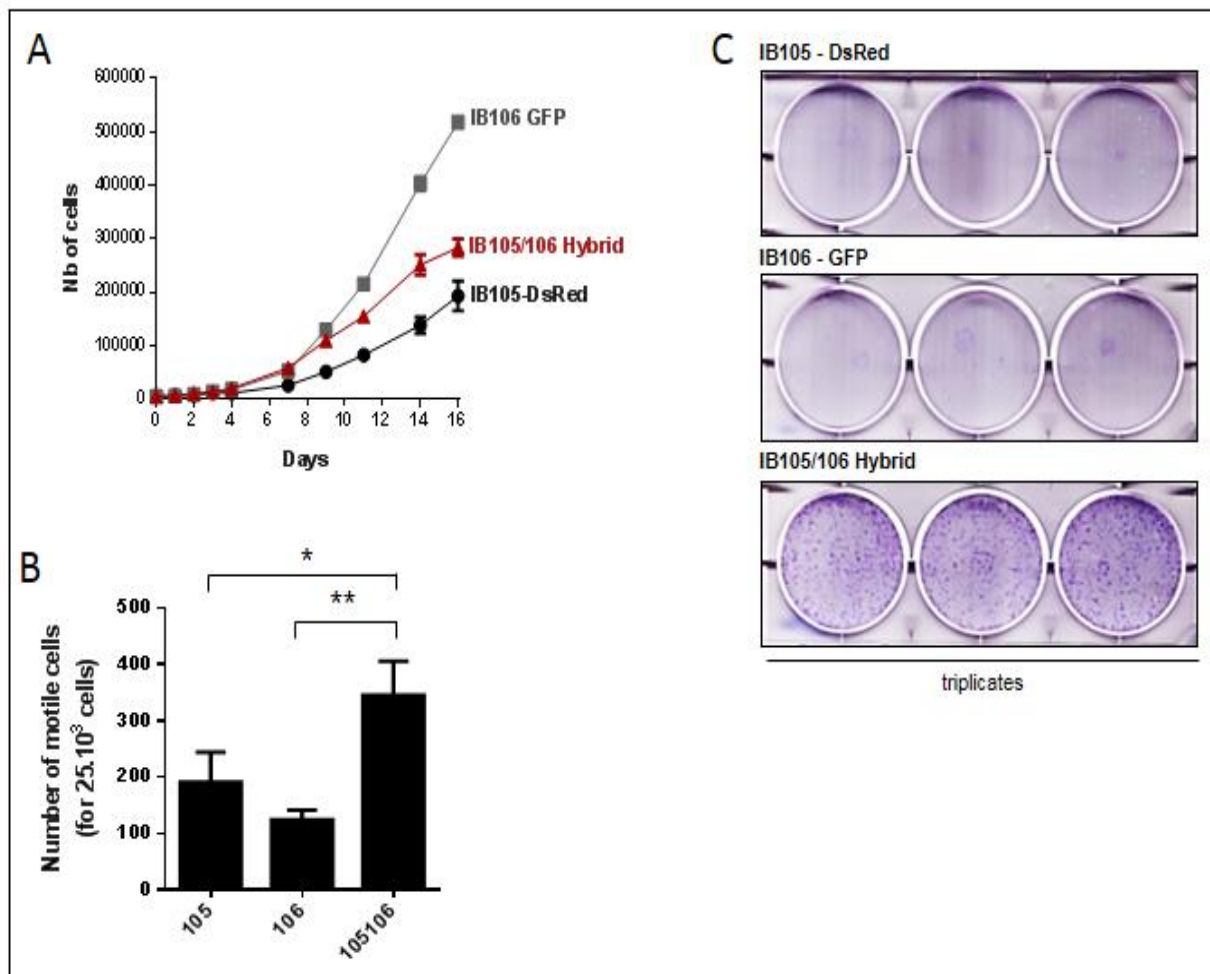


Figure 34 : Caractérisation phénotypique des hybrides.

A/ Test de prolifération des lignées parentales et des hybrides. B/ Test de migration (test ANOVA, n=8). C/ Test de clonogénicité observé avec du cristal violet.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Les hybrides obtenus présentent l'ensemble des altérations génomiques des deux lignées parentales ainsi que l'acquisition de nouvelles anomalies. Ils possédaient également de nouvelles propriétés phénotypiques qui suggéreraient une augmentation de l'agressivité suite à la fusion.

Bien que prometteur, ce modèle présentait en revanche des contraintes pour la suite de notre étude. En effet, au vu du nombre important de réarrangements génomiques des deux lignées tumorales IB105 et IB106, ce modèle n'était pas adapté pour identifier la formation de nouvelles altérations consécutives à la fusion. De plus, ces lignées étant déjà tumorales, nous ne pouvions pas utiliser ces lignées lors d'une étude sur l'initiation néoplasique. Afin de déterminer si la fusion cellulaire pouvait être un mécanisme inducteur d'altérations génomiques et initiateur de l'oncogenèse, un autre modèle cellulaire a été utilisé par la suite

Nous avons utilisés deux lignées de fibroblastes humains immortalisés, mais non-transformés, selon le modèle de Weinberg : des IMR90 exprimant les oncogènes E6, E7 et H-Ra_{SG12V} et des IMR90 exprimant les oncogènes E6, E7, SmallT et hTERT (lignées fournies par Martin Teichmann ; Université de Bordeaux ; (Durrieu-Gaillard *et al.* 2018). Dans ce modèle, cinq oncogènes sont nécessaires à la transformation cellulaire (Hahn *et al.* 1999, 2002 ; Haurie *et al.* 2010). Le regroupement par fusion des oncogènes dans un même génome pourrait alors induire la transformation des hybrides. Les résultats obtenus sont décrits dans l'**Article 2**.

2. Article 2 : *Human mesenchymal cell hybrid initiates genetically instable tumors*

Delespaul L #, Merle C #, Lesluyes T, Lagarde P, Baud J, Le Guellec S, Vélasco V, Carlotti M, Danet C, Fèvre M, Rousseau B, Durrieu S, Teichmann M, Coindre JM, Lartigue L ♦, Chibon F ♦.

= co-premiers

♦ = contribution équivalente

Article en préparation

Résumé

La fusion cellulaire est un mécanisme physiologique impliqué dans la différenciation de cellules, dont la polyploïdisation est nécessaire afin de réaliser leur fonction. En plus de son rôle physiologique, la fusion cellulaire contribuerait également à l'évolution tumorale, notamment en générant des cellules tétraploïdes.

La tétraploïdie a été identifiée à des phases pré-néoplasiques, précédant l'aneuploïdie des cellules tumorales. Cet état génomique serait alors une étape intermédiaire possible de l'oncogenèse. Alors que d'autres mécanismes peuvent conduire à la formation de cellules tétraploïdes, la fusion cellulaire est le seul qui confère à la nouvelle entité cellulaire, l'ensemble des altérations et des fonctions de deux cellules. Ceci permet alors aux cellules hybrides d'hériter des propriétés des deux parents, mais également d'en acquérir de nouvelles suite au remaniement global de leur génome. Dans cette étude, nous avons donc recherché le rôle de la fusion cellulaire au cours de l'initiation tumorale.

La fusion spontanée de deux lignées de fibroblastes immortalisés a permis l'obtention d'hybrides transformés. L'acquisition de la capacité tumorale *in vivo* de ces hybrides est précédée par une étape de latence, avec un développement tumoral allant de deux à dix mois post-injection. En plus de ce délai important, les tumeurs obtenues possédaient un génome plus remanié que celui des hybrides avant injection. Les altérations observées sont récurrentes dans l'ensemble des tumeurs, et sont similaires à celles retrouvées dans les sarcomes pléomorphes. Ces tumeurs du tissu mésenchymateux présentent des réarrangements génomiques importants, mais leur oncogenèse est encore peu comprise. Ce modèle pourrait contribuer à la genèse des sarcomes, expliquant leur génomique ainsi que leur biologie.

Human mesenchymal cell hybrid initiates genetically instable tumors

INTRODUCTION

In the first report of a genetically modified human cell toward transformation, Hahn and collaborators demonstrated that the ectopic expression of a combination of three oncogenes (hTERT, SV40-LargeT and mutated H-ras) results in direct tumorigenic conversion of normal human epithelial and fibroblast cells (1). Oncogenesis was therefore seen as the accumulation of genetic alterations leading to uncontrolled proliferation, apoptosis inhibition, migration, invasiveness and finally metastasis spreading (2). In the last decade this model as profoundly evolved, thanks to large projects developing high throughput analysis of the tumor genome (3). The current models involve large chromosomal events (i.e. aneuploidy) in this process. Common to many cancers, recent investigations definitely depicted it as a way to combine a favorable balance of cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity for oncogenesis (4). Tetraploidization—the doubling of a complete set of diploid chromosomes—is one class of ploidy abnormality that results from a whole-genome doubling (WGD) and intermediate to aneuploidy which are both a hallmark of human cancer (3, 5, 6).

Tetraploidy may act as a stochastic generator of genomic instability because tetraploid cells can gain or lose chromosomes progressively during aberrant rounds of bipolar mitosis or undergo multipolar mitosis (7–11).

Then, bypassing G1 arrest or apoptosis, mainly controlled by p53 and RB1 pathways (12), segregation defect will lead to chromosome-level alterations that simultaneously affect the expression of 100s of genes which can support the complex oncogenic program by altering many functional phenotypes (13) and potentially by impacting immune evasion (14). Finally, genome doubling, chromosomal complexity and resulting tumor heterogeneity are now firmly demonstrated as driver events to both tumor inception and evolution (6, 15, 16).

Tetraploidization can result from endomitosis (during which cells with duplicated chromosomes fail to divide) (8, 12), endoreplication (during which cells enter two consecutive rounds

of DNA replication that are not separated by mitosis) (17, 18) or illicit cell-to-cell fusion among somatic cells (19–21).

Cell fusion is a fundamental developmental mechanism from fertilization of sperm and egg to tissue repair (22–25). In response to injury fusion between hematopoietic and epithelial or mesenchymal cells is readily detected, these cells include Purkinje neurons, hepatocytes, cardiomyocytes, skeletal muscle cells and intestine stem cells (23, 25–29). This event ultimately conducts to the formation of fully differentiated multinucleated cells, but can be diverted in favor of malignant transformation and tumor progression provided that the genome integrity checkpoints do not fulfill their roles and tolerate further cell cycling (19, 30). First proposed by Aichel, more than one century ago, the fusion theory of tumour progression proposed that a combination of extra chromosomes and the distinct origins of chromosomes (two different cells) could be the source of aneuploidy (31, 32). Since this first hypothesis, evidences pile up to prove its clinic reality, both in animal models (33–35) and human cancers (36–43). Furthermore hybrids between cancer cells and macrophages enumerated in peripheral blood of human cancer patients correlate with disease stage and predict overall survival (35). While cell fusion is well known to fuel cancer aggressiveness and metastasis progression as a result of the formation of hybrids between cancer cells and neighboring stromal, stem, immune or inflammatory cells (44–46), its role in tumor inception is still poorly investigated and only reported to be a tumor promoter phenomenon in human involving virus (21) and in rats intestinal IEC-6 cells with an artificial fusogen, i.e. polyethylene glycol (PEG) (30).

Mesenchymal cells being physiologically able to fuse (i.e. myoblasts, macrophages, fibroblasts, mesenchymal stem cells) (22, 47, 48) we hypothesized that cell fusion could be a physiological mechanism participating to human mesenchymal oncogenesis and triggering aneuploidy which is the missing element of the Weinberg's model (1, 49) whereas it is an hallmark of mesenchymal malignant tumors drive by targeted pathways in the Weinberg's model, i.e. p53 and RB1 (50–53). To test this hypothesis, we revisited the Weinberg's model introducing a spontaneous fusion step into the oncogenic combination leading to tumor development in mice.

RESULTS

Hybrids generation and characterization

To generate hybrids, intermediate constructions of the modified Weinberg's model (1, 49) (see M&M), the IMR90 E6-E7-HRASG12V-CFP (hereafter named R-CFP) and the IMR90 E6-E7-SmallT-hTERT-DsRed (hereafter named ST-DsRed), were co-cultured 72h before antibiotics double selection (Figure 1A) in order to get a pure population of spontaneous hybrid cells which harbor, upon fusion, the five oncogenes defining the model, i.e. E6, E7, HRASG12V, SmallT and hTERT (49). This combination corresponds to the transformed diploid genetically modified IMR90 E6-E7-HRASG12V-SmallT-hTERT (here after named RST-W) cell line (see M&M) (49). Starting from single cells, six distinct hybrid clones (hereafter named H1 to H6) were selected, amplified and characterized. Demonstrating their hybrid nature, they all express CFP and DsRed double labeling (Figure 1B; Figure S1A), with a 4n DNA content in a single nucleus, as compared to 2n parental cells (Figure 1C; Figure S1B), with a chromosome number very close to but below the addition of the parental modal number (Figure S2A and B). As expected, for all the 6 hybrids we detected the combination of the five oncogenes inherited from parental cells, the same as in RST-W (Figure 1D). Then, array-CGH analysis showed that RST-W and parental cell genomes have no or few imbalances whereas genome of all hybrids harbor extra CNV as compared to parental cells (Figure 2A; Figure S3) and consequently a higher Genomic Index (GI = chromosome rearrangement level; see M&M), especially for H2 (Figure 2B). Interestingly, if most alterations are privates, arguing for their novelty and not for selection from existing ones, chromosome 15 losses are observed in all hybrids. However, these losses are distinct, the full chromosome in H3-6 and partial with non-identical break-points in H1 and H2. Once again this observation argues for post-fusion occurring. At the single cell resolution, 24c karyotyping of H2 hybrid evidenced new translocations as compared to both parental and RST-W cells (Figure 2C and Figure S4). Eight H2 metaphases were karyotyped, no translocation was recurrent across all analyzed metaphases, but instead we observed heterogeneity at both CNV and SV levels. Based on translocations as trackers, only two similar metaphases were observed (Figure S5A) and one translocation was shared by four metaphases, one by three and one by two. The 11 other translocations

are limited to one metaphase each, indicating that most are not selected. Break-points are all located in the centromeric regions.

Do hybrids induce tumors in mice?

RST-W are known to grow as tumors in mice, whereas neither IMR90-R nor IMR90-ST do not (49). Thus to test whether hybrids acquire tumorigenic properties after cell fusion, they were engrafted in immuno-compromised NSG mice, as well as parental and RST-W cells. As expected, RST-W cells rapidly induced tumors (take rate of 100%), R-CFP and ST-DsRed (both parental cells) did not (Figure 3A&B). After a latency ranging from 49 (H2) to 253 (H3) days all hybrids grew as tumors with a take rate ranging from 40% (H3 and H4) to 100% (H1 and H6) (Figure 3B&C). Growth rates were significantly slower than RST-W (56.9 and 97.9 mm³/day, respectively, $P = 0.048$). DsRed and CFP dual expressions demonstrated that all the hybrid tumors actually developed from fused cells (Figure 3D; Figure S6A). Hybrid tumors are composed of poorly differentiated pleomorphic cells that turned out to be vimentin(+) (mesenchymal marker), cytokeratin(-) (epithelial marker) and S100(-) (melanoma marker) by IHC, as well as tumors developed from RST-W (Figure 3E). According to the WHO classification of soft-tissue tumors, they were thus classified as UPS (Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas). Accordingly, morphology and IHC profile are identical to those of tumors developed from a grafted human UPS cell line (Figure 3E; Figure S6B). Thus, both models gave rise to sarcoma-like tumors but with distinct take rates, growths and latency periods before growing, short for RST-W (one week) and long for hybrids (several weeks to few months).

Does genomic instability account for latency period?

Genomic characterization has shown that the hybrids genome became instable upon fusion, giving rise to CNV, SV and heterogeneity. We thus hypothesized that the in-vivo long latency period before hybrids grow could correspond to an intense genomic instability and heterogeneity followed by a "bottle-neck" selection process leading to the development of tumors with the best-fitted genome. To test this hypothesis, we performed array-CGH analysis on all the hybrids and RST-W (as control)

tumors developed in NSG mice. As expected according to our hypothesis, the genome of the 14 tumors developed from the six hybrids all harbor additional extra CNV with more break-points and consequently an even higher GI (Figure 4A; Figure S7) as compared to hybrids before engrafting, which contrast with RST-W for which the GI was not modified in tumor. Moreover, chromosome losses led to a reduction of ploidy from $4n$ to $3n$ in half of the tumors (Figure S7B). Recurrent gains and losses were detected for chromosomes 1 (gain: 80 to 100% penetrance), 13 (loss: 80% penetrance), 10 (loss: 75% penetrance) and 16 (loss: 50% penetrance). Interestingly, this was highly reminiscent of what is observed in human UPS where these gain and losses are the most frequent (52) (Figure 5C). Then, 24c karyotyping of the H2-M3 tumor developed from H2 engrafting showed that the heterogeneity pattern was also modified (Figures S4 and S6B). There are more translocations per metaphase in H2-M3 than in H2 (5.3 vs 3.6). In H2 and H2-M3, 3/15 (20%) and 5/11 (45%) of the translocations are recurrent (identified at least in two metaphases), respectively. Phylogenetic reconstitution (Figure S6B) showed that, in H2, most cells are independent with the main node being the primary H2, whereas in H2-M3 most cells derived from a selected ancestor, harboring a $t(13;20)$ duplication and four additional translocations, from which most cells derived after translocation losses and formations. Collectively, these data likely validate our hypothesis that upon fusion, in-vitro and in-vivo during the latency period, take place a chromosomal instability phase generating heterogeneity from which emerge highly rearranged tumors cells with less heterogeneity. This model would imply that CGH profiles, established with DNA extracted from millions of cells should be more variating (due to CNV heterogeneity) in hybrids before than after tumor growth. We thus reanalyzed CGH profiles considering probe dispersion of AA and BB alleles (see M&M) both in hybrids and in matching tumors. Dispersion values spread correlated but in two clusters corresponding to Hybrids and to Tumors with significant high and low dispersions, respectively (Figure S8).

Does fitted genome make tumor to take more rapidly?

Still following our hypothesis, second round of grafting with cell lines derived from hybrid tumors (FG for First Graft) should take in time comparable to RST-W, and genome should be mostly not further modified, since it would have been heavily selected.

To extensively test this hypothesis, six cell lines derived from hybrid tumors (three tetraploids and three triploids) and one derived from RST-W tumor (as control) were engrafted (SG for Second Graft) (Figure 5A). As expected, the take rate was 100% for all FG and latency periods ranging from 17 to 45 days, several months shorter than in first graft condition and comparable to RST-W (Figure 5B; Figure S9). Growth rates were significantly higher than first graft and similar to RST-W (Figure 5C). SG tumors were all diagnosed as UPS according to HES and IHC analysis (Figure S10). CGH analysis showed that GI is not significantly different between FG and SG tumors (Figure 5D) indicating that hybrids genome has not been rearranged during the second graft contrary to what it had been in the frame of the first graft (Figure S11), which fully validates hypothesis.

DISCUSSION

Here we propose cell-cell fusion as a mechanism participating to oncogenesis by inducing chromosomal instability and both tumor heterogeneity and evolution. The Weinberg's model of oncogenesis, as most genetically modified mouse models of pleomorphic mesenchymal tumor based on inactivation of p53 and/or RB1 in mesenchymal cells (49, 54, 55) does not provoke chromosomal instability in tumors, in line with what was observed here with the RST-W genome analysis. Instead, we show here that merging heterogeneous genomes of two non-transformed, but immortalized, fibroblasts triggers genomic instability and oncogenesis.

The very first impact of such a fusion is obviously a genome doubling. Whole genome doubling is a common genomic aberration in human cancer (6). It is thought to take place early in tumor development, but after preceding oncogenic mutations including those triggering TP53 dysfunction or E2F-mediated G1 arrest defect (6). If accidental tetraploidization contributes to the evolution of neoplastic cells primarily by decreasing the fidelity of mitosis with extra chromosomes

and centrosomes, cell fusion does not merely mimic cytokinesis failure or endoreplication, which simply duplicate the genome. Instead, the destabilizing effect of cell fusion could result from differences between parental cells such as differentiation, mutations, telomere length, epigenetic program and cell cycle phase (20, 56, 57). The later could for example lead to Premature Chromosome Condensation (PCC) and chromosome pulverization (58, 59).

Two successive phases of genome remodeling are observed in our model of oncogenesis. First, an extensive chromosomal reshuffling presumably initiated at the very first mitosis after fusion, during the 'heterokaryon-to-synkaryon transition' phase. Physiologically, cell fusion produces terminally differentiated polynucleated (osteoclast (60), muscle fiber (61)) or non-proliferating heterokaryon (24). Activated oncogenes in our model sustain proliferation and thus trigger this phase during which the cell should, all of a sudden, handle a mitosis with the double heterogeneous content of chromosomes and centrosomes, facilitating chromosome missegregation and/or breakages (62). Second, in-vivo after grafting, during a long period of latency (up to eight months), tumors that emerged have a severely modified genome, more rearranged but less heterogeneous and with a ploidy reduction from tetra-to triploid in half of cases. This observation is highly reminiscent to what has recently been describe in human tumors in the context of tumor evolution. Turajlic and collaborators showed that in clear-cell renal carcinoma an evolutionary bottlenecking makes metastatic sites more homogeneous compared to their matched primary tumors with the majority of driver diversity accumulated at the primary tumor site, which then serves as the substrate for selection of metastasis-competent populations (15). It is likely that the latency period observed in our model corresponds to this Darwinian bottleneck filtering-out the best fitted genomes adapted to the murine environment to grow as a tumor. Once best fitted genomes mostly do not evolve, as evidenced in the grafting second round.

Upon fusion two types of chromosomal alterations are detected in hybrids, SV and CNV. In-vitro, before grafting, these alterations appear mostly private, and maybe random, with the exception of chromosome 15 losses which are observed in all clones. In-vivo, after first grafting, tumor growing is made from selected genomes were genomic alterations appear no more random. Instead,

chromosome 1 gain, chromosomes 13, 10 and 16 losses are highly recurrent events. This likely means that in-vitro environment exerts a selection pressure making chromosome 15 loss a proliferative advantage whereas in-vivo, new environment modifies selection pressure toward an advantage provided by chromosomes 1, 10, 13 and 16 alterations. Interestingly, those are the most frequent genomic alterations detected in human undifferentiated pleomorphic sarcomas (50, 52, 53), which are the cancers believed to originate from fibroblasts. Most reports about cell fusion in tumor focus on phenotypic consequences in tumor evolution (35, 45, 46, 63, 64). Nevertheless, two studies reported similar analysis about fusion as tumor initiating event. Limitations are that authors either used virus to induce human fibroblast hybridization (21) or PEG (Poly ethylene Glycol) to fuse rat intestine cells (30). Both evidenced that fusion induces CIN (Chromosomal INstability) and tumorigenesis but without comparing to human diseases. To our knowledge, our study is the first reporting that, shaped by the driving pressure of the environment, the tumor genome of mesenchymal immortalized fibroblasts spontaneously fused is quite close to those of human counterpart, i.e. undifferentiated pleomorphic sarcoma.

Whether or not such fusion event is acting in human pleomorphic sarcomas is indeed the next primary relevant but highly challenging question. Karyotypes produced by fusion are indistinguishable from karyotypes of human cancers, which implies that determining whether an aneuploid cancer cell is a hybrid may be difficult. Nevertheless, additional to our findings, several observations suggest that this mechanism could participate to human oncogenesis. Fusion occurs in the body in a context of injury or inflammation which are tumor prone environments (65, 66). It always involves at least one mesenchymal cell partner, i.e. macrophage, mesenchymal stem cell, cardiomyocyte, skeletal muscle cells or fibroblast (22–24, 26, 28, 29, 67). Cell fusion is detected in human cancers (35, 39–41, 68, 69).

In conclusion, cell fusion can create multiple types of genetic aberrations in a single step event. In turn, it constitutes an appealing mechanism to explain complex and non-recurrent genome disorganizations in cancer, in a scheme implying a conversion process from a 'diploid-to-tetraploid-to-aneuploid' state. Although preliminary by nature, our findings provide a simple model that explains

how CIN can occur in sporadic cancers without mutations that directly affect chromosome segregation, which could perfectly mirror the early steps of human oncogenesis.

MATERIAL and METHODS

Cell Lines and reagents. Cell lines were cultured in RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. IMR90 cell lines were kindly given by M. Teichmann: **1/** IMR90 E6E7 HRAS_{G12V} (R): a partially transformed cell line hosting the oncogenes E6, E7 and HRAS_{G12V}; **2/** IMR90 E6E7 small t TERT (ST): an immortalized cell line hosting, in addition to E6 and E7, the oncogenes SV40 small T and hTERT and **3/** IMR90 E6E7 HRAS_{G12V} small t TERT (RST): an immortalized and transformed cell line hosting, in addition to E6 and E7, the oncogenes HRAS_{G12V}, SV40 small T and hTERT. DsRed or CFP parental cell lines were generated by lentiviral infection using pSD136-puromycin-DsRed and pER167-Blasticidin-CFP plasmids, respectively. Hybrids were made as follows: 150 000 cells of each parental cell line were seeded together into six well plates. Spontaneous hybrid cells were observed after 72 hours of coculture and selected by antibiotics addition (hygromycin/blebbistatin). Hybrid cells isolated from xenografts were obtained after a 16 to 20 hours collagenase (Sigma) treatment and cultured as described.

Cell cycle assay. Cells are fixed with ethanol 70% and incubated at - 20°C during 24 hours at least. Cell suspension is marked with 50µg/mL of propidium iodide (Sigma Aldrich) and 10 µg/mL of RNase A (Invitrogen). Propidium iodide incorporation is evaluated by flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience). Data were acquired using CellQuest software (BD FACS Systems) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Dual fluorescence validation in hybrids. In order to validate hybrid cell lines after antibiotic selection, all fluorescence cell lines were analyzed by flow cytometry (MACS Quant VYB, Miltenyi) and by microscopy (Zeiss Cell Observer Microscope).

Chromosome spreading. Cells were incubated with colchicin overnight (0.01µg/ml; Gibco, Thermofisher), harvested and resuspended in isotonic 0.075 M KCl buffer. Cells were finally fixed in standard 3:1 methanol:acetic acid final fixative solution. After several washes, cells were spread on a humidified glass slide. Slides were mounted using Vectashield medium plus DAPI (Vector laboratories). Metaphases are analyzed on Hamamatsu C4742–95 CCD camera and analyzed with the Genikon software (Alphelys, France). Chromosome number is determined for ten metaphases for each cell lines.

Multiplex fluorescence in situ hybridization. Metaphase spreads were hybridized using the 24XCyte kit from Metasystems Probes. Slides were immersed into four successive 1 min baths of 100%, 70%, 50% and 30% ethanol, and then in a 1 min bath of 0,1X saline sodium citrate solution. Slide and probe denaturation, hybridization and post–hybridization washings were realized according to the manufacturer’s instructions. Slides were mounted using the Vectashield mounting medium plus DAPI (Vector laboratories). Metaphases were automatically identified with a Zeiss Axio–plan 2 Imaging epifluorescent microscope connected to a CCD camera (Zeiss) and the Metafer 4/MSearch/AutoCapt imaging system (MetaSystems). Metaphase spreads were analyzed with the ISIS software (MetaSystems).

In vivo experimentations. Animals were maintained under specific pathogen–free conditions in the animal facility of Bordeaux University and CREFRE-US006 of Toulouse. Experiments were performed in conformity with the rules of the Institutional Animal Care and Use committee (approval number DIR13109 and A31555010) and all efforts were made to minimize animal suffering. For all experiments, 10^5 cells were subcutaneous injected into the right dorsal flank of 6–8 weeks old NOD.Cg–Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice. Tumor sizes were measured twice a week using a caliper and volume tumor was calculated using the formula: $V = \text{length} \times \text{width}^2 / 2$. At the end of the experiment, mice were sacrificed by cervical dislocation. Tumors were then weighted and divided in three parts for cell culture, formalin fixation and nitrogen freezing. Growth rate is calculated with the

segmental linear regression of GraphPad Prism. Statistical analyses were done using a Krustall Wallis test.

Tissue immunostaining. A 5µm paraffin-embedded tissue section, placed on a glass slide was de-paraffinized in xylene and incubated with a mouse anti-CFP (Santa Cruz Biotechnology sc9996, dilution 1/50) and rabbit anti-RFP (Abcam ab62341, dilution 1/50) primary antibodies for 1 hour at RT after a proteolytic epitope retrieval in citrate buffer (pH 6.0). Then, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and 647 goat anti-rabbit (Molecular Probes) secondary antibodies were incubated for 1 hour at RT. Slides were mounted using the Vectashield mounting medium plus DAPI (Vector laboratories). Image acquisition was done using a Zeiss Cell Observer Microscope.

Immunohistochemistry and H&E staining. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks were cut into 5µm-thick sections for H&E staining and immunostaining. Immunohistochemistry (IHC) was performed using the mouse monoclonal antibody against human S100 (Dako, clone Z311, 1/500), vimentin (Dako, clone V9) and pan-cytokeratin (Dako, clone AE1/AE3). H&E staining was performed according to standard protocols. Image acquisition was done using a Zeiss Cell Observer Microscope.

DNA isolation, genomic analysis and genomic index (GI) calculation. Genomic DNA was extracted using the standard phenol-chloroform method and quantified using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Genomic profiling were performed using the Affymetrix CytoScan HD Arrays (Affymetrix) for all cell lines and mice tumors according to the manufacturer's instructions. Pleomorphic human sarcomas genomic profiling were performed using the Affymetrix SNP 6.0 Arrays (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions. CEL files obtained by scanning the arrays were analyzed using the Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix, USA) and the annotations of the genome version GRCH37 (hg19). Ploidy was evaluated by the analysis of Allele difference as described by manufacturer's documentation (P/N CL00731).

GI was calculated as follows: $GI=A^2/C$ where A corresponded to the total number of alterations and C to the number of chromosomes affected by these alterations.

Penetrance plots of tumors in mice were obtained after mathematically subtracting hybrid signal lissé to tumor signal lissé. This removed genomic alterations already existing in injected hybrids to only display novel genomic imbalances. Penetrance plots of human tumors (22 undifferentiated pleomorphic sarcomas) were obtained after rCGH processing (v1.02; Commo *et al.*, 2016, *Bioinformatics*). Differences above 0.2 and below -0.2 were considered as gains and losses, respectively. Since the output of human tumors was already segmented and the output of tumors in mice was not, we applied a smoothing method on the resulting plot (*smooth.spline* function implemented in R with 50 degrees of freedom).

Tumor heterogeneity could not be directly evaluated using CNV estimation by array-CGH because of pool of sub-clones harboring different chromosomal losses and gains tend to compensate each other and set log2 ratios and signal lissés to a normal state. However, such gains and losses affect A and B intensity ratios for SNP probes. Consequently, we could use this information to evaluate tumor heterogeneity in genomic regions having similar CNV states for multiple samples. AA and BB probe dispersions were evaluated on 4n chromosomes in tetraploid samples. For these chromosomes, dispersions represent distances between 85th and 15th percentiles. This is analogous, but less restrictive, to the interquartile range (IQR) which uses 75th and 25th percentiles.

PCR. For PCR, primers were designed using Primer 3 program (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) and are presented in **Supplementary Table 1**. Touch-down 60°C program has been used (TD 60°C; 2 cycles at a 60°C, followed by 2 cycles at 59°C, 2 cycles at 58°C, 3 cycles at 57°C, 3 cycles at 56°C, 4 cycles at 55°C, 4 cycles at 54°C, 5 cycles at 53°C and finally 10 cycles at 52°C). PCR was performed on 50 ng of DNA using AmpliTaqGold® DNA polymerase (Applied Biosystems).

REFERENCES

1. W. C. Hahn et al., Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 400, 464–468 (1999).
2. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646–674 (2011).
3. T. I. Zack et al., Pan-cancer patterns of somatic copy-number alteration. *Nature genetics*. 45, 1134 (2013).
4. T. Davoli et al., Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*. 155, 948–962 (2013).
5. T. Davoli, T. de Lange, The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 585–610 (2011).
6. C. M. Bielski et al., Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nature Genetics*, 1 (2018).
7. R. L. Margolis, Tetraploidy and tumor development. *Cancer Cell*. 8, 353–354 (2005).
8. N. J. Ganem, Z. Storchova, D. Pellman, Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 157–162 (2007).
9. M. Kwon et al., Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev.* 22, 2189–2203 (2008).
10. I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, G. Kroemer, Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 385–392 (2011).
11. I. Vitale et al., Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization. *Cell Death Differ.* 18, 1403–1413 (2011).
12. T. Fujiwara et al., Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*. 437, 1043–1047 (2005).
13. S. Santaguida, A. Amon, Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 473–485 (2015).
14. T. Davoli, H. Uno, E. C. Wooten, S. J. Elledge, Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science*. 355 (2017), doi:10.1126/science.aaf8399.
15. S. Turajlic et al., Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell*. 173, 581-594.e12 (2018).
16. S. F. Bakhom et al., Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 553, 467–472 (2018).
17. T. Davoli, E. L. Denchi, T. de Lange, Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 141, 81–93 (2010).
18. A. Targa, G. Rancati, Cancer: a CINful evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 136–144 (2018).
19. D. Duelli, Y. Lazebnik, Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell*. 3, 445–448 (2003).

20. D. Duelli, Y. Lazebnik, Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 968–976 (2007).
21. D. M. Duelli et al., A Virus Causes Cancer by Inducing Massive Chromosomal Instability through Cell Fusion. *Current Biology.* 17, 431–437 (2007).
22. G. Ferrari et al., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 279, 1528–1530 (1998).
23. N. Terada et al., Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 416, 542–545 (2002).
24. J. M. Weimann, C. B. Johansson, A. Trejo, H. M. Blau, Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 5, 959–966 (2003).
25. A. Z. Rizvi et al., Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 6321–6325 (2006).
26. M. Alvarez-Dolado et al., Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 425, 968–973 (2003).
27. F. D. Camargo et al., Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat. Med.* 9, 1520–1527 (2003).
28. C. B. Johansson et al., Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 10, 575–583 (2008).
29. J. M. Nygren et al., Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol.* 10, 584–592 (2008).
30. X. Zhou et al., Cell Fusion Connects Oncogenesis with Tumor Evolution. *Am J Pathol.* 185, 2049–2060 (2015).
31. Aichel O, in *Vorträge und Aufsätze über Entwicklungsmechanik Der Organismen* (Leipzig, Germany: Wilhelm Engelmann, 1911), vol. Chapter XIII, pp. 92–111.
32. J. M. Pawelek, A. K. Chakraborty, Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 8, 377–386 (2008).
33. J. M. Pawelek, Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *Lancet Oncol.* 6, 988–993 (2005).
34. A. E. Powell et al., Fusion between Intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. *Cancer Res.* 71, 1497–1505 (2011).
35. C. E. Gast et al., Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Sci Adv.* 4 (2018), doi:10.1126/sciadv.aat7828.
36. A. Chakraborty et al., Donor DNA in a renal cell carcinoma metastasis from a bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant.* 34, 183–186 (2004).
37. G. A. Clawson et al., Circulating tumor cells in melanoma patients. *PLoS One.* 7, e41052 (2012).
38. G. A. Clawson, Cancer. Fusion for moving. *Science.* 342, 699–700 (2013).
39. G. A. Clawson et al., Macrophage-Tumor Cell Fusions from Peripheral Blood of Melanoma Patients. *PLOS ONE.* 10, e0134320 (2015).

40. G. A. Clawson et al., “Stealth dissemination” of macrophage-tumor cell fusions cultured from blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 12 (2017), doi:10.1371/journal.pone.0184451.
41. R. Lazova et al., A Melanoma Brain Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: First Evidence for Fusion in Human Cancer. *PLoS ONE*. 8, e66731 (2013).
42. Z. Kurgyis et al., Melanoma-Derived BRAF(V600E) Mutation in Peritumoral Stromal Cells: Implications for in Vivo Cell Fusion. *Int J Mol Sci*. 17 (2016), doi:10.3390/ijms17060980.
43. G. S. LaBerge, E. Duvall, Z. Grasmick, K. Haedicke, J. Pawelek, A Melanoma Lymph Node Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: A Second Case of Leucocyte-Tumor Cell Hybridization in Cancer Metastasis. *PLoS One*. 12 (2017), doi:10.1371/journal.pone.0168581.
44. F. Luo et al., Bone marrow mesenchymal stem cells participate in prostate carcinogenesis and promote growth of prostate cancer by cell fusion in vivo. *Oncotarget* (2016), doi:10.18632/oncotarget.9045.
45. G. Li et al., IL-4 receptor blockade abrogates satellite cell: Rhabdomyosarcoma fusion and prevents tumor establishment. *STEM CELLS*. 31, 2304–2312 (2013).
46. K. D. Mukhopadhyay et al., Isolation and Characterization of a Metastatic Hybrid Cell Line Generated by ER Negative and ER Positive Breast Cancer Cells in Mouse Bone Marrow. *PLOS ONE*. 6, e20473 (2011).
47. L. V. Kemény et al., Melanoma Cells Can Adopt the Phenotype of Stromal Fibroblasts and Macrophages by Spontaneous Cell Fusion in Vitro. *Int J Mol Sci*. 17 (2016), doi:10.3390/ijms17060826.
48. T. Yano, M. Tanaka, N. Fukuda, T. Ueda, H. Nagase, Loss of mutant mitochondrial DNA harboring the MELAS A3243G mutation in human cybrid cells after cell-cell fusion with normal tissue-derived fibroblast cells. *Int. J. Mol. Med*. 25, 153–158 (2010).
49. S. Durrieu-Gaillard et al., Regulation of RNA polymerase III transcription during transformation of human IMR90 fibroblasts with defined genetic elements. *Cell Cycle*. 17, 605–615 (2018).
50. F. Chibon et al., The RB1 gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Res*. 60, 6339–6345 (2000).
51. G. Pérot et al., Constant p53 pathway inactivation in a large series of soft tissue sarcomas with complex genetics. *Am. J. Pathol*. 177, 2080–2090 (2010).
52. L. Gibault et al., New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J. Pathol*. 223, 64–71 (2011).
53. Cancer Genome Atlas Research Network, Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell*. 171, 950-965.e28 (2017).
54. D. G. Kirsch et al., A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nat. Med*. 13, 992–997 (2007).
55. R. D. Dodd, J. K. Mito, D. G. Kirsch, Animal models of soft-tissue sarcoma. *Disease Models & Mechanisms*. 3, 557–566 (2010).

56. Y. Lazebnik, The shock of being united and symphiliosis. Another lesson from plants? *Cell Cycle*. 13, 2323–2329 (2014).
57. B. M. Ogle, M. Cascalho, J. L. Platt, Biological implications of cell fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 567–575 (2005).
58. R. T. Johnson, P. N. Rao, Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*. 226, 717–722 (1970).
59. P. N. Rao, R. T. Johnson, Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*. 225, 159–164 (1970).
60. A. Vignery, Macrophage fusion. *J Exp Med*. 202, 337–340 (2005).
61. E. H. Chen, E. N. Olson, Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science*. 308, 369–373 (2005).
62. T. Dittmar, K. S. Zänker, Tissue Regeneration in the Chronically Inflamed Tumor Environment: Implications for Cell Fusion Driven Tumor Progression and Therapy Resistant Tumor Hybrid Cells. *Int J Mol Sci*. 16, 30362–30381 (2015).
63. X. Lu, Y. Kang, Efficient acquisition of dual metastasis organotropism to bone and lung through stable spontaneous fusion between MDA-MB-231 variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 9385–9390 (2009).
64. J. Ding, W. Jin, C. Chen, Z. Shao, J. Wu, Tumor associated macrophage x cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. *PLoS One*. 7, e41942 (2012).
65. V. Giroux, A. K. Rustgi, Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. *Nat. Rev. Cancer*. 17, 594–604 (2017).
66. E. Elinav et al., Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer*. 13, 759–771 (2013).
67. S. Walsh, J. Nygren, A. Pontén, S. Jovinge, Myogenic Reprogramming of Bone Marrow Derived Cells in a W41Dmdmdx Deficient Mouse Model. *PLoS One*. 6 (2011), doi:10.1371/journal.pone.0027500.
68. G. Kovacs, Premature chromosome condensation: evidence for in vivo cell fusion in human malignant tumours. *Int J Cancer*. 36, 637–641 (1985).
69. G. Kovacs, A. Georgii, Spontaneous cell fusion in human malignancies: possible mechanism leading to heterogeneity. *Lancet*. 1, 350 (1985).

Figures

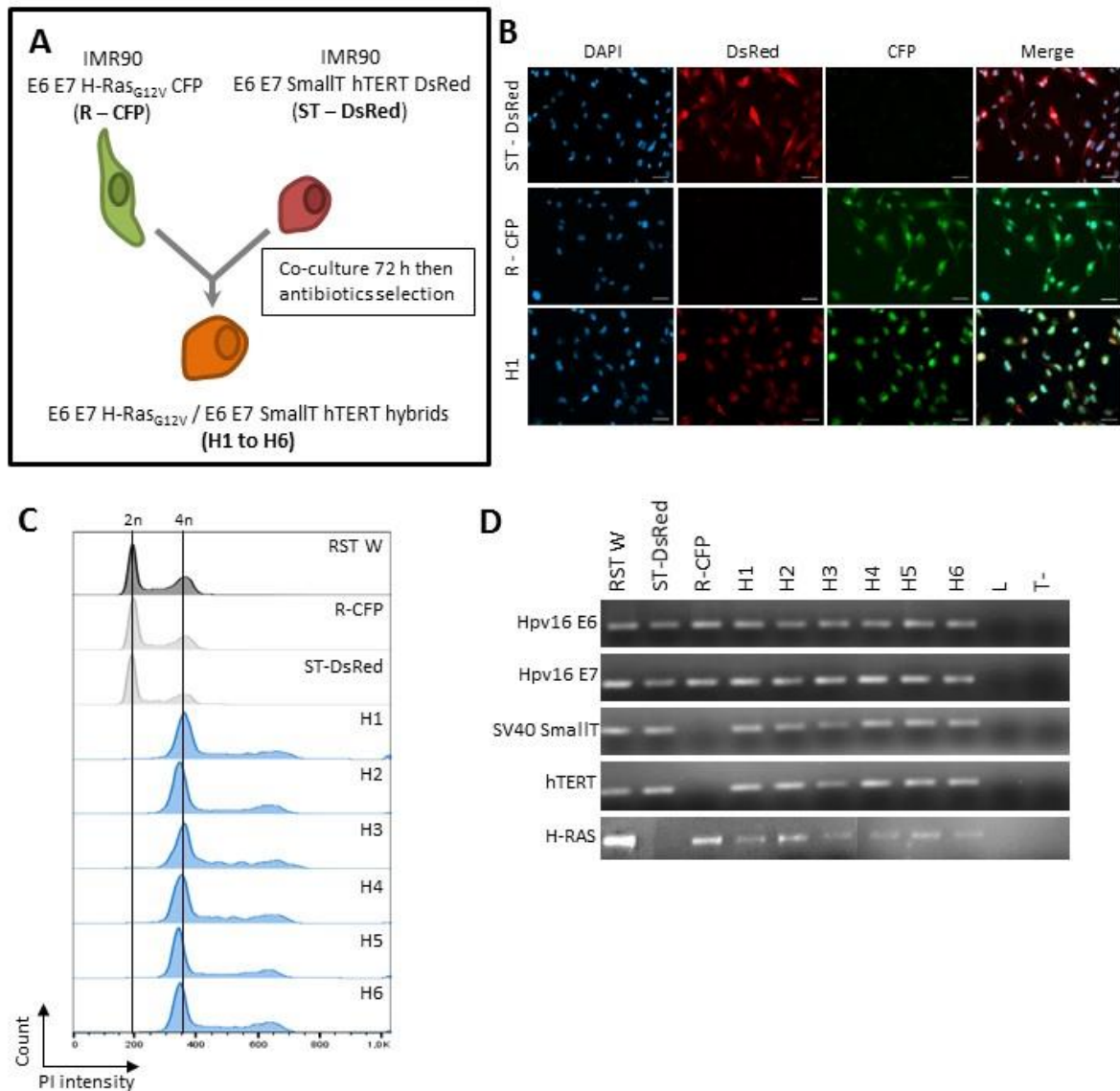


Figure 1: R-CFP/ST-DsRed hybrids identification after spontaneous fusion.

A – Schematic representation of hybrids generation.

B – Fluorescence panel of parental R-CFP and ST-DsRed cells, and hybrid H1. Scale bar = 50µm.

C – Cell cycle analysis by measurement of PI intensity for RST-W, R-CFP, ST-DsRed and hybrids. Vertical lines indicate 2n and 4n ploidies.

D – Agarose gel showing PCR products of the oncogenes (E6, E7, HRAS_{G12V}, Small T and hTERT) detected in the RST-W, parental (R-CFP and ST-DsRed) and hybrids (H1 to H6) cells. DNA from lymphocytes (L) was used a negative DNA control and water (T-) as an internal experimental negative control.

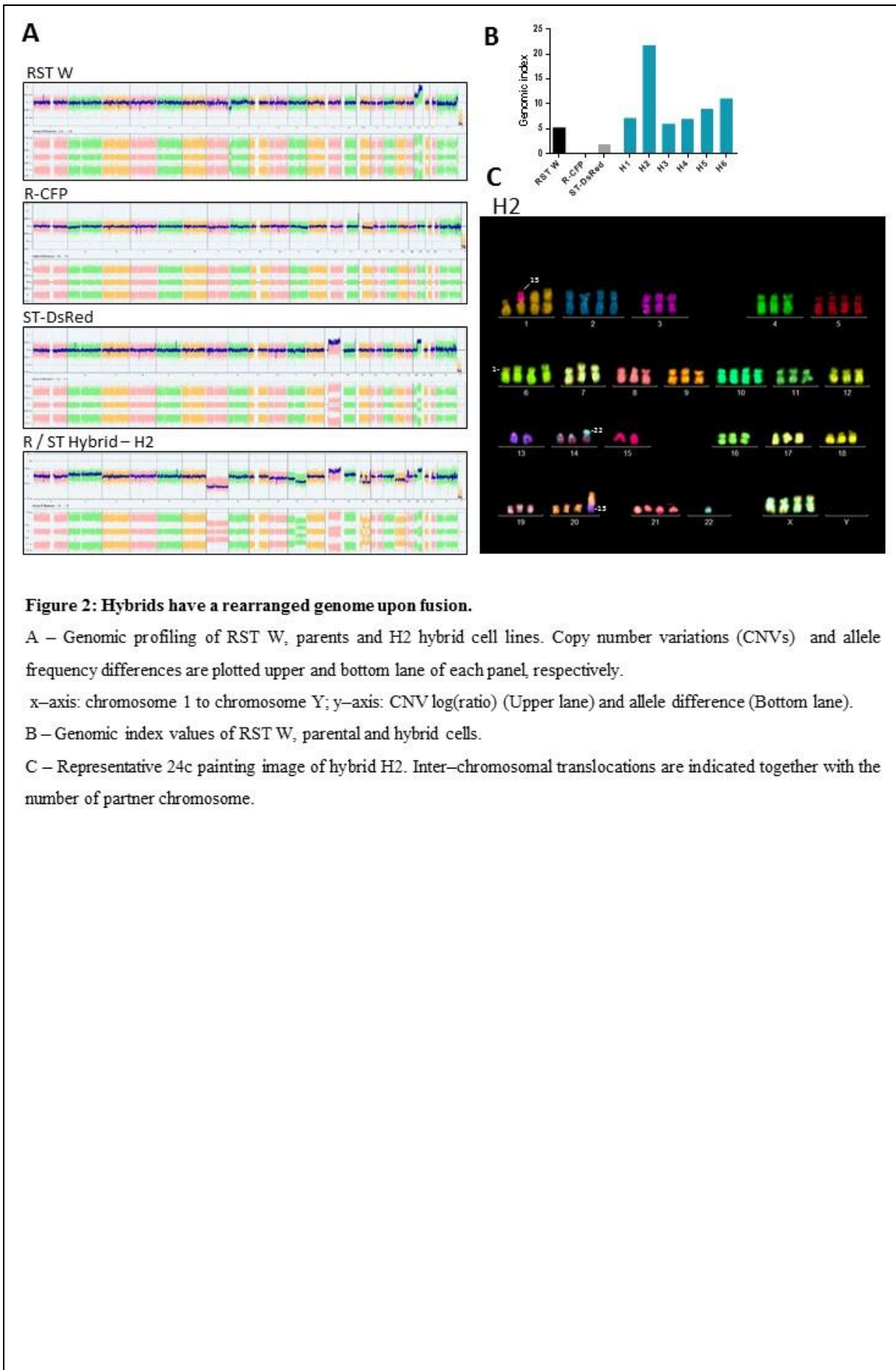


Figure 2: Hybrids have a rearranged genome upon fusion.

A – Genomic profiling of RST W, parents and H2 hybrid cell lines. Copy number variations (CNVs) and allele frequency differences are plotted upper and bottom lane of each panel, respectively.

x-axis: chromosome 1 to chromosome Y; y-axis: CNV log(ratio) (Upper lane) and allele difference (Bottom lane).

B – Genomic index values of RST W, parental and hybrid cells.

C – Representative 24c painting image of hybrid H2. Inter-chromosomal translocations are indicated together with the number of partner chromosome.

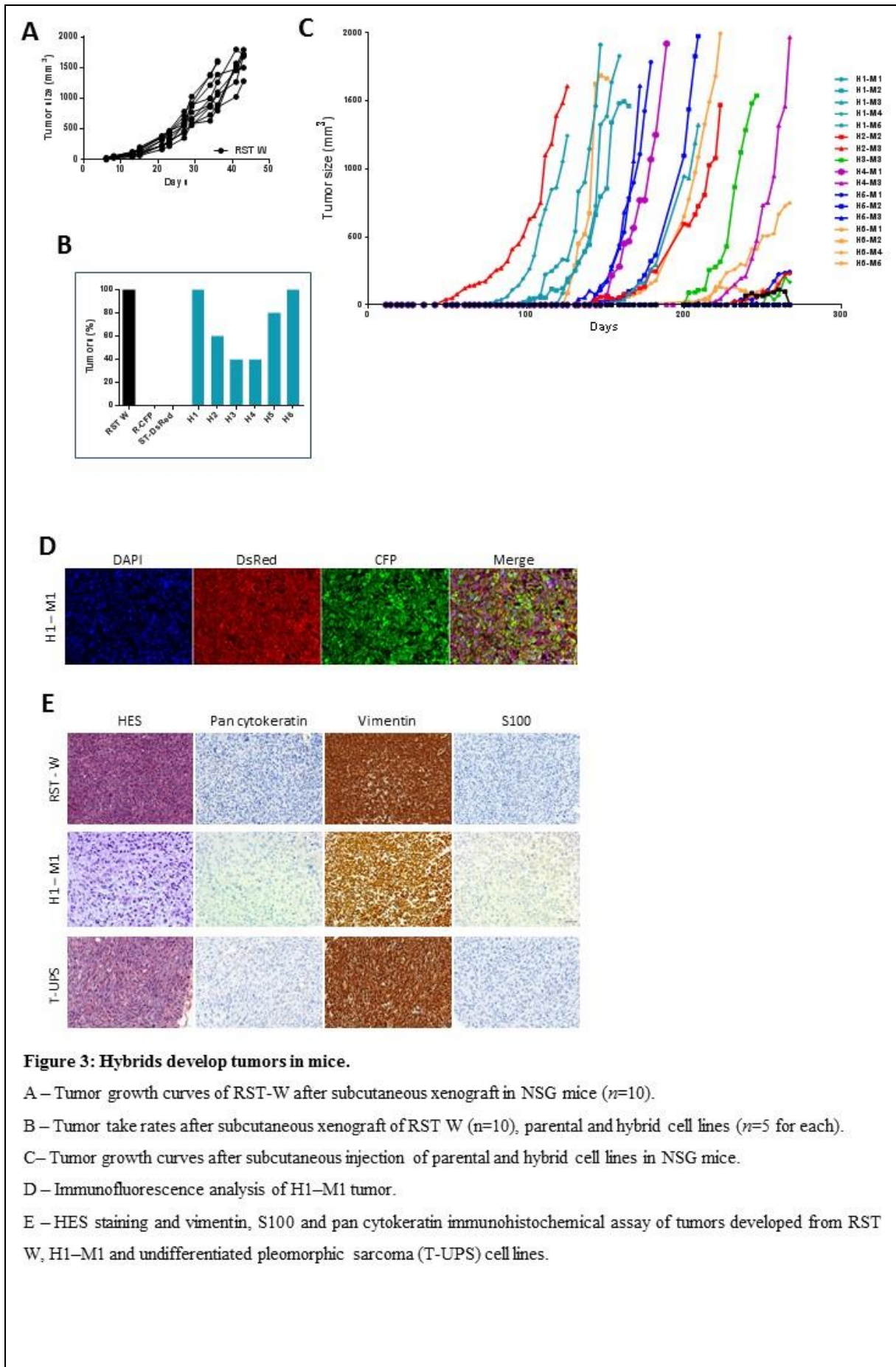


Figure 3: Hybrids develop tumors in mice.

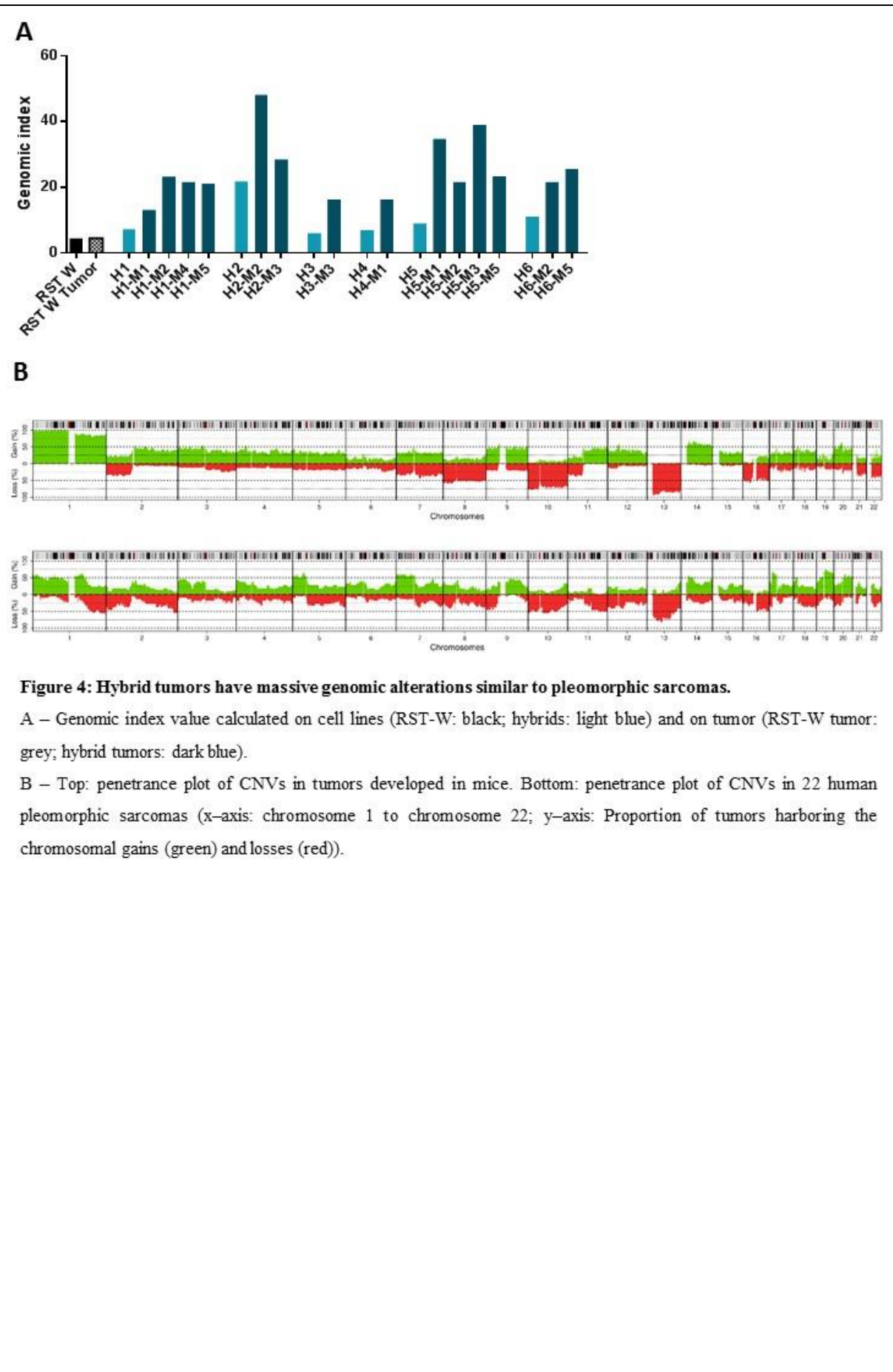
A – Tumor growth curves of RST-W after subcutaneous xenograft in NSG mice ($n=10$).

B – Tumor take rates after subcutaneous xenograft of RST W ($n=10$), parental and hybrid cell lines ($n=5$ for each).

C – Tumor growth curves after subcutaneous injection of parental and hybrid cell lines in NSG mice.

D – Immunofluorescence analysis of H1-M1 tumor.

E – HES staining and vimentin, S100 and pan cytokeratin immunohistochemical assay of tumors developed from RST W, H1-M1 and undifferentiated pleomorphic sarcoma (T-UPS) cell lines.



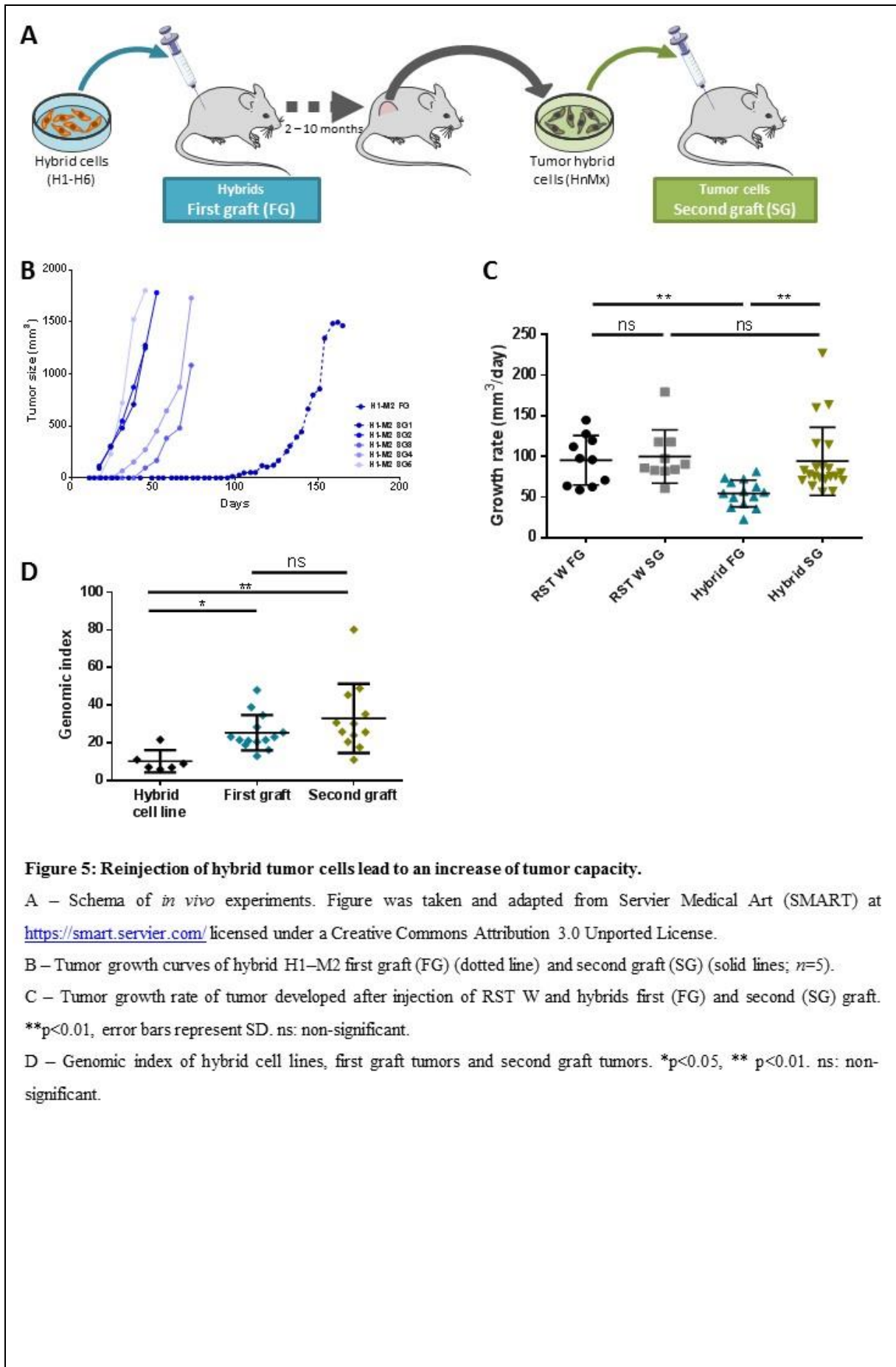


Figure 5: Reinjection of hybrid tumor cells lead to an increase of tumor capacity.

A – Schema of *in vivo* experiments. Figure was taken and adapted from Servier Medical Art (SMART) at <https://smart.servier.com/> licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

B – Tumor growth curves of hybrid H1–M2 first graft (FG) (dotted line) and second graft (SG) (solid lines; $n=5$).

C – Tumor growth rate of tumor developed after injection of RST W and hybrids first (FG) and second (SG) graft.

** $p < 0.01$, error bars represent SD. ns: non-significant.

D – Genomic index of hybrid cell lines, first graft tumors and second graft tumors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ns: non-significant.

Supplementary Figures

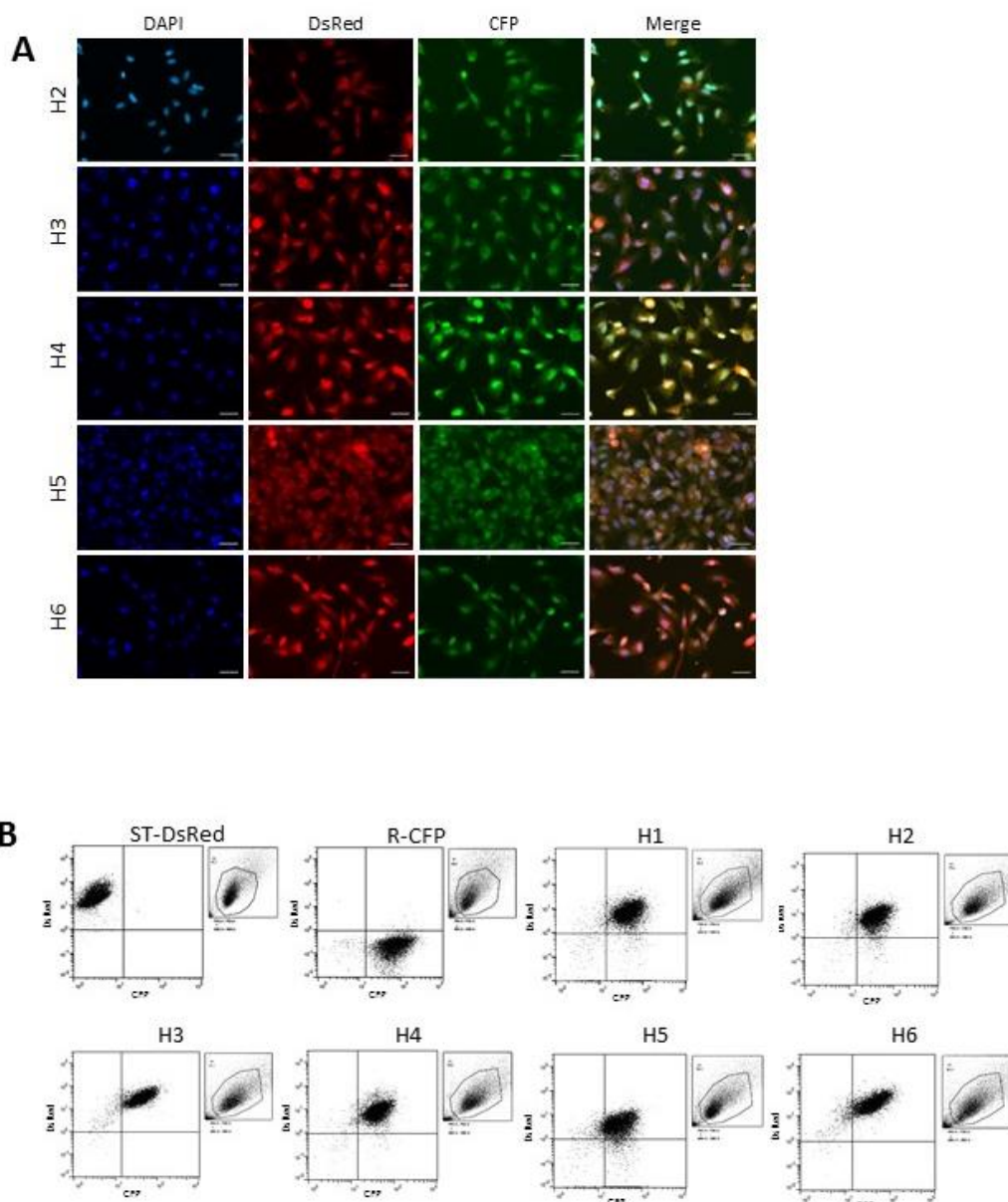


Figure S1 : Fluorescence analysis.

A – Fluorescence expression of hybrid cell lines H2 to H6. Scale bar = 50µm.

B – DsRed (y axis) and CFP (x axis) fluorescence panels of parental and hybrid cell lines measured by flow cytometry.

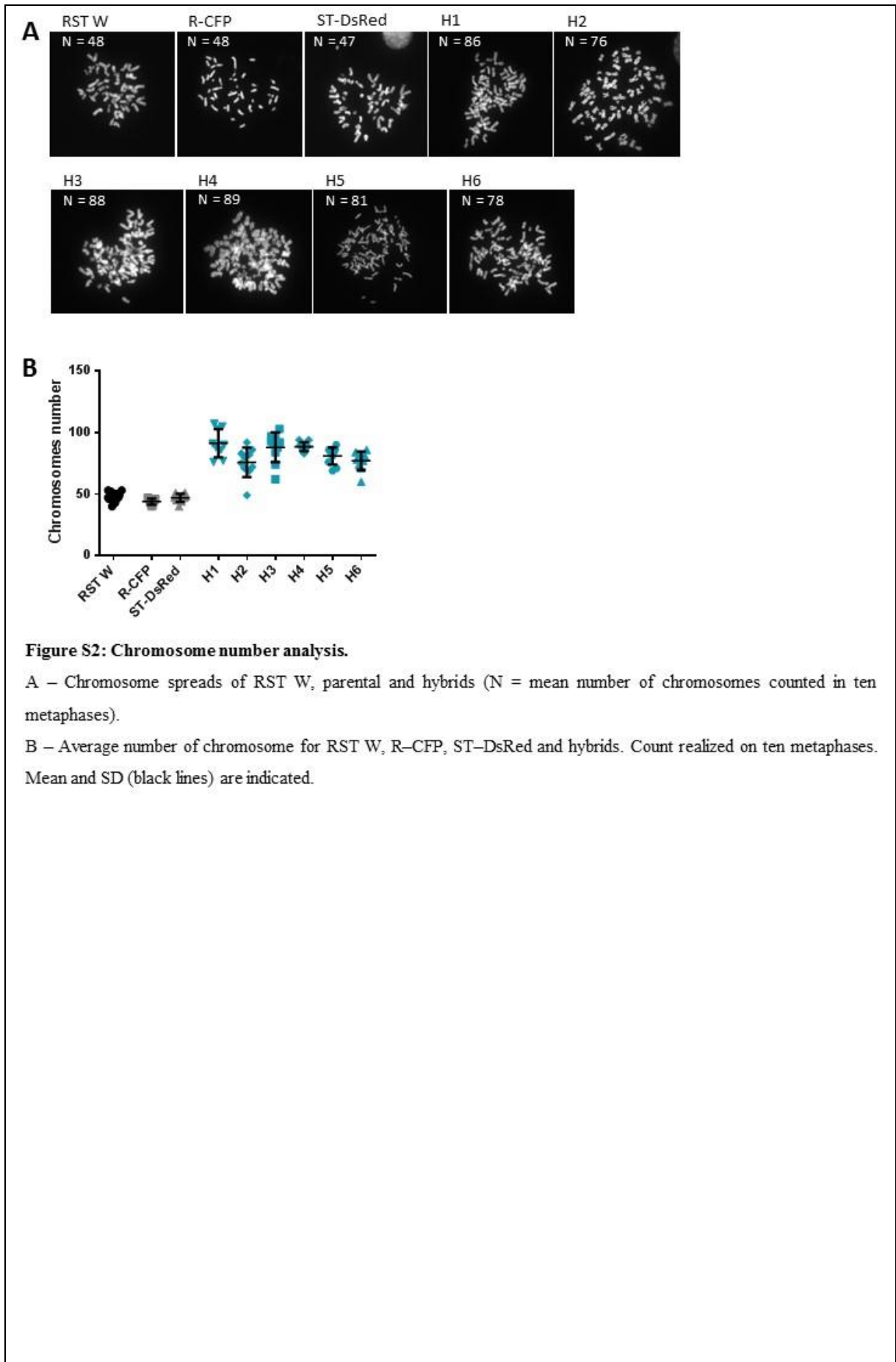


Figure S2: Chromosome number analysis.

A – Chromosome spreads of RST W, parental and hybrids (N = mean number of chromosomes counted in ten metaphases).

B – Average number of chromosome for RST W, R-CFP, ST-DsRed and hybrids. Count realized on ten metaphases. Mean and SD (black lines) are indicated.

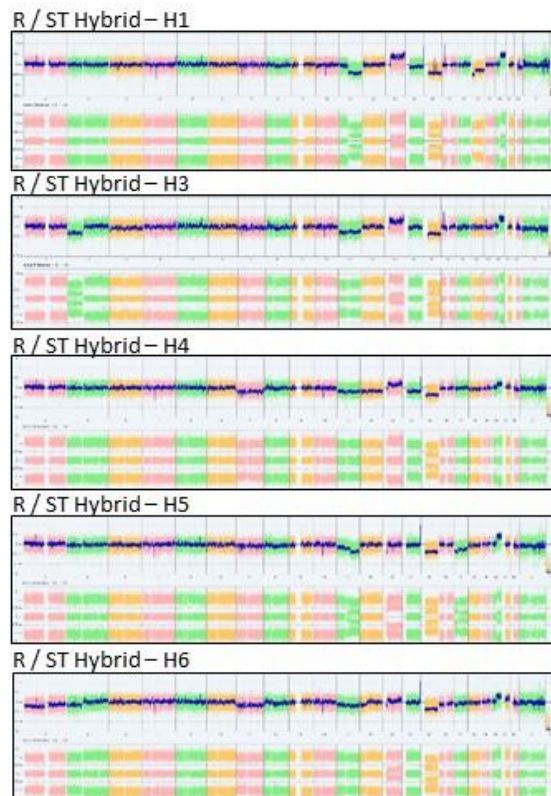


Figure S3: Genomic profiling of hybrids H1, H3 to H6.

CNVs and allele frequency differences are plotted upper and bottom lane of each panel, respectively.

x-axis: chromosome 1 to chromosome Y; y-axis: CNV $\log(\text{ratio})$ (Upper lane) and allele difference (Bottom lane).

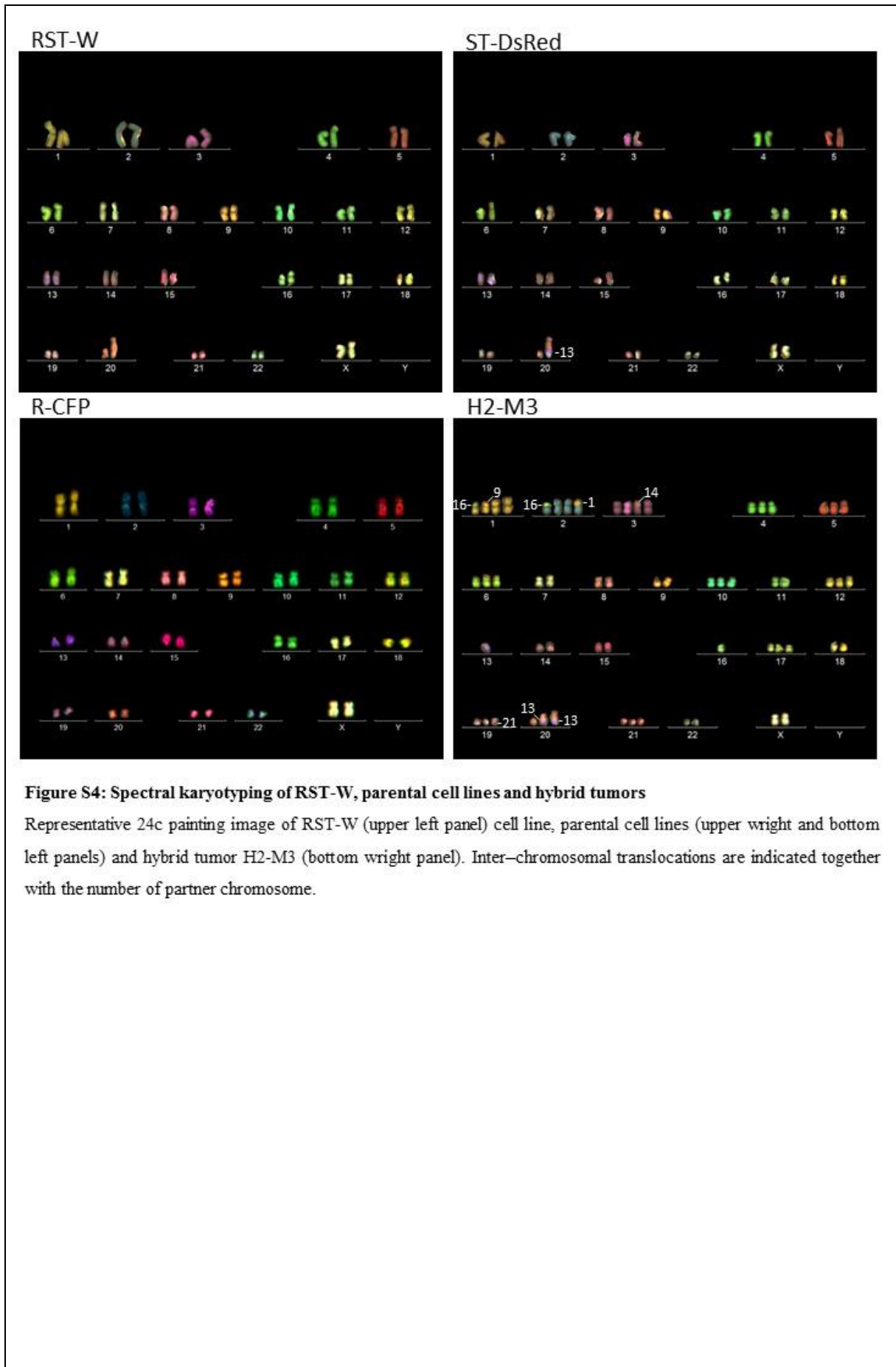


Figure S4: Spectral karyotyping of RST-W, parental cell lines and hybrid tumors

Representative 24c painting image of RST-W (upper left panel) cell line, parental cell lines (upper right and bottom left panels) and hybrid tumor H2-M3 (bottom right panel). Inter-chromosomal translocations are indicated together with the number of partner chromosome.

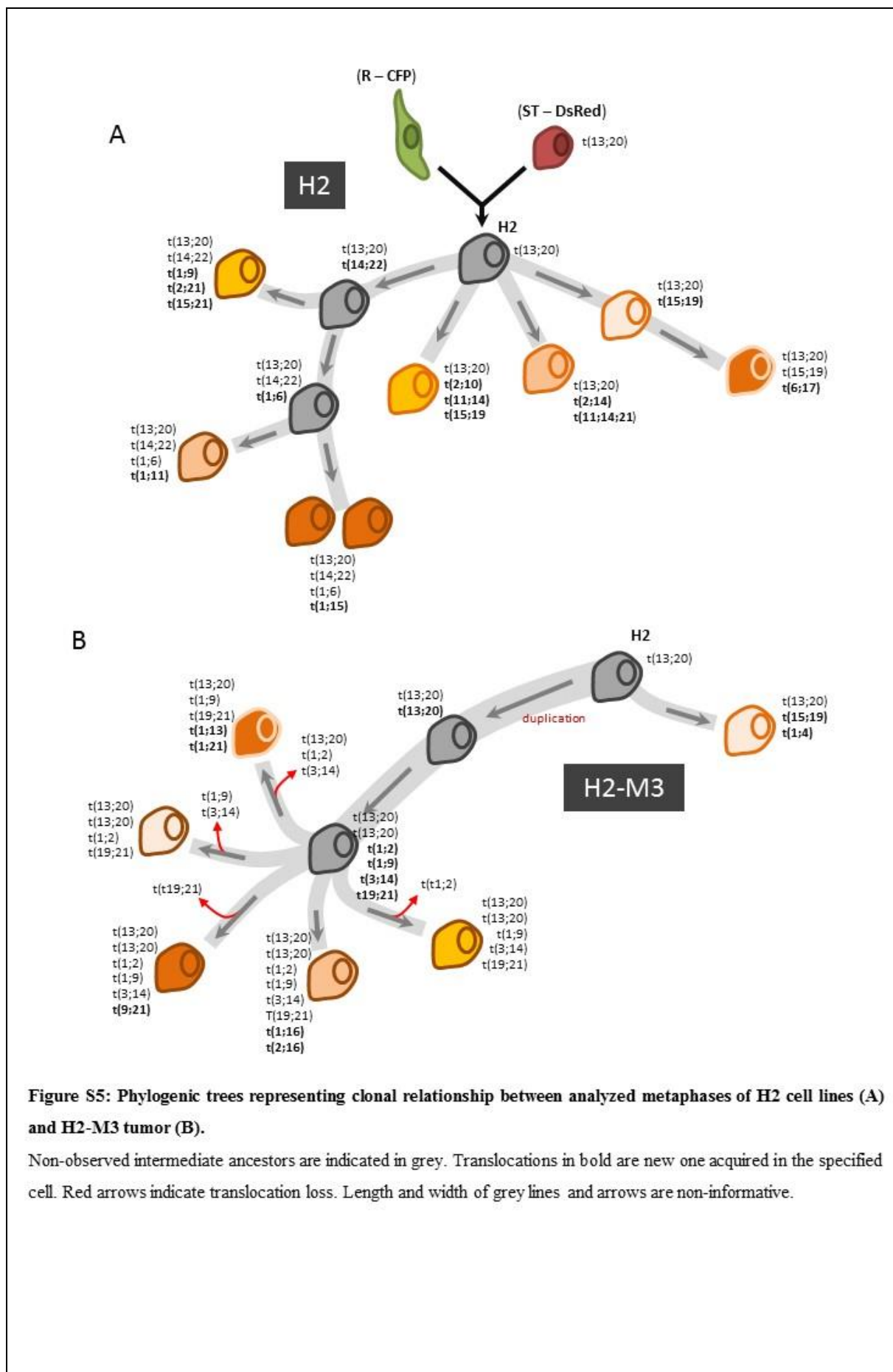
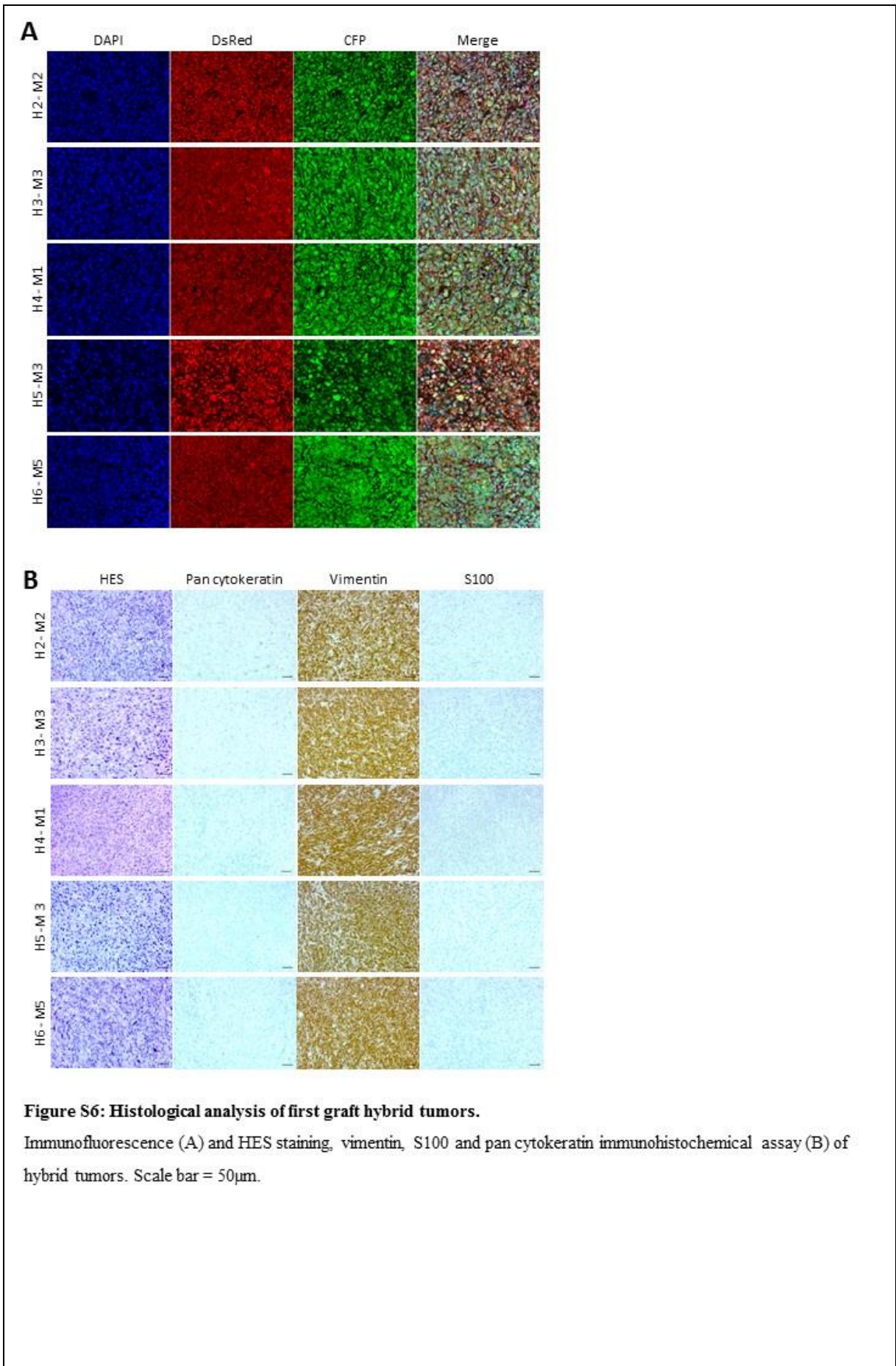
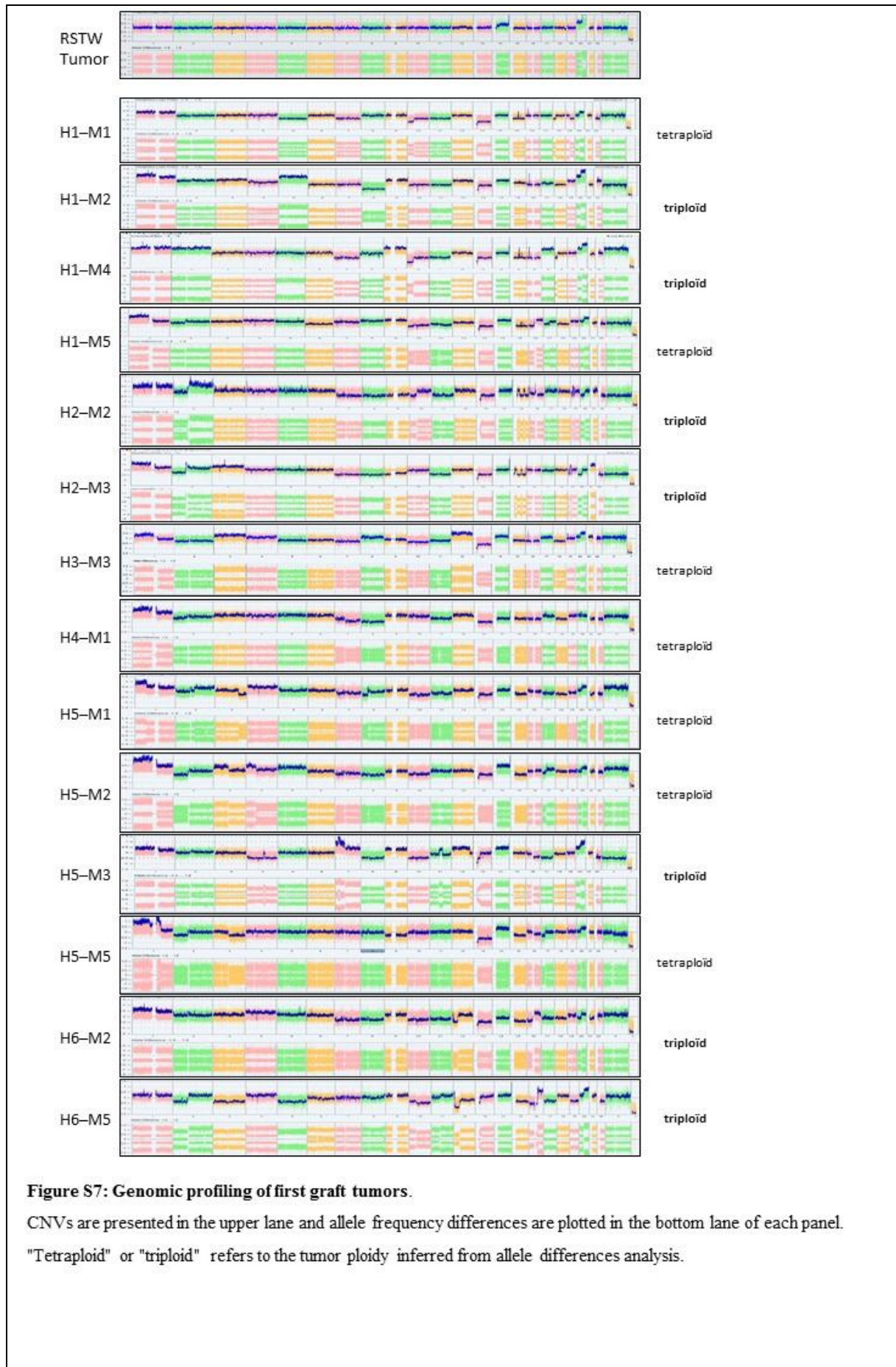


Figure S5: Phylogenetic trees representing clonal relationship between analyzed metaphases of H2 cell lines (A) and H2-M3 tumor (B).

Non-observed intermediate ancestors are indicated in grey. Translocations in bold are new one acquired in the specified cell. Red arrows indicate translocation loss. Length and width of grey lines and arrows are non-informative.





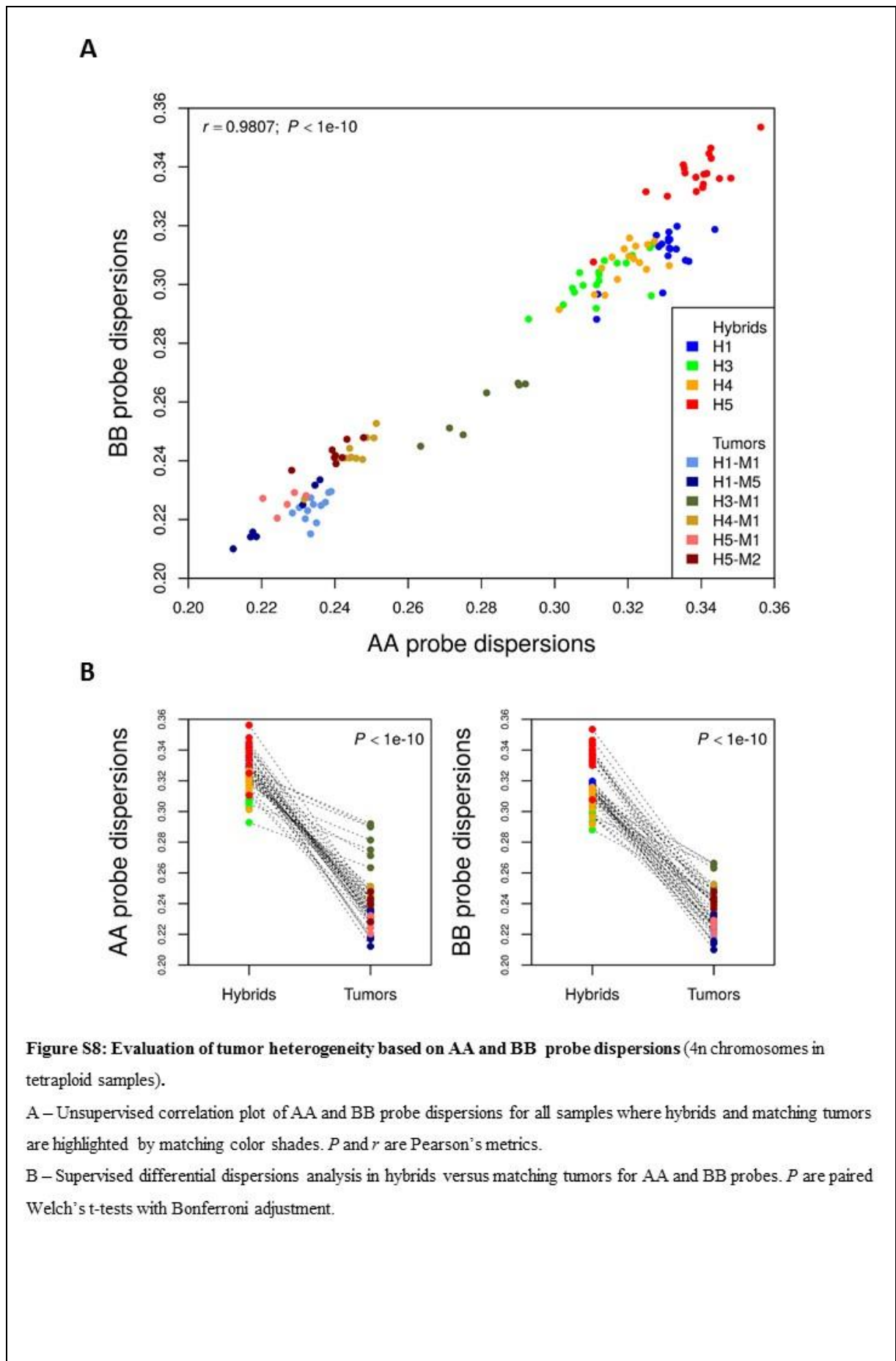


Figure S8: Evaluation of tumor heterogeneity based on AA and BB probe dispersions (4n chromosomes in tetraploid samples).

A – Unsupervised correlation plot of AA and BB probe dispersions for all samples where hybrids and matching tumors are highlighted by matching color shades. P and r are Pearson's metrics.

B – Supervised differential dispersions analysis in hybrids versus matching tumors for AA and BB probes. P are paired Welch's t-tests with Bonferroni adjustment.

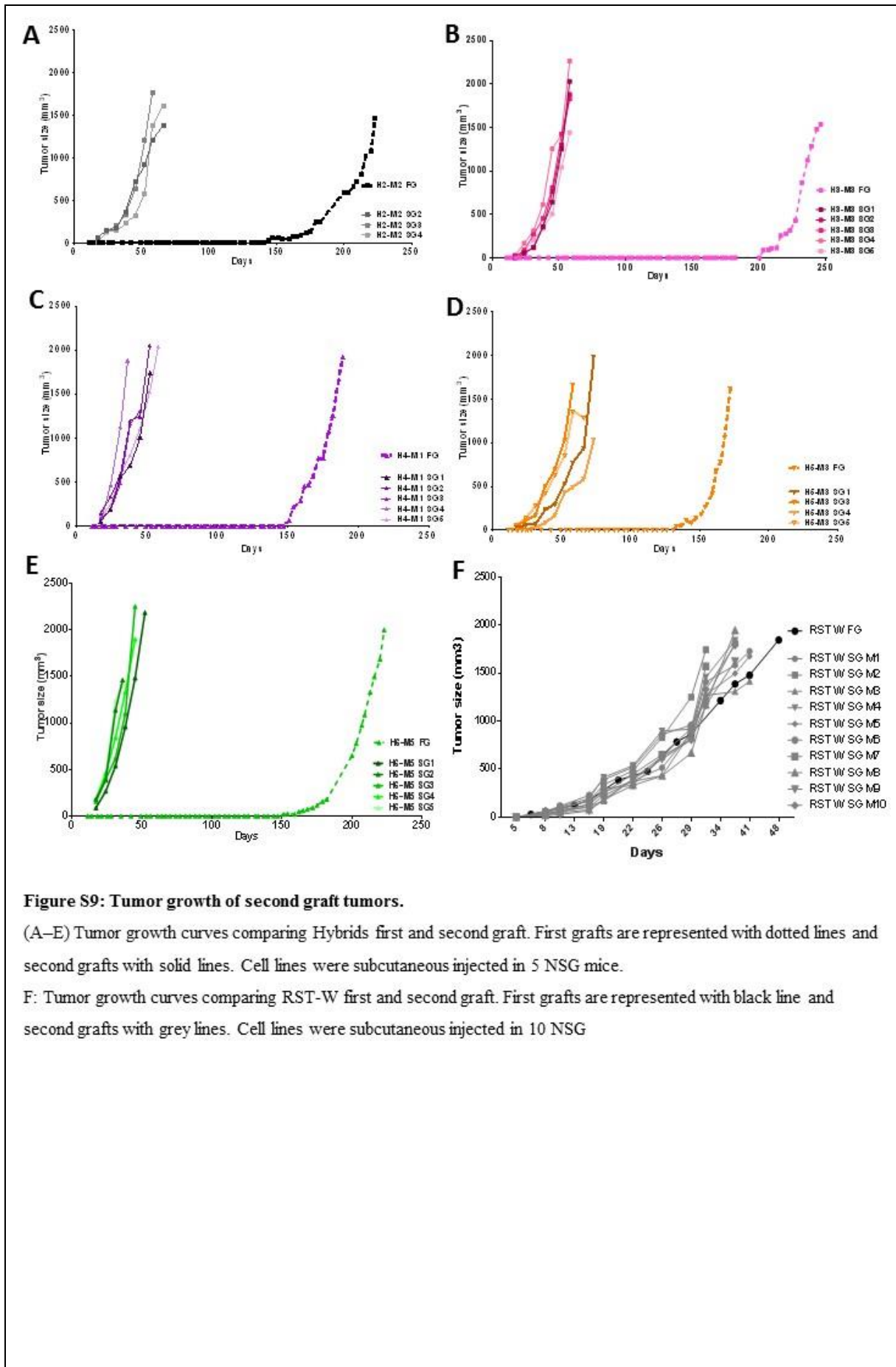


Figure S9: Tumor growth of second graft tumors.

(A–E) Tumor growth curves comparing Hybrids first and second graft. First grafts are represented with dotted lines and second grafts with solid lines. Cell lines were subcutaneous injected in 5 NSG mice.

F: Tumor growth curves comparing RST-W first and second graft. First grafts are represented with black line and second grafts with grey lines. Cell lines were subcutaneous injected in 10 NSG

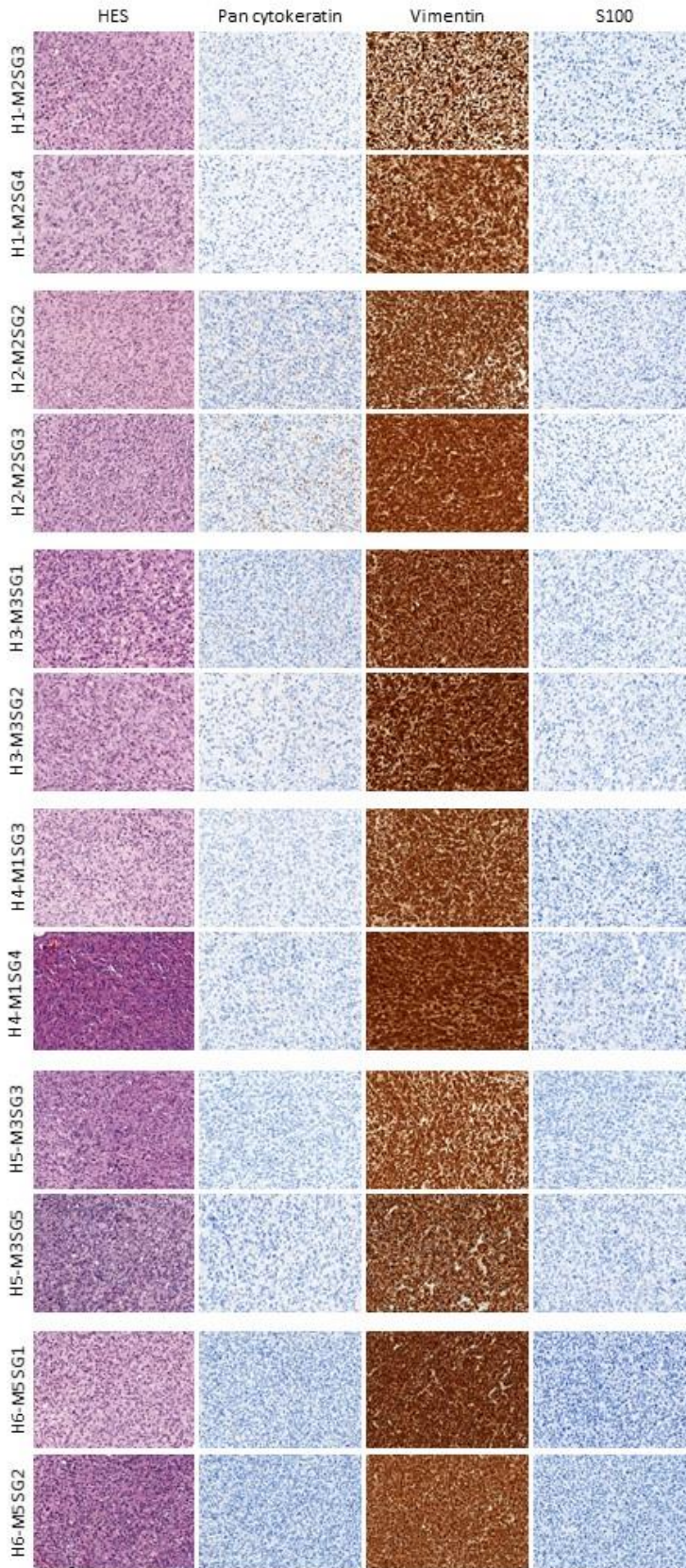


Figure S10: Histological characteristics of second graft (SG) tumors

HES staining, vimentin, S100 and pan cytokeratin immunohistochemical assay of hybrid SG tumors.

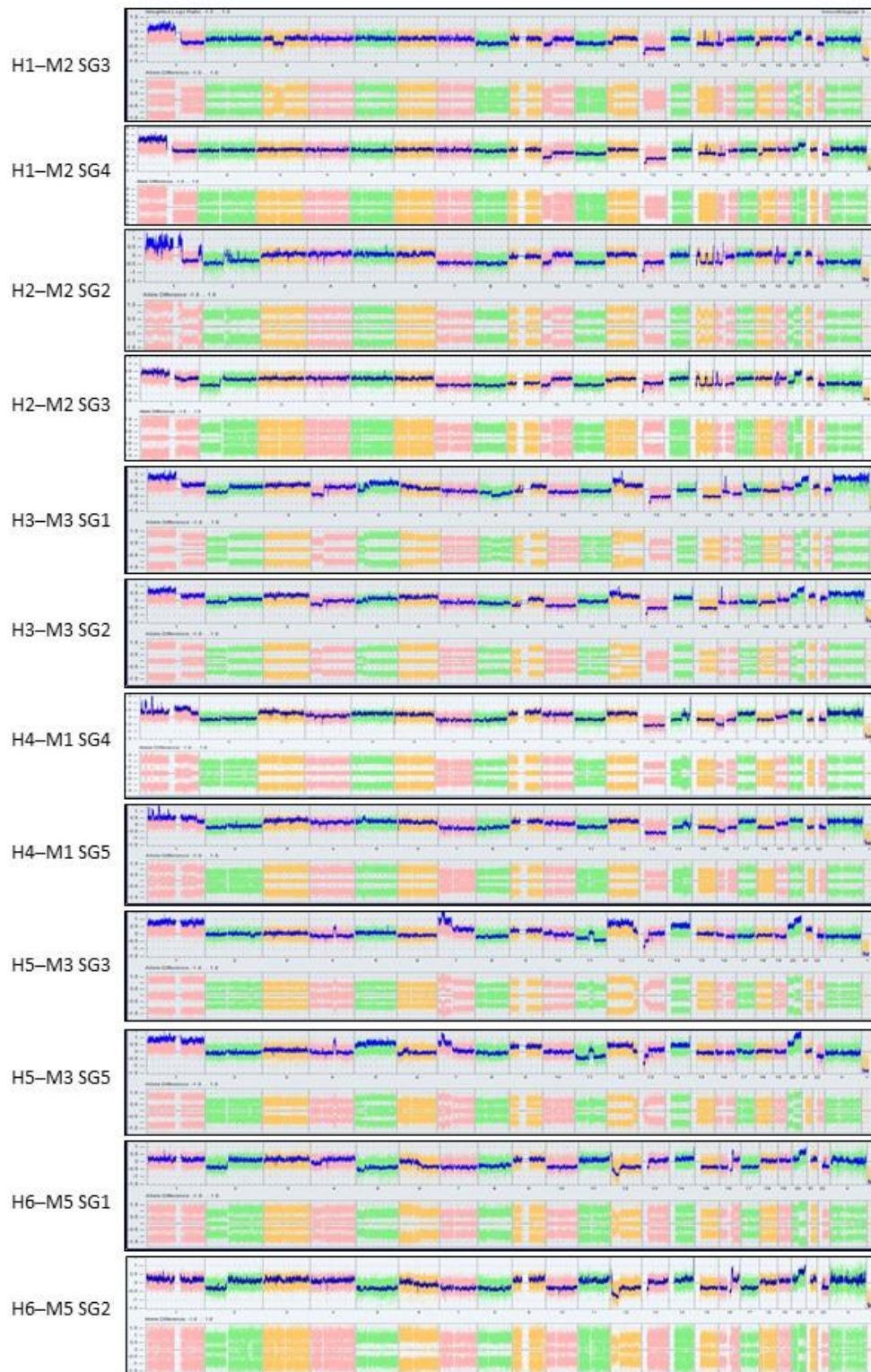


Figure S11: Genomic profiling of second graft tumors.

Two tumors per second injection were processed.

CNVs and allele frequency differences are plotted upper lane and bottom lane of each panel, respectively.

x-axis: chromosome 1 to chromosome Y; y-axis: CNV log(ratio) (Upper lane) and allele difference (Bottom lane).

Gene		Primer sequence	Size
hpv16 E6	F	GCAAAGACATCTGGACAAAAAGC	82 bp
	R	TGATCTGCAACAAGACATACATCG	
hpv16 E7	F	AGAACCGGACAGAGCCCATTA	74 bp
	R	GTACGCACAACCGAAGCGTA	
SV40 SmallT	F	ACTGCAAACAATGGCCTGAGT	71 bp
	R	CCTCAGTAAGCACAGCAAGCA	
hTERT	F	GGCGACATGGAGAACAAGCT	76 bp
	R	CCAACAAGAAATCATCCACAAA	
H-Ras	F	TGACGGAATATAAGCTGGTGGT	150 bp
	R	ACGTCTCCCATCAATGACC	

Supplementary table 1: Primer sequences for oncogenes validation

3. Conclusion

Dans nos travaux, nous avons pu observer que la fusion cellulaire pouvait être à l'origine de l'initiation tumorale. Peu de données attribuent un rôle initiateur de l'oncogenèse à la fusion cellulaire, et notre étude est par ailleurs, à notre connaissance, la première démontrant la contribution de la fusion spontanée dans cette étape (Duelli *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2015).

Alors que ces hybrides possèdent l'ensemble des oncogènes nécessaires à la transformation tumorale, il est surprenant de constater que le développement tumoral de ces hybrides nécessite la formation de nouvelles altérations. En effet, bien que dans des cellules diploïdes, ces cinq oncogènes suffisent à la transformation de ces cellules, leur seule présence dans des cellules hybrides ne permet pas de reproduire les capacités oncogéniques des cellules RST. Ces cinq oncogènes ne seraient alors pas suffisants pour la transformation des hybrides et, dans ce modèle cellulaire, l'instabilité génétique serait alors à l'origine de cette transformation.

Ainsi, la fusion cellulaire pourrait être un mécanisme initiateur de l'oncogenèse. Les tumeurs des hybrides présentent des similarités génomiques, cliniques et pathologiques avec les sarcomes pléomorphes. Nous décrivons donc ici un nouveau modèle possible de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe ».

B. Implication du cycle cellulaire dans la formation d'altérations dans les hybrides

Dans les sarcomes à « génétique complexe », deux profils génomiques sont observés : des profils à « bras », présentant de nombreuses pertes de bras de chromosomes, et des profils réarrangés, présentant de nombreux réarrangements numériques structuraux (Chibon *et al.* 2010). Ces deux profils semblent alors être associés à des mécanismes chromosomiques différentes : des défauts de ségrégation dans le premier groupe, et des cassures péri-centromériques dans le second groupe, probablement issues de cassures double-brin.

Les travaux présentés dans l'Article 2 permettent de mimer, pour la première fois, la génomique de ces tumeurs et indiquent qu'un évènement cellulaire peut être à l'origine de leur développement. Mais, est-ce que ce mécanisme peut conduire aux deux types de profils génomiques observés dans ces sarcomes ? A l'inverse des autres mécanismes de tétraploïdisation, la fusion cellulaire permet le regroupement de cellules différentes, que ce soit par leur différenciation ou même par leur état cellulaire comme l'apoptose, la sénescence ou encore la phase du cycle ; le contexte cellulaire joue alors un rôle important dans les évènements de fusion cellulaire (Bhatia *et al.* 2007 ; Noubissi *et al.* 2015). Un contexte spécifique pourrait alors expliquer les différences observées en termes d'altérations génomiques dans ces deux groupes.

Plusieurs études ont montré que la première mitose était un évènement déterminant du devenir des hybrides au travers de la transition « hétérokaryon-synkaryon » (Zhou *et al.* 2015 ; Sottile *et al.* 2016). Cette transition serait d'ailleurs une étape clef dans l'établissement d'altérations génétiques des hybrides, et les conséquences sur le génome pourraient être variables en fonction des phases du cycle cellulaire. Les travaux fondateurs de Rao et Johnson ont ainsi mis en évidence des comportements génomiques différents dans les hybrides selon les phases du cycle cellulaire des deux cellules parentales (Rao and Johnson 1970, 1972). La fusion cellulaire d'une cellule en mitose avec une cellule interphasique conduit à une condensation prématurée de la chromatine (PCC). Lors de la fusion d'une cellule en phase M avec une cellule en phase G1, la PCC va générer des chromosomes condensés à une chromatine ; en revanche, la PCC des chromosomes en phase de réplication (S), entraîne la formation

de cassure double-brin. La fusion cellulaire pourrait alors conduire à des anomalies génomiques différentes en fonction des phases du cycle.

Nous avons voulu déterminer si les deux différents profils observés dans les sarcomes à « génétique complexe » pouvaient être la conséquence de fusion à des phases particulières du cycle cellulaire. Dans cette partie, des combinaisons de fusions homophasiques et hétérophasiques ont été réalisées afin d'étudier leurs conséquences sur le génome des hybrides.

1. Résultats

1.1. Sélection des hybrides homo et hétérophasiques

Dans cette étude, afin de n'étudier que l'impact des phases du cycle, une seule lignée cellulaire a été utilisée. Les IMR90 E6/E7/RHAS_{G12V}/SmallT/hTERT (RST) ont été transduites avec soit un vecteur codant pour la GFP et un gène de résistance à la zéocine soit un vecteur codant pour la Tomato et un gène de résistance à la blasticidine. Ces cellules ont un temps de doublement de 22h, permettant alors leur synchronisation.

Afin d'obtenir des hybrides fusionnés à des phases bien précises du cycle, ces fusions ont été réalisées à l'aide du virus HVJE (fusion induite juste après la synchronisation) et ont été sélectionnées par leur double résistance antibiotique (**Figure 35 A**). L'objectif de cette étude est de déterminer si la fusion de cellules à différentes phases du cycle va conduire à des altérations chromosomiques variables. Pour cela, nous avons réalisé des fusions entre les différentes phases du cycle, et les différentes combinaisons sont indiquées dans la **Figure 35 B**. Afin de confirmer que le HVJE n'induisait pas d'altération génomique, pouvant fausser nos analyses, la fusion induite par cette particule virale entre des cellules ST-DsRed et R-CFP a été réalisée. Ces hybrides présentaient des profils génomiques similaires à ceux décrits dans l'**Article 2**, obtenus par fusion spontanée.

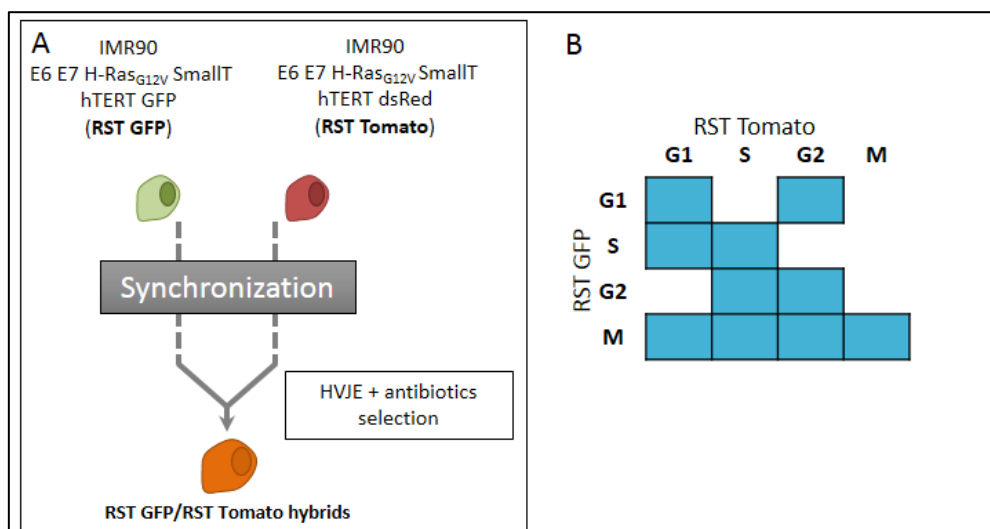


Figure 35 : Schéma expérimental pour l'obtention des hybrides issus de la fusion à des phases différentes du cycle de cellules transformées.

A/ Schéma expérimental pour l'obtention et la sélection des hybrides. B/ Représentation des dix combinaisons réalisées.

Les lignées parentales ont été synchronisées à l'aide de différents réactifs décrits dans le matériel et méthodes (partie 4). La synchronisation a été évaluée à l'aide d'iodure de propidium et montre une synchronisation d'environ 80% pour les phases G1, G2 et M (Figure 36 A). Le marquage BrdU a montré que 80% des cellules sont synchronisées en phase S (Figure 36 B). Par western blot à l'aide de l'anticorps phospho-MPM2, nous montrons que seules les cellules traitées au nocodazole sont en phase M (Figure 36 C).

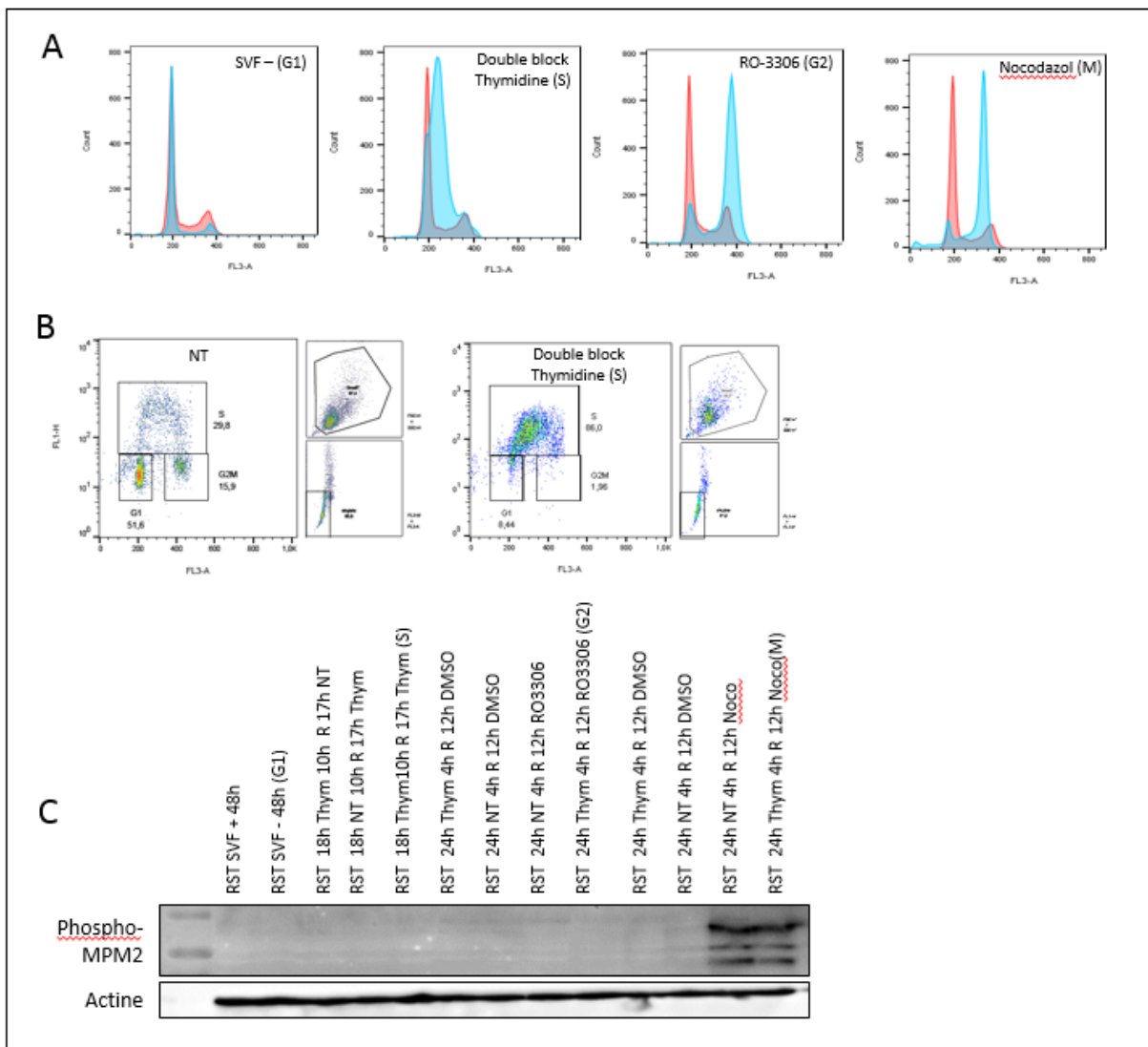


Figure 36 : Synchronisation des cellules parentales.

A/ Analyse par cytométrie de l'incorporation d'iodure de propidium dans des cellules synchronisées. Les cellules synchronisées sont représentées par l'histogramme bleu, les cellules contrôles sont en rouge. B/ Analyse par cytométrie du marquage BrdU. NT = non-traité. C/ Western blot mettant en évidence la phosphorylation par le MPF de la protéine MPM2 lors de la mitose. Thym = thymidine ; Noco = nocodazole ; R = relâche ; NT = non traité

Suite à l'induction de la fusion des lignées parentales synchronisées dans les différentes combinaisons et à la sélection antibiotique, dix clones ont été isolés pour chaque condition. Seule la fusion de deux cellules en phase M n'a pas permis d'obtenir des cellules hybrides. Parmi les dix clones sélectionnés, entre quatre et huit clones étaient viables. En tout, 43 clones ont été obtenus et analysés.

1.2. Analyse des profils génomiques des hybrides

Les profils génomiques des 43 clones ont été réalisés et sont présentés en **Annexe**. Comme précédemment observé, les hybrides présentent de nouvelles altérations génomiques comparés aux cellules parentales. Nous n'observons pas d'altération génomique commune ni entre les différents hybrides, ni entre les hybrides issus d'une même combinaison.

Nous voulions déterminer si, suite à la fusion à différentes phases du cycle, des anomalies génomiques similaires à celles observées dans les sarcomes à « génétique complexe » étaient observées. Alors que dans le groupe des sarcomes à « bras », les altérations concernent des pertes ou des gains de bras de chromosomes ou de chromosomes entiers, les sarcomes à profil « réarrangé » possèdent des altérations majoritairement péri-centromériques. Nous avons donc défini deux catégories d'altérations (**Figure 37**) :

- Les altérations « B » (pour « bras » de chromosomes) qui sont des pertes ou des gains de chromosomes entiers ou de bras de chromosomes,
- Les altérations « R » (correspondant à celles des profils « réarrangé ») qui regroupent l'ensemble des autres altérations identifiées.

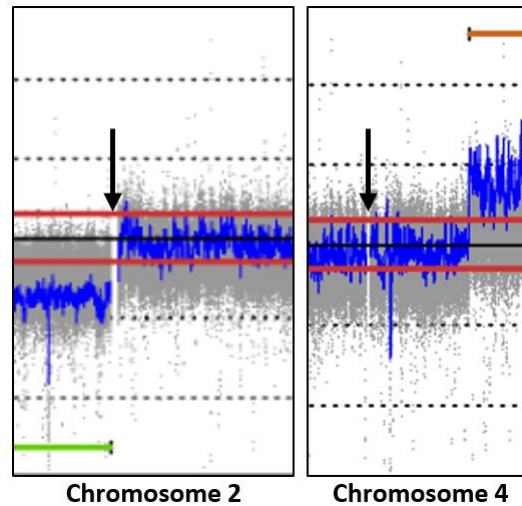


Figure 37 : Exemple des deux catégories d'altération considérées dans cette étude. Les altérations de type « B » sont représentées en vert, les altérations de type « R » en rouge. Le centromère est indiqué par une flèche.

Nous avons ensuite calculé le rapport du nombre d'altération « B » sur l'ensemble des altérations identifiées, ce ratio d'altérations est appelé rB.

Les synchronisations cellulaires étant effectives à 80%, il est estimé que 64% (0.8^2) des hybrides sont issus de fusion dans les phases du cycle souhaitées. Les rB calculé sont réparti selon une distribution normale, nous avons donc exclu, pour chaque combinaison, les clones possédant le rB le plus distant. Pour chaque clone, son rB est comparé à la moyenne des rB des autres clones, et ceux possédant une différence de plus de 20% comparé à la moyenne sont exclus. Pour chaque combinaison, au moins trois clones sont conservés. Le rB pour chaque clone restant est rapporté dans la **Figure 38**.

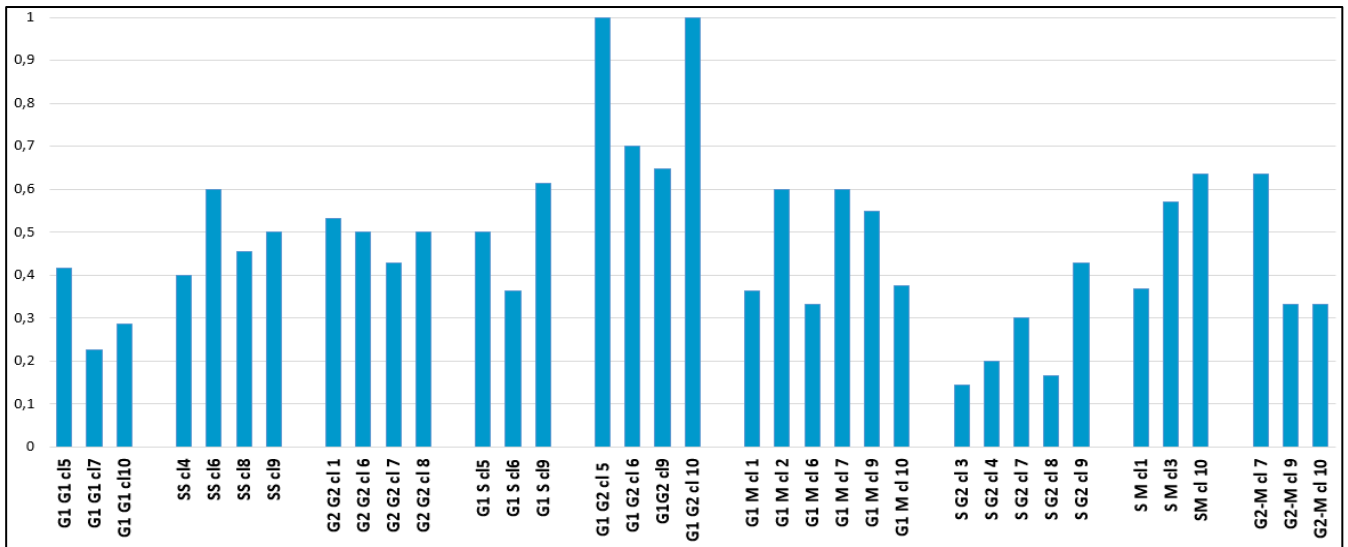


Figure 38 : Ratio rB de chaque clone.

En comparant le rB pour chaque combinaison, nous observons que les clones G1-G2 présentent le rB le plus haut (0,83) alors que les clones S-G2 ont le plus bas (0,24) et sont significativement différents (

Figure 39). Nous observons également une différence significative entre le rB des clones G1-G1 (0,31) et celui des clones G1-G2 (0,83). Les autres combinaisons présentent des rB compris entre 0,43 et 0,56. Ces hybrides ont donc autant d'altérations de type « B » que d'altérations de type « R ».

Les hybrides issus d'une fusion entre une cellule G1 et une cellule G2 présentent plus d'altérations de type « B », alors que les hybrides G1-G1 et S-G2 présentent plus d'altérations de type « R ». Les conséquences génomiques de la fusion entre ces différentes phases semblent différentes.

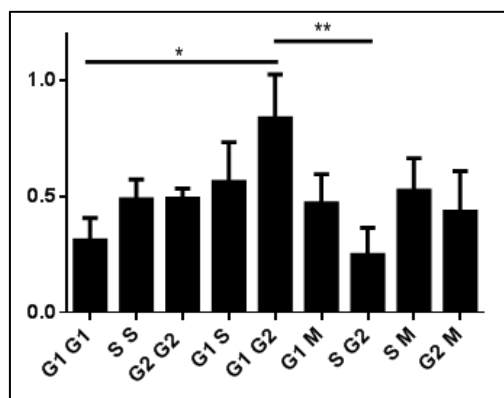


Figure 39 : rB moyen de chaque combinaison.

** p<0,001, * p<0,05.

L'évaluation de la complexité génomique par le calcul du GI montre que ces hybrides présentent une importante hétérogénéité (GI compris entre 4 et 159,2 ; **Figure 40**). Les clones G1-G1 cl5, G1-G1 cl7, G1-S cl 10 et S-G2 cl3 présentent un GI élevé de respectivement 44,3, 80, 150,1 et 159,2. La plupart des GI sont entre 4 et 33,3. L'analyse du GI en fonction des combinaisons ne montre pas de différence significative (**Figure 41**). De plus, nous n'observons pas d'association entre le GI et le type d'altération.

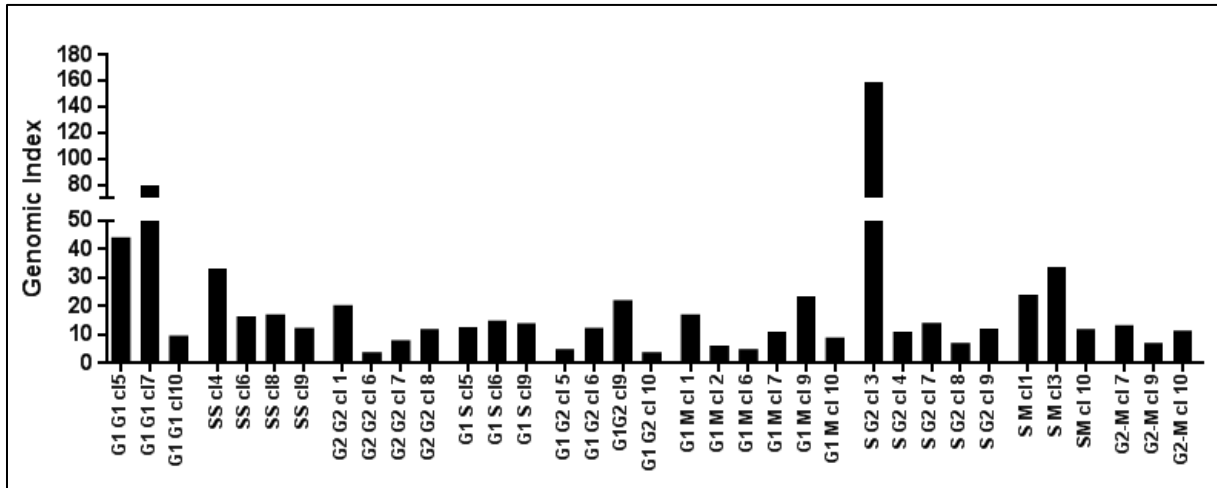


Figure 40 : *Genomic Index* de l'ensemble des clones.

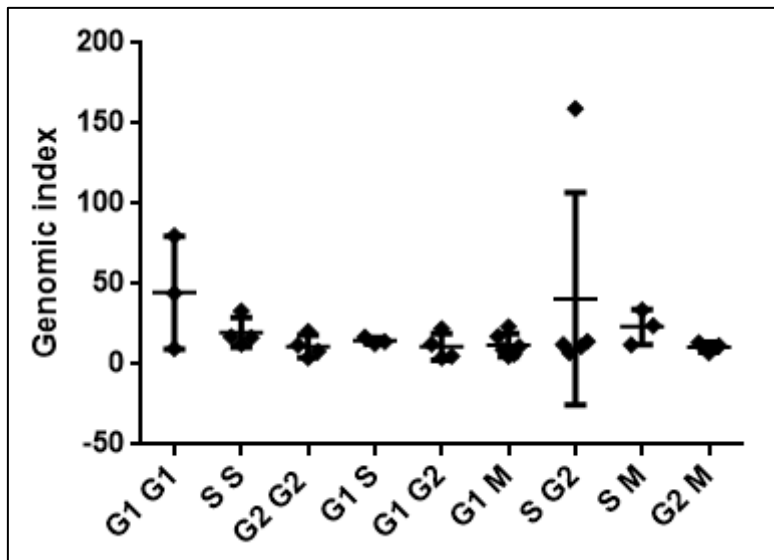


Figure 41 : *Genomic Index* par combinaison.

1.3. Mesure de l'agressivité des hybrides

Les résultats obtenus lors de l'analyse génomique des hybrides montrent que les deux conditions présentant des types d'altérations les plus différentes sont : les G1-G2 et les S-G2. Ces deux types de profils génomiques sont similaires à ceux obtenus dans les sarcomes à « génétique complexe ». Nous avons donc voulu déterminer si, comme dans les tumeurs humaines, la présence de ces mécanismes chromosomiques pourrait être associée à une différence d'agressivité (Chibon *et al.* 2010).

Les lignées parentales, trois clones G1-G2 et trois clones S-G2 ont été injectés en sous-cutané sur le flanc droit de souris NSG (cinq par condition). L'ensemble des lignées permettent un développement tumoral, mais les tumeurs du clone 5 G1-G2 ont une prolifération plus lente comparée à celles des tumeurs de l'ensemble des autres clones et à celles des lignées parentales à partir de 27 jours (test ANOVA, ajustement de Tukey, P value < 0,001 ; **Figure 42 A**). L'ensemble des tumeurs développées sont de haut grade et présentent des similarités histologiques avec les UPS humains.

Des métastases pulmonaires ont été identifiées suite au développement tumoral des clones G1-G2 cl 5 et 9, S-G2 cl 4 et 7 et S-G2 cl 8 (**Figure 42 B**). Seules les tumeurs du clone G1-G1 cl 6 ne permettent pas la formation de métastases. Un animal sur cinq a développé des métastases suite à l'injection des clones 7 et 8 S-G2; deux sur cinq pour le clone G1-G2 cl 9. Les clones G1-G2 cl 5 et S-G2 cl 4 sont les plus agressifs, permettant le développement de métastases dans 80 et 100% des souris respectivement. Il n'apparaît pas de différence significative d'agressivité tumorale entre les clones G1-G2 et S-G2 et cette agressivité n'est pas corrélée avec le GI (**Figure 42 C**).

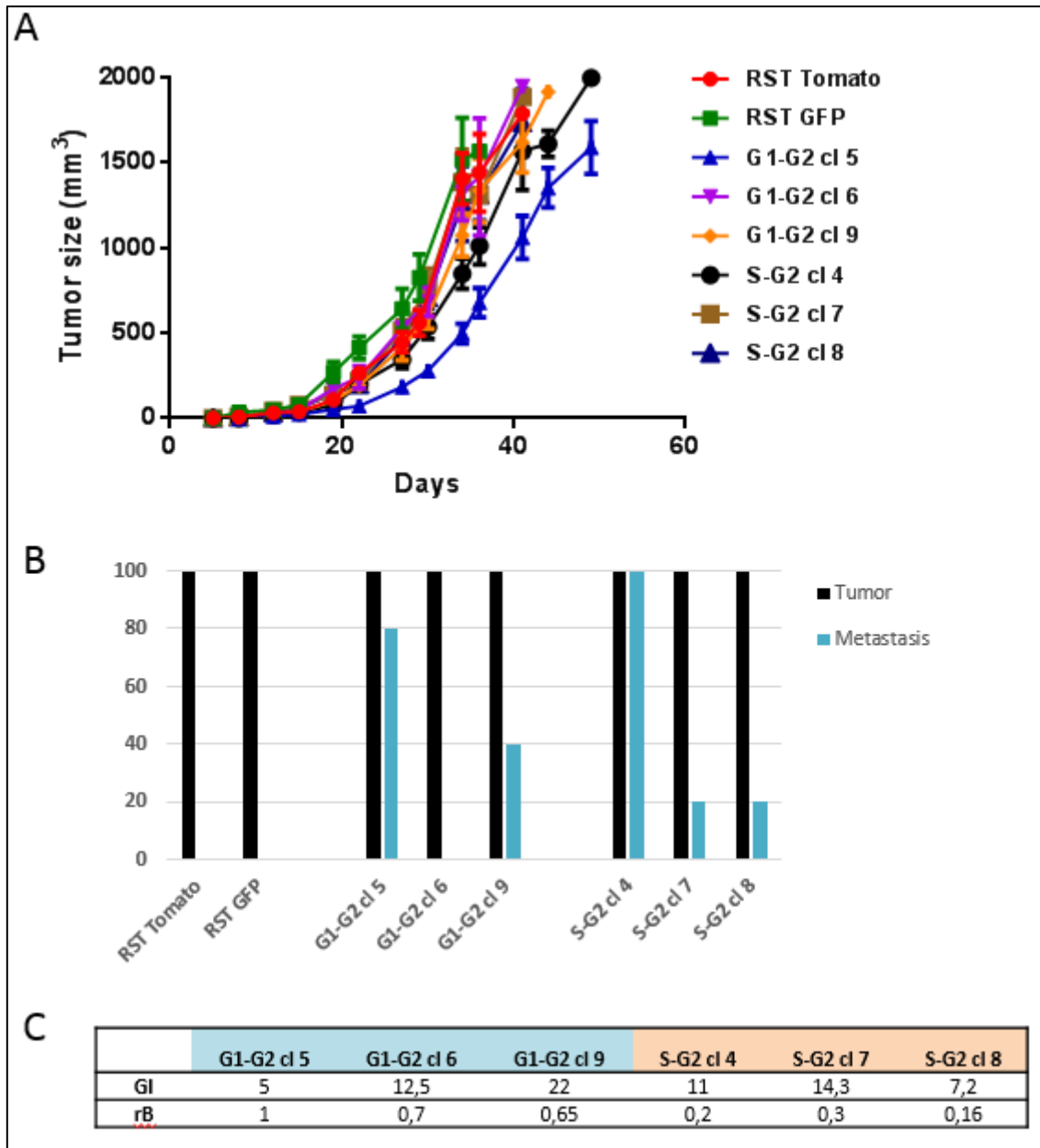


Figure 42 : Expérience *in vivo* des hybrides G1-G2 et S-G2

A/ Courbe de croissance des tumeurs après injection des lignées parentales et des hybrides sur le flanc droit de souris NSG (n = 5). B/ Histogramme du pourcentage de tumeurs et de métastases développés par les lignées parentales et les hybrides. C/ Tableau indiquant le GI et le rB de chaque clone.

2. Conclusion

Dans cette étude, nous avons recherché si la fusion de cellules à différentes phases du cycle pouvait permettre de générer des altérations similaires à celles observées dans les sarcomes à « génétique complexe ». Trois combinaisons se distinguent alors : les fusions G1-G2, présentant des profils à « bras » et les fusions G1-G1 et S-G2, présentant des profils réarrangés.

Les différences observées entre les hybrides G1-G2 et S-G2 pourraient être la conséquence de PCC. Une condensation de la chromatine des cellules G1 et S suite à la fusion avec des cellules G2 n'est observée que lorsque cette dernière est à un stade avancé (Rao and Johnson 1970, 1972). Dans notre étude, la synchronisation des cellules en G2 a été réalisée à l'aide d'un inhibiteur de CDK1, le RO-3306, entraînant un arrêt juste avant la phase mitotique. Les altérations génétiques propres à chaque combinaison pourraient être formées lors de la première mitose, avec la transition « hétérokaryon-synkaryon » et une PCC au niveau des ADN G1 et S. Lors de la fusion G1-G2, la condensation prématurée de chromosomes en phase G1 et un attachement anormal des kinétochores au niveau des centrosomes pourraient conduire à des anomalies de ségrégation et donc aux profils génomiques observés, avec des pertes de chromosomes entiers (Naylor and van Deursen 2016). De plus, des erreurs de ségrégation peuvent induire des altérations chromosomiques au niveau des centromères, avec des pertes ou des gains de bras de chromosomes (Barra and Fachinetti 2018).

Dans les hybrides issus de fusion en phases S et G2, nous observons plus de cassures au niveau péri-centromérique que dans les autres combinaisons. Ces altérations pourraient alors être la conséquence de cassures double-brin. Cependant, alors qu'une pulvérisation importante des chromosomes est décrite suite à la fusion d'une cellule en phase S et d'une cellule en phase G2, les profils génomiques observés ici ne possèdent pas un nombre de réarrangements plus important d'après les analyses du GI (Rao and Johnson 1970, 1972). Dans les travaux de Rao et Johnson, les conséquences génomiques de fusions hétérophasiques sont observées juste après la fusion des cellules, alors que les profils génomiques de notre étude sont réalisés après plusieurs divisions mitotiques. Le devenir des cellules ainsi que la réparation des altérations décrites dans l'article princeps ne sont donc pas évalués.

De plus, les données de CGH-*array* permettent l'identification d'altérations génomiques quantitatives, les altérations équilibrées ne seront pas identifiées.

Les profils génomiques observés dans les hybrides G1-G1 sont en revanche plus surprenants. Alors que les autres combinaisons homophasiques ne présentent pas de prédisposition pour un type d'altération, cette combinaison va conduire à l'émergence d'un profil génomique de type « R ». En phase G1, seul le mécanisme NHEJ permet la réparation de l'ADN (Hillmer *et al.* 2011). Ce système de réparation favorise des réarrangements incorrects et est d'ailleurs impliqué dans la formation de translocations (Bunting *et al.* 2010). Les altérations alors observées dans ces hybrides seraient vraisemblablement la conséquence d'une réparation anormale par le NHEJ.

Ces travaux sont encore préliminaires, il sera donc essentiel de confirmer ces données par d'autres techniques, notamment en observant les conséquences génomiques de ces différentes combinaisons lors de la première mitose et confirmer la présence de PCC. Alors que les données obtenues sur les clones S-G2 et G1-G2 suggèreraient l'implication de ce mécanisme, les deux catégories d'altérations que nous proposons dans cette étude sont basées sur celles identifiées dans les sarcomes à « génétique complexe ». Il est alors indispensable de confirmer que ces deux catégories sont bien la conséquence génomique d'une PCC, d'erreur de ségrégation et de cassure double-brin. Des marquages γ H2AX et des étalements chromosomiques seront alors réalisés sur les fusions G1-G2 et S-G2, juste après la fusion, pour déterminer si la proportion de cassures double-brin est différente entre ces deux combinaisons. Enfin, le séquençage du génome d'hybrides G1-G2 et S-G2 est actuellement en cours d'analyse et nous permettra de déterminer s'il existe un enrichissement en points de cassure dans des régions génomiques particulières, ce qui n'est pas possible avec la résolution des puces à ADN.

Nous faisons l'hypothèse que des mécanismes de réparation de type NHEJ interviennent lors de la fusion entre des cellules en G1. Les mécanismes de réparation pourraient également jouer un rôle important dans la réparation de cassures d'ADN dans d'autres combinaisons. Nous avons pu observer des différences de types d'altérations pour trois combinaisons spécifiques, néanmoins, les autres combinaisons présentent également des altérations génomiques. Les différences observées entre les combinaisons indiquent que dans certaines combinaisons, un type d'altérations serait privilégié. Il

apparaît alors que ces altérations ne sont pas issues uniquement de phases du cycle différentes des deux lignées parentales. Des études chez la levure ont démontré que la tétraploïdie induit une diminution des mécanismes de réparation de l'ADN (Storchová *et al.* 2006). Ceci suggère alors que le cycle cellulaire pourrait influencer un type d'altération, mais que d'autres facteurs participeraient à la formation des anomalies génétiques identifiées dans ces hybrides.

L'étude de la première mitose nous permettrait de comprendre comment sont répartis les deux génomes dans les deux cellules filles. L'étude de Rao and Johnson démontre une PCC lors de fusion entre des cellules interphasiques et des cellules mitotiques, nous faisons par ailleurs l'hypothèse que ces deux fusions conduiraient à des profils génomiques différents (Rao and Johnson 1970, 1972). Or, nos données indiquent que les fusions G1-M et S-M présentent autant d'altérations « R » que « B ». Ceci appuie d'autant plus la nécessité de confirmer si les altérations « R » et « B » sont dues à des anomalies différentes en fonction de la PCC. Il est néanmoins établi que lors de ces deux types de fusion, des défauts des kinétochores au niveau des chromosomes précocement condensés conduisent à des erreurs de ségrégation ou à un non-attachement de ces chromosomes aux fuseaux de microtubules (Rao and Johnson 1972 ; Ghosh and Paweletz 1987). Ceci pourrait alors entraîner une répartition des chromosomes avec une PCC dans une des deux cellules filles, sans intervention du fuseau mitotique. Si l'ensemble des chromosomes G1 et S est réparti dans une seule cellule fille, nous n'observerons pas de différence du contenu génomique entre ces deux combinaisons.

Toutes les combinaisons ont permis l'obtention d'hybrides, hormis la fusion de deux cellules en phase M. Cette fusion serait alors soit non-viable soit la sélection antibiotique réalisée conduirait à la perte de ces cellules. La synchronisation de ces cellules a été réalisée en pro-métaphase par un traitement au nocodazole qui empêche la polymérisation des microtubules. A cette étape, les deux centrosomes sont localisés aux deux pôles et il serait possible que la fusion de deux cellules à cette phase ne permet pas un regroupement des centrosomes surnuméraires et réalise une division multipolaire. Celle-ci ne sera alors pas sélectionnée.

C'est donc l'analyse de cette première mitose qui va être réalisée dans la poursuite de ces travaux.

Le cycle cellulaire peut être à l'origine d'altérations spécifiques en fonction de la phase des deux cellules parentales. Afin de valider nos observations, il serait intéressant de déterminer si une phase du cycle est préférentiellement impliquée dans la fusion cellulaire, ce qui n'est pas établi dans des cellules humaines. Les seules données existantes sur l'implication d'une phase du cycle spécifique dans un mécanisme de fusion sont rapportées chez la drosophile, avec une fusion nécessitant un arrêt en G1/S (Rai *et al.* 2016). Cependant, les cellules étudiées sont des cellules pour lesquelles la fusion est nécessaire à leur différenciation, l'arrêt à ces phases du cycle pourrait alors être indispensable pour accéder à un état différencié non-proliférant. De plus, des mécanismes de PCC ont été observés dans des cellules tumorales (Kovacs 1985). Il semblerait alors que la phase du cycle soit dépendante du type cellulaire, nous ne pouvons alors pas nous baser sur les observations réalisées dans des conditions physiologiques.

Bien que nous ayons observé des réarrangements génomiques similaires à ceux observés dans les deux groupes de sarcomes à « génétique complexe », les différences de profils génomiques ne sont pas associées à une différence d'agressivité (Chibon *et al.* 2010). Nous n'avons analysé dans cette étude que trois clones pour chaque condition, aussi, des différences significatives pourraient être observées avec un nombre supérieur de clones.

De plus, les hybrides étudiés sont obtenus *in vitro*, les altérations générées dans ces cellules ne sont donc pas acquises et sélectionnées comme observées dans les tumeurs humaines. Ainsi, dans le modèle darwinien de l'évolution tumorale, les capacités d'adaptation au microenvironnement et l'acquisition de propriétés avantageuses vont entraîner une sélection clonale au sein de la tumeur. Cette sélection ne serait en revanche pas observée dans nos conditions, pouvant expliquer les différences d'agressivité entre ces différents clones. Néanmoins, l'acquisition de cette capacité semble être associée non pas à un type d'altération génomique spécifique, mais à la formation de cellules hybrides.

C. Etude de la contribution de la fusion dans la progression tumorale

Le rôle le plus étudié de la fusion cellulaire au cours de l'oncogenèse est lors de la progression tumorale. Proposé pour la première fois par Otto Aichel, la contribution de la fusion cellulaire dans l'agressivité tumorale a ensuite été validée *in vitro*, *in vivo* et observée dans des tumeurs humaines (Götz and Goldenberg 1968 ; Rachkovsky *et al.* 1998 ; Sodi *et al.* 1998 ; Pawelek *et al.* 1999 ; Chakraborty *et al.* 2001 ; Goldenberg *et al.* 2012).

Les cellules de sarcomes étant, d'après les premiers travaux de l'équipe, tolérantes à la fusion, ce mécanisme pourrait-il participer à l'évolution de ces tumeurs ? Le modèle de fusion de cellules à différentes phases du cycle a montré que les cellules hybrides pouvaient acquérir des capacités métastatiques. Les différents profils génomiques observés ne sont en revanche pas associés à des différences d'agressivité. Alors que les lignées parentales ne permettent pas le développement de métastases, les hybrides étudiés dans ce modèle présentent une acquisition de capacité métastatique, ce qui ne semble pas être dépendant d'un profil génomique spécifique ni même d'une phase du cycle cellulaire particulière.

Pour confirmer ceci, un modèle de cellules hybrides a été établi, issus de fusion spontanée entre des cellules non synchronisées. Nous avons utilisé deux lignées de fibroblastes comme lignées parentales : la lignée transformée IMR90 E6/E7/HRAS_{G12V}/SmallT/hTERT (précédemment utilisée dans la partie **2.II.B.**) et la lignée immortalisée IMR90 E6/E7 (Hahn *et al.* 1999, 2002 ; Haurie *et al.* 2010). Ces deux lignées ne possèdent pas de capacité de migration et n'ont pas ou peu de réarrangements génomiques.

Ainsi, l'objectif de ce travail était de déterminer si des cellules non-motiles transformées pouvaient acquérir, suite à la fusion cellulaire, des capacités métastatiques, indépendamment d'une phase du cycle, et quelles sont les conséquences génomiques de ces fusions.

Toutes les expériences de cette section ont été réalisées en collaboration avec une post-doctorante de l'équipe, Lydia Lartigue, qui a réalisé l'ensemble des analyses phénotypiques. J'ai réalisé l'ensemble des analyses génomiques de ce modèle.

1. Résultats

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : la lignée transformée IMR90 E6/E7/HRAS_{G12V}/SmallT/hTERT (RST) et la lignée IMR90 E6/E7 (E6E7). Ces deux lignées présentent peu d'altérations génomiques, permettant alors de déterminer si la fusion cellulaire de ces cellules entraîne l'acquisition de nouvelles altérations génomiques. Seule l'injection de la lignée RST dans des souris NSG conduit au développement tumoral mais sans développement de métastase. Enfin, les deux lignées parentales ne possèdent pas de capacité de migration.

1.1. Sélection des hybrides

La lignée transformée RST DsRed+ HygroR a été co-cultivée avec la lignée immortalisée E6E7 CFP+ BlastR (**Figure 43 A**). Au bout de 72h de co-culture, des cellules doublement positives DsRed+/CFP+ sont observées (**Figure 43 B**). Ces cellules doublement positives ont été sélectionnées via leur double résistance antibiotique. Une lignée (C1) et sept clones (C2-C8) d'hybrides ont été obtenus.

Les lignées parentales RST-DsRed et E6E7-CFP possèdent respectivement 46 et 47 chromosomes. Les cellules hybrides ont un seul noyau, il s'agit de synkaryons et ils contiennent entre 74 et 94 chromosomes en moyenne (**Figure 43 C**). A l'exception du clone C2 (94 chromosomes), le nombre de chromosomes des hybrides n'est pas équivalent à la somme des chromosomes des deux parents. Ces hybrides sont pseudo-tétraploïdes.

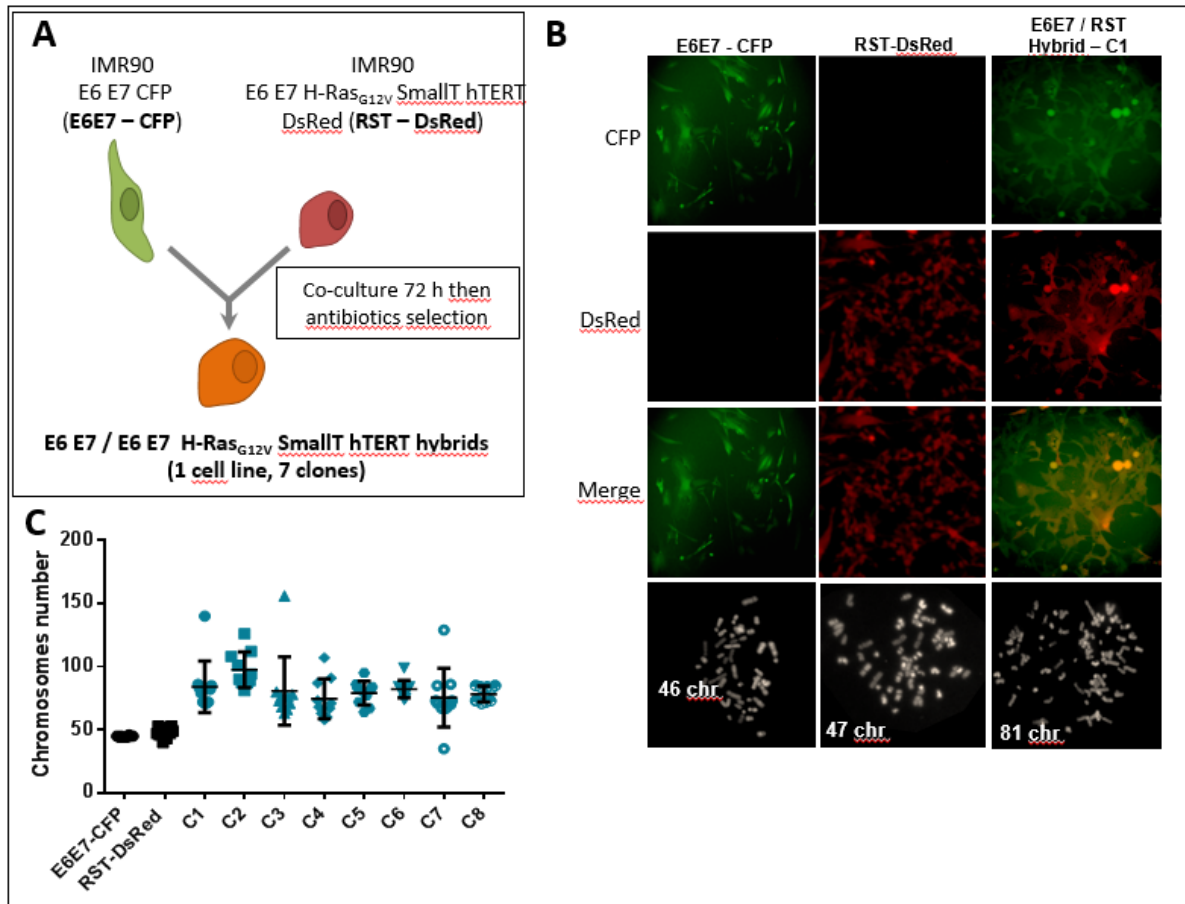


Figure 43 : Formation et caractérisation des hybrides C.

A/ Schéma de l'expérience. B/Fluorescence de la lignée hybride C1 et des lignées parentales ainsi que leurs étalements chromosomiques (exemple donné pour l'hybride C1 mais représentatif de l'ensemble des clones). C/ Nombre moyen de chromosomes des lignées parentales et des hybrides (moyenne sur dix métaphases).

1.2. Caractéristiques génomiques des hybrides

Les cellules parentales ne présentent pas ou peu d'altérations génomiques (Figure 44). En revanche, les profils génomiques des hybrides ont un génome remanié et les altérations identifiées ne sont pas observées dans les lignées parentales. Aucune des nouvelles altérations n'a été identifiée comme récurrente.

Ces altérations sont majoritairement des pertes de matériel génomique. Elles vont être de deux types, soit des pertes de bras chromosomiques ou de chromosomes entiers, soit des altérations à l'intérieur d'un bras chromosomique, indiquant une cassure intra-chromosomique et donc un réarrangement structural. Ces hybrides présentent des anomalies numériques et structurales. La complexité génomique a ensuite été évaluée par le calcul du *Genomic Index* (GI) pour les lignées

parentales et les hybrides (**Figure 45**). Les hybrides présentent un GI entre 27 et 88, ceux des lignées E6E7-CFP et RST-DsRed sont de 5 et 4.5 respectivement.

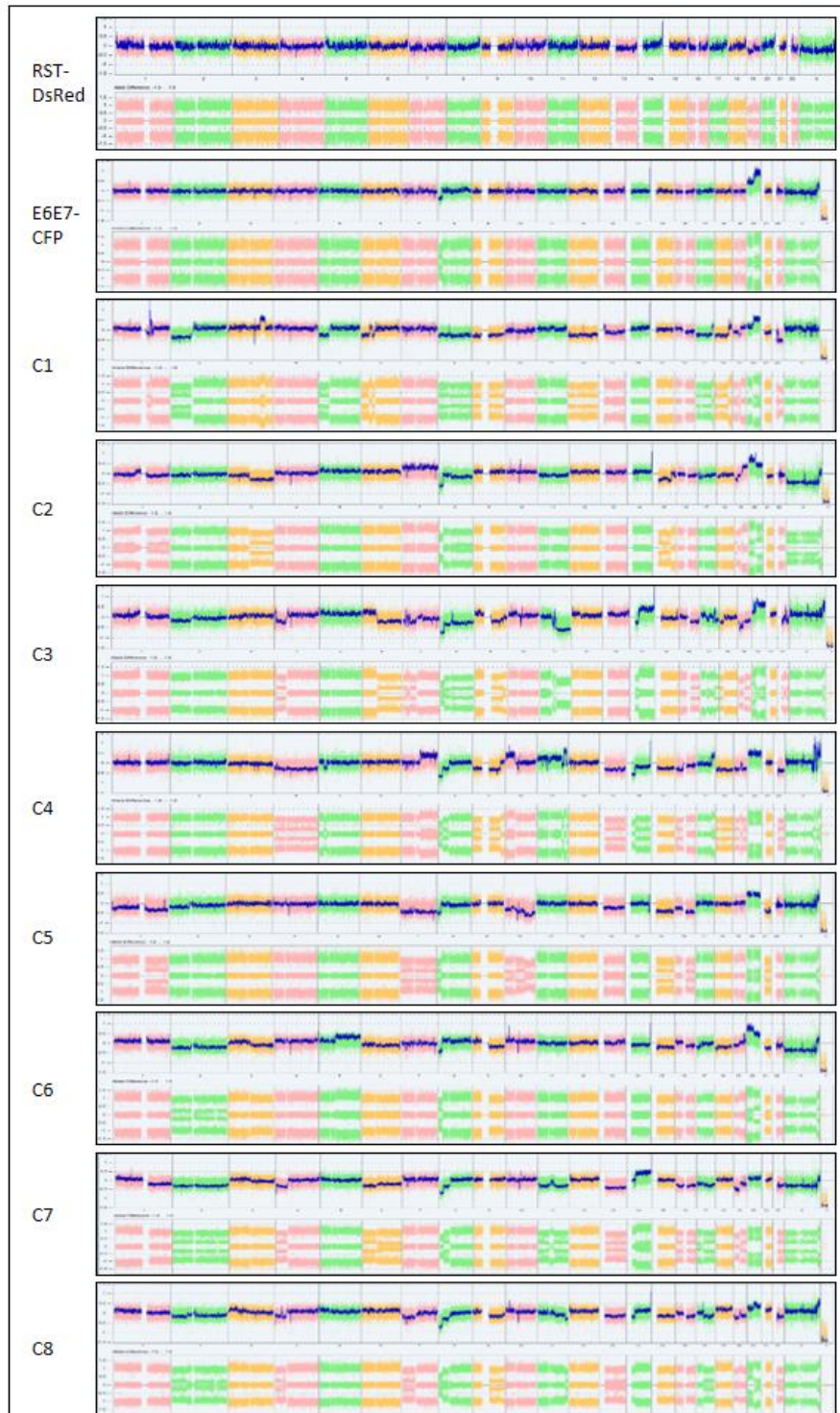


Figure 44 : Profil génomique des lignées parentales E6E7-CFP et RST-DsRed et des hybrides. Profil génomique des lignées parentales et des hybrides. L'axe des abscisses représente les chromosomes de 1 à Y, l'axe des ordonnées indiquent le ratio \log_2 indiquant la quantité d'ADN de la lignée d'intérêt comparé à un ADN de référence. La ligne bleue indique le signal lissé. La différence allélique est représentée dans le panel du dessous pour chaque profil génomique.

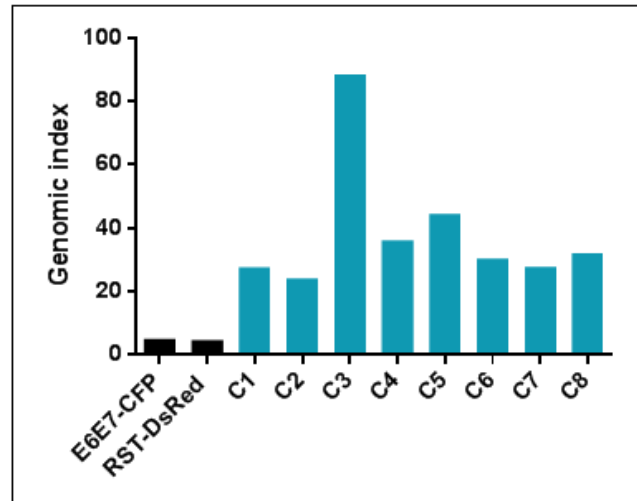


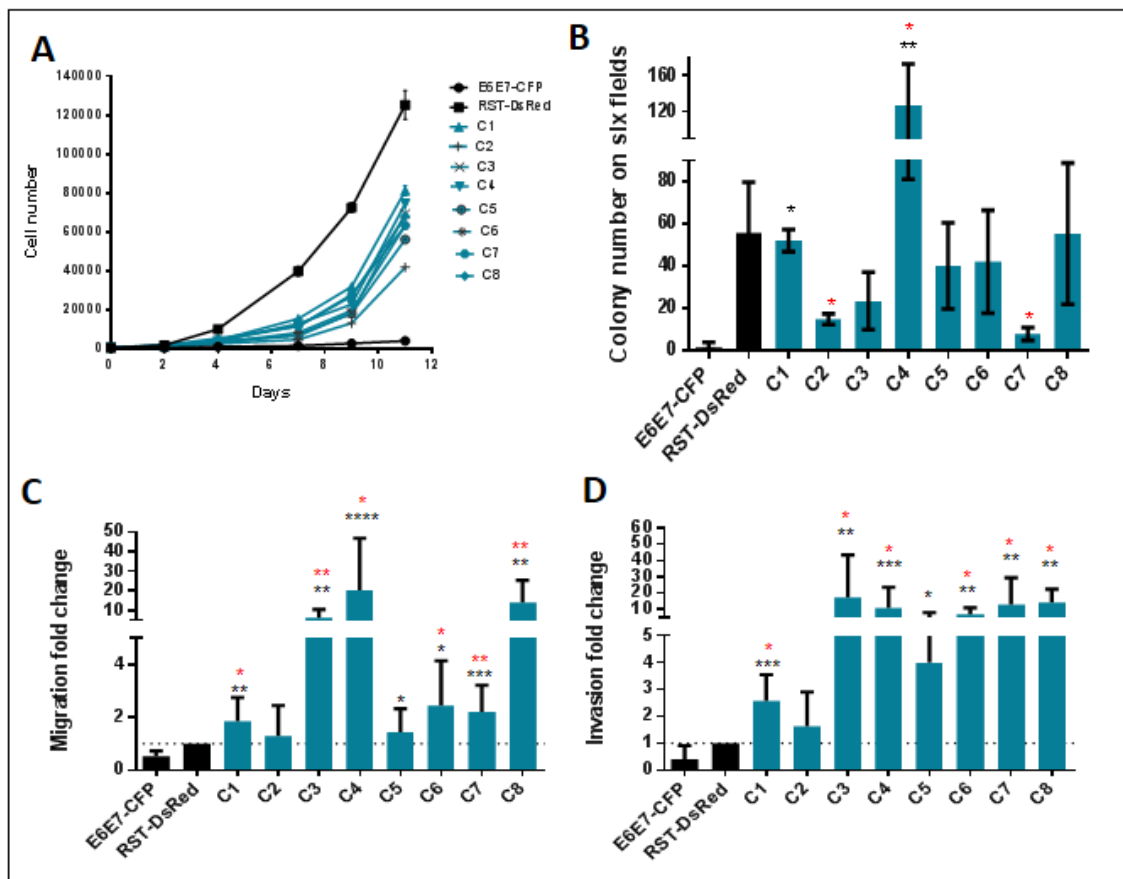
Figure 45 : *Genomic Index* des lignées parentales et des hybrides.

1.3. Acquisition et héritage de propriétés phénotypiques par les hybrides

Nous avons ensuite caractérisé les conséquences de cette fusion sur le phénotype des hybrides afin de déterminer si ces derniers conservaient des capacités oncogéniques.

Le temps de doublement des hybrides est compris entre 35 et 43h, il est de 22h pour la RST-DsRed et est supérieur à six jours pour la lignée E6E7-CFP (**Figure 46 A**). L'ensemble des hybrides présente une vitesse de prolifération intermédiaire vis-à-vis des deux lignées parentales : elle est supérieure à celle des E6E7-CFP et inférieure à celle des RST-DsRed. Les tests de clonogénicité montrent que les hybrides forment en moyenne entre 8 et 127 colonies ; 56 colonies en moyenne sont formées par la lignée parentale RST-DsRed et 2 pour la lignée E6E7-CFP (**Figure 46 B**). Le nombre moyen de colonies pour les hybrides est hétérogène. L'hybride C4 forme significativement plus de colonies que les deux lignées parentales ; le nombre moyen de colonies de l'hybride C1 est uniquement supérieur à celui de la lignée E6E7-CFP alors que celui des hybrides C2 et C7 est inférieur à celui des RST-DsRed. Les hybrides C3, C5, C6 et C8 ne présentent pas de différences significatives comparés aux cellules parentales. Cette capacité ne semble pas être héritée de manière équivalente entre les hybrides : l'hybride C1 l'aurait héritée de la RST-DsRed et les hybrides C2 et C7 de la lignée E6E7-CFP. Une clonogénicité intermédiaire à celles des deux parents est observée pour les hybrides C3, C5, C6 et C8. Seul l'hybride C4 présente des capacités clonogéniques plus importantes comparées à celle des deux cellules parentales. La fusion cellulaire ne conférerait donc pas dans ce modèle d'avantage prolifératif, ni de clonogénicité.

Les cellules tétraploïdes peuvent acquérir des capacités de migration (Jemaà *et al.* 2017), nous avons testé si les hybrides possédaient ces propriétés. La migration des hybrides, rapportée à celle des RST-DsRed, est comprise entre 1,2 et 20 (**Figure 46 C**). Des résultats similaires sont obtenus avec les tests d'invasion : les hybrides ont un « *fold-change* » relatif à celui de la RST-DsRed entre 1,6 et 17 (**Figure 46 D**). A l'exception de l'hybride C2, tous les hybrides présentent une augmentation significative de propriétés de migration et d'invasion.



Les hybrides ont été obtenus à partir de clones isolés suite à une sélection antibiotique. Ces cellules avaient la capacité de proliférer à partir d'un clone unique. Nous voulions déterminer si des clones plus agressifs avaient été sélectionnés, expliquant les différences observées dans les analyses de migration cellulaire. Afin de tester cette hypothèse, une dilution clonale de la RST-DsRed a été réalisée. Deux sous-clones ont été sélectionnés (DL1 et DL2). Au bout de 8h, les RST-DsRed, la DL1 et la DL2 ont rempli respectivement 45, 53 et 47% de la blessure alors que 78% de la brèche est remplie par les cellules hybrides C1 (**Figure 47**). Aucune différence significative n'est observée entre la RST-DsRed et les deux dilutions clonales. Les capacités de migration et d'invasion sont donc acquises suite à la fusion, et ne seraient pas la conséquence de la sélection clonale d'une cellule RST-DsRed agressive.

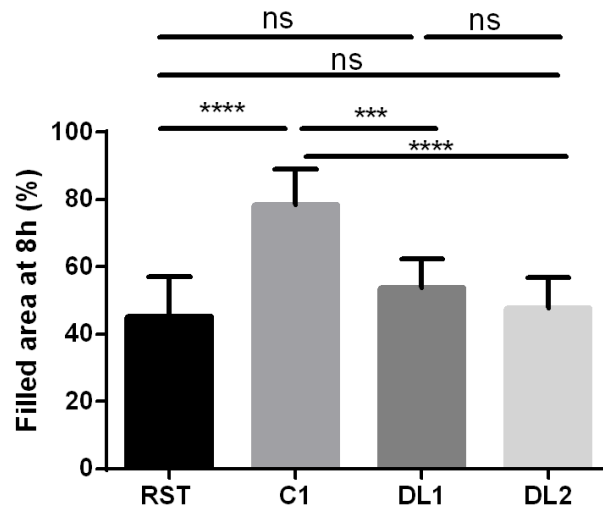


Figure 47 : Test de migration de la lignée parentale RST-DsRed, de l'hybride C1 et de deux dilutions limites de la RST-DsRed (DL1 et DL2).
($P = \text{Kruskal-Wallis}$; $n=3$). **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ns = non-significatif.

1.4. Rôle des hybrides dans la dissémination métastatique

Pour mesurer *in vivo* l'agressivité des hybrides, les lignées parentales et les hybrides ont été greffés en sous-cutané sur le flanc droit de souris NSG (cinq par condition).

La lignée parentale RST-DsRed et les hybrides C1 à C6 et C8 conduisent au développement de tumeurs dans l'ensemble des souris (**Figure 48 A**). En revanche, aucune tumeur ne se développe suite à l'injection de la lignée parentale E6E7-CFP et de l'hybride C7. L'incapacité de l'hybride C7 à induire un développement de tumeur est expliquée par la perte génomique de l'oncogène muté $\text{HRAS}_{\text{G12V}}$ dans ce clone (données non-montrées).

Après 45 jours, les souris sont sacrifiées. Le volume moyen des tumeurs développées suite à l'injection de la RST-DsRed est de $1\,329\text{ mm}^3$, celui des hybrides C2, C3, C5, C6 et C8 est compris entre 43 et $1\,206\text{ mm}^3$. Les tumeurs des hybrides C1 et C4 ont un volume final respectif de $1\,775$ et $1\,732\text{ mm}^3$, une augmentation de la croissance tumorale est observée dans ces tumeurs comparées à celles de la lignée parentale. Les tumeurs de l'hybride C2 se développent au bout de 40 jours alors que les tumeurs des autres hybrides sont détectées dès le jour 10, comme observé pour la lignée RST-DsRed. Hormis pour les hybrides C1 et C4, la prolifération des tumeurs des hybrides est inférieure à celle de la lignée parentale. L'analyse histologique de l'ensemble des tumeurs développées indique qu'elles sont

de haut grade, hautement mitotiques et sont similaires aux sarcomes pléomorphes indifférenciés agressifs humains (**Figure 48 B**).

Les tumeurs des hybrides C1, C3, C4, C5, C6 et C8 vont conduire au développement de sites secondaires dans 20 à 60% des souris (**Figure 48 C**). Aucun site secondaire n'est identifié dans les souris injectées avec la lignée parentale RST-DsRed. L'analyse par immunofluorescence de ces sites secondaires confirme que les cellules tumorales expriment conjointement la DsRed et la CFP ; les hybrides ont acquis des capacités métastatiques (**Figure 48 D**). Ces métastases sont situées au niveau du poumon, du foie, du rein et de l'intestin.

L'analyse des profils génomiques des tumeurs des hybrides montre une acquisition de nouvelles altérations après passage chez la souris, leur profil est cependant très similaire à celui des lignées hybrides injectées (**Figure 49**). Le développement tumoral n'est pas associé à une augmentation du nombre d'altérations génomiques.

Les tumeurs des hybrides sont plus agressives, conduisant au développement de métastases. Le génome de ces tumeurs est peu modifié suite au passage chez la souris. Ces capacités sont en accord avec les données *in vitro*, elles seraient alors acquises précocement. La fusion cellulaire favorise donc la progression tumorale dans ce modèle.

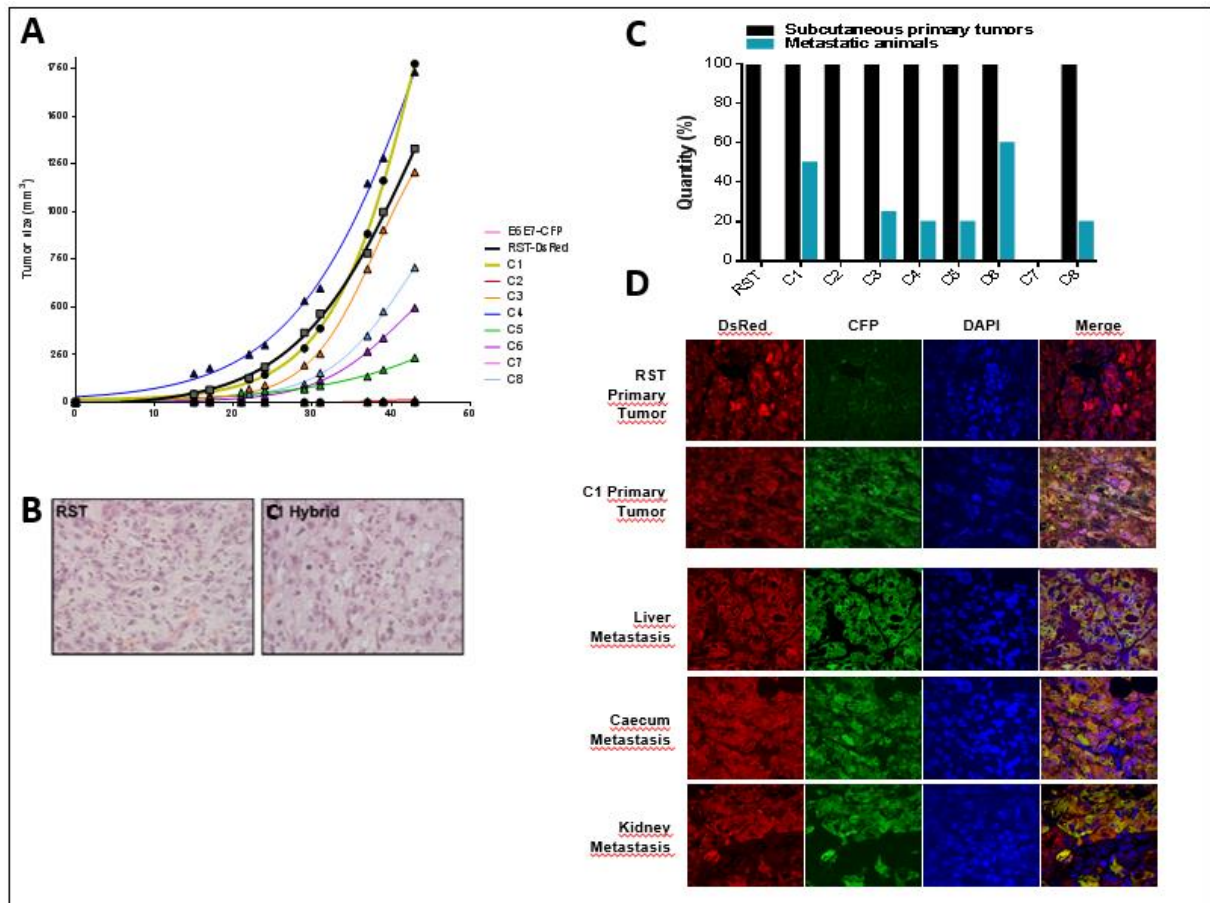


Figure 48 : Développement tumoral et formation de métastases par les hybrides.

A/ Courbe de croissance des tumeurs après injection des lignées parentales et des hybrides sur le flanc droit de souris NSG (n = 5). B/ Marquage HES des tumeurs de la lignée RST et de l'hybride C1. C/ Histogramme du pourcentage de tumeurs et de métastases développées pour la RST-DsRed et les hybrides. D/ Immunofluorescence d'une tumeur de RST-DsRed et d'une tumeur de l'hybride C1, et de métastases développées suite à l'injection de cet hybride.

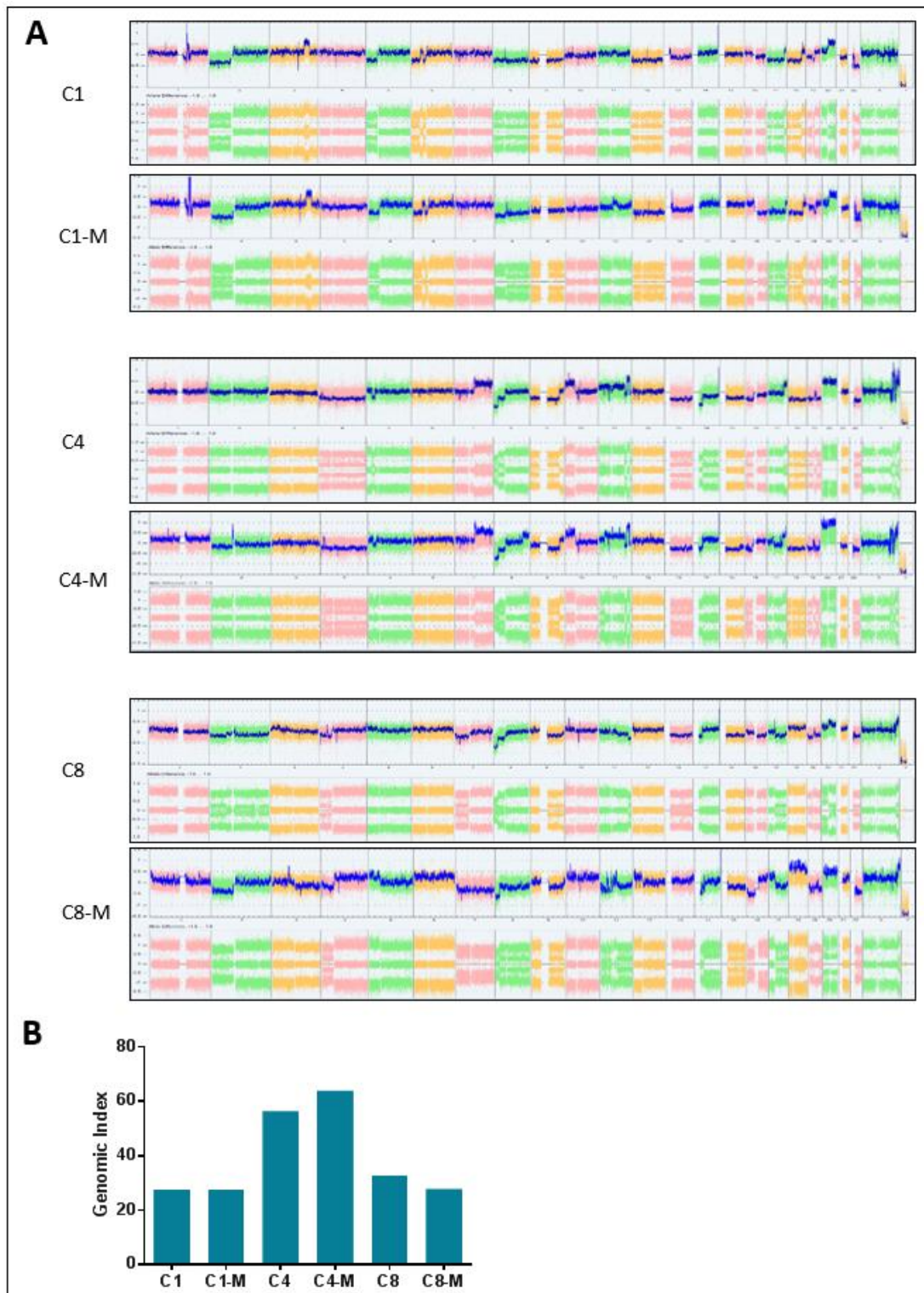


Figure 49 : Profil génomique des hybrides et des tumeurs des hybrides (M).

A/ Profil génomique. L'axe des abscisses représente les chromosomes de 1 à Y, l'axe des ordonnées indiquent le ratio \log_2 indiquant la quantité d'ADN de la lignée d'intérêt comparé à un ADN de référence. La ligne bleue indique le signal lissé. La différence allélique est représentée dans le panel du dessous pour chaque profil génomique. B/ *Genomic Index* des hybrides et des tumeurs des hybrides (M).

1.5. Fusion cellulaire *in vivo*

Afin de valider le rôle de la fusion dans l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe », il était nécessaire d'identifier des hybrides *in vivo*. Pour cela, dix souris NSG ont été injectées avec un mélange des deux lignées parentales, mélange effectué juste avant injection. Tous les animaux ont développé des tumeurs. Les coupes tumorales marquées avec des anticorps dirigés contre la CFP et la DsRed ont alors permis de mettre en évidence un amas de cellules doublement marquées dans la tumeur (Figure 50). Ces résultats indiquent donc que la fusion cellulaire peut s'effectuer localement *in vivo*.

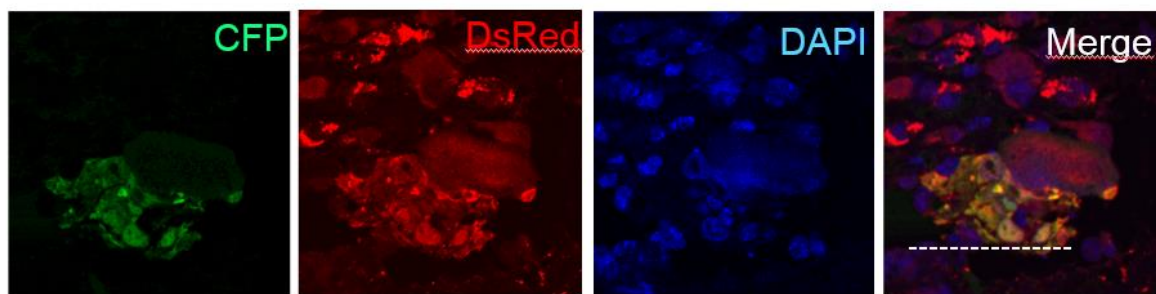


Figure 50 : Immunofluorescence sur coupe de paraffine d'une tumeur issue d'une xénogreffe de RST-DsRED + E6E7-CFP.

2. Conclusion

La contribution de la fusion dans la progression tumorale a été étudiée en générant des hybrides issus de la fusion d'une lignée transformée et d'une lignée immortalisée. Consécutivement à la fusion cellulaire, les hybrides acquièrent des capacités tumorales non-transmises par les cellules parentales, sans nécessité qu'une des deux cellules parentales possède au préalable des capacités de motilité, comme observé dans le modèle de fusion en fonction des phases du cycle.

L'aneuploïdie, observée dans les cellules hybrides, est considérée dans de nombreuses études comme anti-tumoral (Sheltzer *et al.* 2017). Par ailleurs, en comparaison avec la lignée parentale RST-DsRed, les cellules hybrides présentent une prolifération inférieure. La formation de cellules de fusion pourrait alors être considérée comme délétère pour les cellules tumorales, induisant une diminution de la prolifération, une sous-représentation et même une perte de ce clone au sein de la tumeur. Ainsi, est-ce que la fusion cellulaire serait alors avantageuse pour les cellules tumorales ? Les données obtenues *in vitro* semblent assez mitigées : seuls deux clones, C1 et C4, présentent une prolifération tumorale *in vivo* plus importante que celle de la lignée parentale transformée RST-DsRed. Les différences observées entre les données *in vitro* et *in vivo* pour ces deux hybrides peuvent être expliquées par un avantage prolifératif de ces cellules aneuploïdes vis-à-vis des cellules diploïdes dans des conditions expérimentales de stress, comme cela a été décrit dans l'étude de (Rutledge *et al.* 2016). Cependant, le principal avantage des cellules hybrides réside dans leur acquisition de capacités métastatiques, favorisant alors la dissémination des cellules tumorales au niveau de sites secondaires. Ceci serait par ailleurs en accord avec les données de l'étude de Lazova *et al.* en 2015 qui identifie des cellules hybrides au niveau de la métastase d'un patient transplanté atteint d'un mélanome, sans identification de ces cellules dans la tumeur primaire. Les mécanismes de fusion cellulaire s'inscriraient alors dans un processus évolutif, favorisant l'émergence de sous-clones agressifs. Lors du développement tumoral, la fusion d'une cellule tumorale avec une cellule normale pourrait contribuer à l'hétérogénéité intra-tumorale, à la diversité cellulaire au sein d'une même tumeur. Par ailleurs, lors de la co-injection des cellules RST-DsRed et E6E7-CFP, une formation cellulaire DsRed+/CFP+ a été observée, démontrant

que la fusion cellulaire pouvait être observée *in vivo*, et serait alors un évènement favorisant l'hétérogénéité tumorale.

Les hybrides obtenus dans ce modèle présentent des capacités métastatiques. Ceci a été décrit dans de nombreuses études, à la différence que, dans nos travaux, la propriété de motilité n'est pas transmise par une des deux cellules parentales (Aichel 1911 ; Götz and Goldenberg 1968 ; Rachkovsky *et al.* 1998 ; Sodi *et al.* 1998 ; Pawelek *et al.* 1999 ; Chakraborty *et al.* 2001 ; Goldenberg *et al.* 2012). Ici, cette capacité est spécifiquement acquise par les hybrides. Ce nouveau phénotype pourrait avoir différentes origines. Soit celui-ci est une conséquence génétique, soit la fusion cellulaire va modifier la structure de la cellule et la rendre motile. Peu d'études ont démontré l'impact de la tétraploïdisation sur la migration et l'invasion. Toutefois, une étude sur des lignées cellulaires diploïdes et tétraploïdes de sarcomes a établi que la tétraploïdie favorisait la migration cellulaire suite à l'accumulation de protéines mitotique et au remodelage du cytosquelette (Jemaà *et al.* 2017). Lorsqu'elles deviennent invasives, les cellules tumorales vont changer de forme et modifier les adhésions établies avec d'autres cellules voisines, pouvant expliquer les phénotypes observés dans nos hybrides.(Woodham and Machesky 2014).

Les hybrides ont un GI compris entre 27 et 88, leur génome est réarrangé suite à des réarrangements numériques mais également à des altérations structurales. Comparés au premier modèle de fusion spontané dont les résultats sont présentés dans l'**Article 2**, ces hybrides présentent un GI plus important. Le type des cellules parentales à l'origine de ces hybrides pourrait alors expliquer ces différences. Dans les plantes, des mécanismes de fusion, participant à l'évolution phylogénétique, sont observés. Par ailleurs, il est établi que la fusion de deux espèces différentes, appelée fusion allopolyploïde, induit un « choc génomique », avec restructuration importante de leur génome (Lazebnik 2014). Appliquée à un processus tumoral, la fusion d'une cellule du micro-environnement et d'une cellule cancéreuse, dont le génome est modifié et donc divergent, pourrait alors conduire à de nombreux réarrangements génomiques. La tolérance des cellules transformées à l'instabilité génétique pourrait également favoriser le réarrangement du génome dans les cellules hybrides ; des perturbations des mécanismes de réparation de l'ADN ou du contrôle du cycle cellulaire dans les cellules transformées

pourraient participer à l'acquisition de ces altérations et à la tolérance des cellules vis-à-vis de la présence de ces altérations (Wenzel and Singh 2018).

Ces altérations sont par ailleurs stables mais non-récurrentes, les tumeurs issues de ces hybrides ne présentent pas d'anomalies génétiques supplémentaires. A l'inverse du modèle d'initiation tumorale, l'acquisition d'altérations spécifiques n'est pas associée au développement métastatique. Alors que le développement tumoral des premiers hybrides est associé, et est probablement dépendant, de l'acquisition de certaines altérations, la progression tumorale ne l'est pas. Finalement, ce modèle d'hybrides démontre que la fusion cellulaire induit une complexité du génome des hybrides mais également une augmentation de leur agressivité. Ainsi la fusion cellulaire est un mécanisme évolutif, et pourrait alors être un acteur sélectif au cours de l'oncogenèse.

Partie 3 : Discussion générale et perspectives

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont donc permis d'identifier une altération génétique récurrente des sarcomes à « génétique complexe », transversale à plusieurs types histologiques. Alors que la recherche des altérations génétiques *drivers* fortes et récurrentes associées à leur développement est apparue comme infructueuse, l'étude de leur complexité génomique permet d'apporter un nouveau regard sur leur oncogénèse. Nous décrivons ainsi dans ce manuscrit, un mécanisme, la fusion cellulaire, qui permet pour la première fois de mimer la génomique ainsi que les caractéristiques cliniques et pathologiques des sarcomes à « génétique complexe ». Ce mécanisme cellulaire de déstabilisation du génome est un évènement évolutif, décrit dans de nombreuses études. Ces travaux permettent d'associer cet évènement au développement des sarcomes à « génétique complexe », mais également de caractériser les altérations génomiques observées dans les cellules hybrides.

Le modèle que nous proposons alors est que la complexité génomique de ces tumeurs serait l'oncogène de ces tumeurs. L'identification du mécanisme initiateur de cette instabilité, comme l'identification d'évènements de fusion cellulaire dans ces tumeurs, pourrait alors conduire à une meilleure compréhension de la biologie de ces tumeurs qui reste encore incertaine.

I. LES SARCOMES A « GENETIQUE COMPLEXE » : LE GENOME REMANIE COMME ALTERATION RECURRENTE

A. Les transcrits chimériques atypiques des sarcomes à « génétique complexe »

1. Gènes de fusion privés

Les gènes de fusion *TRIO* sont récurrents et spécifiques des sarcomes à « génétique complexe », néanmoins ils ne sont pas associés à un sous-type histologique précis. C'est d'ailleurs le cas pour l'ensemble des autres gènes de fusion identifiés. Alors que ces tumeurs expriment en moyenne 16 transcrits chimériques par échantillon (à l'exception des DDLPS), ces transcrits chimériques restent privés, c'est-à-dire exclusivement identifiés dans une seule tumeur. Ces gènes de fusion sont localisés au niveau de régions chromosomiques présentant une instabilité focale récurrente, ils sont donc issus de l'instabilité du génome de ces tumeurs. Ces altérations pourraient être considérées comme des « dommages collatéraux » de cette instabilité. Le dogme classique de l'oncogenèse attribue à des altérations non-récurrentes un rôle de *passenger*, ce qui mettrait en doute l'implication de ces transcrits dans l'oncogenèse. Cependant, ce dogme tend à être révisé, la contribution à l'oncogenèse d'une altération pourrait ne pas être associée à sa récurrence mais plutôt à sa fonction. Cette nouvelle vision de l'oncogenèse redéfinit ainsi ce qu'est une altération *driver* et expliquerait le développement de tumeurs non-associées à une altération spécifique. Par ailleurs, une étude récente a démontré le rôle oncogénique d'un gène de fusion privé, *SLC37A3-BRAF*, identifié dans un MFS (Ogura *et al.* 2018). Ce gène de fusion entraîne une surexpression du gène codant pour la protéine kinase BRAF et son introduction dans des lignées murines NIH3T3 induit la transformation de ces cellules. Ainsi, le rôle de ces gènes de fusion privés dépend de leur fonction, du rôle dans l'oncogenèse des gènes impliqués dans ces fusions et non pas de leur récurrence.

Dans notre étude nous avons étudié les récurrences de ces gènes de fusion, mais nous n'avons pas analysé si des fonctions cellulaires pouvaient être altérées de manière récurrente. Ce type d'analyse

commence par ailleurs à émerger dans la littérature. Dans une étude récente, qui a investigué 25 664 gènes de fusion identifiés dans 9 624 tumeurs, les gènes de fusion ont été catégorisés suivant le rôle dans l'oncogenèse de chacun des deux partenaires décrit dans la littérature (Gao *et al.* 2018). En étudiant notamment les transcrits chimériques impliquant des protéines kinases, partageant une fonction commune, ils ont pu observer un nombre plus important de gènes de fusion impliquant des tyrosines kinases dans les carcinomes de la thyroïde. Appliqué aux sarcomes à « génétique complexe », ce type d'analyse pourrait alors permettre d'identifier des voies de signalisation ou des fonctions spécifiques induites par des gènes de fusion privés, et donc de mettre en évidence des processus indispensables à leur tumorigenèse.

2. Transcrits chimériques sans conservation du cadre de lecture

La principale particularité des transcrits chimériques identifiés dans les sarcomes à « génétique complexe » est que 88% d'entre eux ne conservent pas le cadre de lecture. Ce pourcentage est variable en fonction du type tumoral (Yoshihara *et al.* 2015). Dans cette étude, les auteurs décrivent deux catégories de tumeurs. La première catégorie regroupe les tumeurs dont le développement est associé à un gène de fusion : leur génome est peu remanié, elles possèdent peu de transcrits chimériques et ces transcrits conservent le cadre de lecture des deux partenaires. La deuxième catégorie représente des tumeurs possédant un génome hautement remanié, avec un nombre plus élevé de transcrits chimériques par échantillon, ces transcrits ne conservent pas le cadre de lecture des deux gènes dans la majorité des cas. Ainsi, l'origine et les conséquences de ces gènes de fusion sont distinctes dans ces deux catégories. Dans la première, un réarrangement spécifique, probablement unique, va entraîner la formation d'une altération spécifique et un message oncogénique fort. Dans la seconde catégorie, ces altérations sont la conséquence de l'instabilité du génome, de sa restructuration. Cette instabilité va donc être à l'origine d'un large panel de gènes de fusion, comme observé dans les sarcomes à « génétique complexe ».

En prenant l'exemple des sarcomes, les gènes de fusion des sarcomes à « génétique simple » sont des *drivers* forts de l'oncogenèse, conservant le cadre de lecture et sont souvent les seules altérations récurrentes de ces tumeurs (Mertens *et al.* 2016). Ces gènes de fusion définissent un profil transcriptomique spécifique, reflétant la contribution majeure de ces altérations dans le développement de ces tumeurs (Segal *et al.* 2003 ; Baird *et al.* 2005 ; Pierron *et al.* 2012 ; Watson *et al.* 2018). Bien que l'origine de ces réarrangements soit inconnue, le réarrangement unique d'une région génomique d'intérêt serait alors suffisant pour conduire à leur oncogenèse. A l'inverse, les gènes de fusion des sarcomes à « génétique complexe » sont associés à la restructuration de leur génome, les régions génomiques ayant une instabilité focale présentent plus de gènes de fusion. Ces gènes de fusion sont non-récurrents et conduisent dans la majorité des cas à des gènes tronqués.

Dans les sarcomes à « génétique complexe », ces gènes de fusion vont avoir deux conséquences : soit former une nouvelle isoforme, soit inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé d'autres travaux démontrant que les suppresseurs de tumeurs *TP53*, *RBI* et *ATRX* étaient impliqués dans des transcrits chimériques avec un rôle « perte de fonction ». Le rôle majeur des transcrits chimériques de ces tumeurs est d'ailleurs d'inactiver des suppresseurs de tumeurs, comme observé dans les tumeurs de la prostate (Mao *et al.* 2011). A l'inverse des gènes de fusion oncogéniques des sarcomes à « génétique simple », ces transcrits chimériques vont inactiver les gènes qui restreignent l'oncogenèse.

Les conséquences des réarrangements structuraux des deux groupes de sarcomes sont donc différentes et indiqueraient que ces tumeurs accèdent à l'oncogenèse par des moyens différents.

B. Vers une nouvelle compréhension de l'oncogenèse des sarcomes ?

1. Conséquence des altérations génomiques ?

L'étude des autres types d'altérations, les mutations ponctuelles et les altérations chromosomiques numériques, a conduit à une observation identique à celle de nos travaux : l'absence d'altération spécifique et récurrente en fonction du type histologique et d'une oncogenèse spécifique

pour ces sarcomes (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Il n'existerait donc pas d'altération *driver* forte et spécifique pour ces tumeurs, ni même de profil d'expression distinct (Gibault *et al.* 2011).

En combinant nos résultats et les résultats obtenus dans l'étude du TCGA de ces sarcomes, il apparaît que ces altérations vont conduire à une conséquence commune qui est l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les principales altérations des sarcomes à « génétique complexe » (hormis pour les DDLPS) sont des délétions, des mutations inactivatrices et des gènes de fusion tronquants (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Le développement des sarcomes à « génétique complexe » se baserait ainsi sur la levée des barrières qui restreignent la tumorigénèse plutôt que sur l'acquisition d'oncogènes qui propulserait la transformation tumorale. Ces altérations ne sont pas activatrices de l'oncogénèse, mais elles permettraient de rendre les cellules permissives à un processus tumoral. Ceci définit un modèle atypique d'évolution, qui ne serait pas dépendant d'une oncogénèse dirigée. La perte de ces suppresseurs de tumeurs favoriserait la plasticité cellulaire, permettant aux cellules d'exprimer un message oncogénique suivant différentes voies, et donc suivant différents phénotypes.

Ce mode d'oncogénèse peut également expliquer le manque de récurrence d'altérations. A l'inverse d'une mutation activatrice qui est restreinte à une position donnée et à une substitution très spécifique, les conséquences d'une mutation inactivatrice, d'une délétion ou d'un réarrangement structural peuvent être les mêmes. L'inactivation d'un gène n'est pas restreinte à un type d'altération spécifique. Cette hypothèse est par ailleurs supportée par le séquençage de 200 leucémies myéloïdes aiguës où 42 gènes de fusion sans conservation du cadre de lecture ont été identifiés, créant des protéines tronquées ou bien une haplo-insuffisance des deux partenaires (Cancer Genome Atlas Research Network 2013b). La plupart de ces gènes était également altérée par mutation ponctuelle ou par translocation avec un autre partenaire. La compréhension de l'oncogénèse des sarcomes à « génétique complexe » ne sera alors possible que suite à l'analyse combinée de l'ensemble des réarrangements génomiques, et par l'analyse globale de leur génome.

2. Une oncogenèse privée ?

Le développement tumoral est précédé par l'acquisition d'altérations génétiques contribuant à l'oncogenèse (Armitage and Doll 1954 ; Fearon and Vogelstein 1990 ; Martincorena *et al.* 2017). Dans certains types tumoraux, cette combinaison mutationnelle est retrouvée dans l'ensemble des tumeurs d'un même type histologique, cette combinaison est alors la signature génétique de leur développement. Cependant, ce modèle de développement tumoral ne semble pas s'appliquer aux sarcomes pléomorphes. L'absence d'altération spécifique indique alors que les sarcomes à « génétique complexe » possèdent un ensemble d'altérations unique à chaque tumeur, ayant ainsi un profil génétique privé.

Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que le développement de ces tumeurs est alors la conséquence d'une combinaison variable d'altérations. Leur oncogenèse ne serait ainsi pas restreinte à un processus évolutif spécifique, mais serait alors accessible par différents « chemins » génétiques. Ceci est par ailleurs soutenu par les données génomiques et transcriptomiques de ces tumeurs (Gibault *et al.* 2011 ; Taylor *et al.* 2011 ; Cancer Genome Atlas Research Network. 2017).

Par conséquent, l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe » ne peut pas être intégralement comprise en identifiant uniquement les altérations récurrentes. Cette compréhension doit se faire en utilisant de nouveaux outils, de nouveaux concepts. L'analyse des voies de signalisation altérées, de la fonction des altérations ou encore des mécanismes nécessaires à leur oncogenèse pourraient alors être étudiés. Bien que les altérations génétiques observées dans ces tumeurs soient variées, ces altérations pourraient partager des fonctions communes. Ainsi, plusieurs altérations dérégulant une voie biologique à différents niveaux et entraînant des conséquences similaires pourraient être impliquées dans une oncogenèse commune, comme observé lors de l'inactivation de la voie pRb dans les MFS consécutive à des pertes d'expression de *RBI*, de *CDKN2A/CDKN2B* ou à une surexpression de *CCND1* (Ogura *et al.* 2018).

L'hypothèse d'une oncogenèse privée est aussi supportée par les caractéristiques cliniques de ces tumeurs pour lesquelles il n'existe encore aujourd'hui aucune thérapie ayant un meilleur impact pronostic que la chirurgie (Casali *et al.* 2018). A l'inverse, des traitements de référence ont pu être mis

au point pour plusieurs sous-types histologiques de sarcomes « à génétique simple » (comme l'imatinib dans les GIST où la radio-sensibilité des liposarcomes myxoïdes). Une partie de la résistance aux traitements des sarcomes pléomorphes pourraient ainsi passer par l'absence d'un levier thérapeutique actionnable. Ainsi, si des traitements peuvent fonctionner sur certaines tumeurs qui inactivent des voies communes, ces traitements ne seraient adaptés sur d'autres de même sous-type histologique car l'oncogénèse proviendrait d'une autre source.

3. Types d'altérations chromosomiques spécifiques ?

Lors de l'analyse des transcrits chimériques dans le groupe de sarcomes à « génétique complexe », deux comportements génomiques distincts ont été identifiés : soit un grand nombre de transcrit chimériques dans les DDLPS, soit un nombre plus restreint dans les autres types histologiques. De plus, l'analyse des altérations numériques de ces différentes tumeurs montre des profils génomiques distincts. Ces deux groupes possèdent une instabilité chromosomique différente.

3.1. Les DDLPS : des sarcomes à « génétique complexe » indépendants

Le génome des DDLPS se distingue de celui des autres types histologiques de sarcomes à « génétique complexe ». Leur génome est caractérisé par des amplifications récurrentes au niveau des chromosomes 1, 6 et 12, induisant une surexpression des oncogènes *JUN*, *ASK1* et *MDM2* ; celles-ci vont conduire, dues à leur origine chromothriptique, à la formation de nombreux gènes de fusion (Pedeutour *et al.* 1994 ; Pilotti *et al.* 1998 ; Chibon *et al.* 2004 ; Mariani *et al.* 2007 ; Garsed *et al.* 2014; voir partie **1.II.B.2.2.3**).

Alors que l'évolution tumorale des sarcomes est associée à une instabilité chromosomique, celle-ci aurait une origine distincte entre les DDLPS et les autres types histologiques. Dans les DDLPS, cette instabilité génétique va conduire à la formation des altérations structurales situées au niveau de régions chromosomiques spécifiques. Ces altérations sont activatrices, permettant la surexpression

d'oncogènes ; leur oncogénèse est ciblée, à la fois par l'activation de gènes spécifiques mais également par le type d'altération. Alors que les DDLPS appartiennent au groupe des sarcomes à « génétique complexe », leur oncogénèse semble plus similaire à celle des sarcomes à « génétique simple ». En effet, l'association entre un type histologique et un oncogène cible et récurrent, qui permet par ailleurs le diagnostic de ces tumeurs, correspond à ce qui est observée dans les sarcomes associés à une translocation ou à une mutation récurrente. Cependant, l'analyse de leur profil d'expression ne conduit pas à la séparation de ce type de tumeurs vis-à-vis des autres types histologiques de sarcomes à « génétique complexe » (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Bien que les DDLPS possèdent des altérations récurrentes, celles-ci ne conduisent pas à un profil d'expression particulier, suggérant alors que l'instabilité génétique de ces tumeurs joue également un rôle important dans leur oncogénèse. Cette instabilité chromosomique est basée sur la modification de la structure des chromosomes.

Le nombre important de gènes de fusion des DDLPS pourrait avoir un impact sur le système immunitaire (Schumacher and Hacohen 2016). Dans les cellules cancéreuses, des protéines mutées peuvent former des peptides, appelés néo-antigènes, présentés à la surface des cellules tumorales et reconnus par le système immunitaire, notamment par les lymphocytes T. Dans les tumeurs de l'endomètre, un haut niveau de néo-antigènes est associé à un infiltrat important de lymphocytes CD8+ (Howitt *et al.* 2015). De manière intéressante, les DDLPS présentent également un nombre important de ce type d'infiltrat immunitaire (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Afin d'échapper à ce système immunitaire, les cellules tumorales expriment des inhibiteurs empêchant l'activation d'une réaction immunitaire. L'immunothérapie, permettant la levée de cette inhibition, étant très prometteuse dans le traitement de certains cancers, nous pouvons donc imaginer que celle-ci serait efficace dans le traitement des DDLPS.

3.2. L'aneuploïdie comme altération majeure ?

Alors que la restructuration du génome est la principale altération des DDLPS, celle des autres types histologiques est l'aneuploïdie. Les conséquences de cette anomalie génomique sont variées,

permettant notamment une modification du nombre de copies de gènes d'intérêt (Tang *et al.* 2011 ; Santaguida *et al.* 2015 ; Schukken and Foijer 2018). Dans ces sarcomes à « génétique complexe », ces variations du nombre de copies touchent de larges régions chromosomiques, suggérant alors que ces altérations ne vont pas uniquement modifier le nombre de copies d'un gène cible, mais bien l'ensemble des gènes de cette région.

Dans un modèle où l'aneuploïdie est l'altération majeure et où l'ensemble des tumeurs présentent des anomalies génétiques privées, une accumulation de réarrangements numériques pourrait favoriser l'oncogénèse. Le rôle de cette accumulation a été proposé dans l'étude de Davoli *et al.* en 2013, où les auteurs suggèrent un effet cumulatif d'haplo-insuffisance et de triplosensibilité des régions génomiques altérées. Ces altérations permettraient de modifier l'expression de plusieurs gènes cibles, ce qui pourrait expliquer l'absence d'altération spécifique et ciblée. De plus, selon ce modèle, les cellules tumorales pourraient acquérir des capacités oncogéniques par la modification d'expression de plusieurs *drivers* de faible capacité oncogénique, se substituant alors à l'activation d'un oncogène fort. Ce modèle permettrait alors d'expliquer comment ces tumeurs accèdent à l'oncogénèse.

Les altérations récurrentes des sarcomes à « génétique complexe » sont les pertes des chromosomes 10, 13, 16 et 17 ainsi que le gain du chromosome 1 (Guillou and Aurias 2010). Ces altérations vont permettre la dérégulation de gènes cibles, comme *RBI* avec la perte du chromosome 13 ou encore *PTEN* avec la perte du chromosome 10 (Chibon *et al.* 2000 ; Derré *et al.* 2001 ; Gordon *et al.* 2003). Ces altérations ne sont pas focales, elles vont concerner de grandes régions génomiques, avec des points de cassure différents selon les tumeurs. Aussi, le rôle de ces altérations pourrait être beaucoup plus large, ne ciblant pas uniquement un gène cible mais bien l'ensemble des gènes de cette région. Ceci expliquerait alors pourquoi le développement de ces tumeurs est associé à des modifications du nombre de leurs chromosomes, et non pas à des mutations ponctuelles ou à des altérations restreintes au niveau de gènes cibles.

4. Autres altérations ?

D'autres altérations ont été identifiées dans les sarcomes à « génétique simple », comme des juxtaposition de régions activatrices et d'oncogènes, mais ces dernières ne seront pas détectées par une analyse transcriptomique de type RNA-seq (Mertens *et al.* 2016). Par ailleurs, les gènes codant des protéines ne représentent que 2% du génome humain. Le reste du génome va comporter des séquences régulatrices ou bien des séquences permettant la transcription d'ARN non-codants (Alexander *et al.* 2010). Ces régions peuvent alors porter des altérations qui vont également participer à l'oncogenèse. Des altérations au niveau des séquences de *miRNA*, de *lncRNA*, de régions promotrices ou encore de régions d'épissage peuvent contribuer à l'oncogenèse (Diederichs *et al.* 2016). Le séquençage du génome complet de ces tumeurs pourrait alors apporter un nouveau regard sur leur oncogenèse.

C. Le remaniement du génome comme oncogène ?

1. La complexité génomique comme altération spécifique ?

A ce jour, la principale récurrence génétique identifiée dans ces tumeurs est une restructuration globale de leur génome. Cette complexité pourrait même être considérée comme leur spécificité : leurs génomes étant les plus remaniés parmi l'ensemble des génomes tumoraux étudiés (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). Nous pouvons alors proposer un modèle dans lequel la restructuration de leur génome est l'altération *driver* de leur oncogenèse et même, un évènement initiateur. A des stades précoces de l'oncogenèse, un remaniement totale de leur génome expliquerait d'ailleurs l'absence d'altération *driver* forte associée à leur développement. Dans ce modèle tumoral, le *driver* fort serait le remaniement du génome, qui permettrait d'acquérir les anomalies génétiques participant à l'oncogenèse. Ce modèle implique alors que les cellules tumorales d'un même type histologique possèderaient des génomes divergents, et donc une importante hétérogénéité inter-tumorale d'un point de vue génétique et transcriptomique. Cette complexité génomique serait alors l'altération essentielle de leur oncogenèse et permettrait d'expliquer l'ensemble des données génomiques et transcriptomiques acquises concernant les sarcomes à « génétique complexe ».

Cependant, l'instabilité génétique dans une cellule normale n'est pas tolérée, conduisant à l'activation de voies de signalisation permettant le maintien de l'intégrité du génome. Ceci pourrait alors expliquer pourquoi les voies p53 et pRb sont systématiquement inactivées dans ces tumeurs (Chibon *et al.* 2000; Pérot *et al.* 2010). Ces inactivations rendraient les cellules tolérantes à l'instabilité génétique et les tumeurs aneuploïdes ont d'ailleurs une altération « perte de fonction » de p53 (Ciriello *et al.* 2013). Alors que l'inactivation de ces deux gènes/voies est essentielle pour le développement de ces tumeurs, ils ne vont pas être à l'origine de cette instabilité génétique, comme observé dans les modèles murins (Lin *et al.* 2009). Ces altérations, soit antérieures soit directement issues du réarrangement du génome de ces tumeurs, seraient alors nécessaires pour la tolérance à cette instabilité.

La complexité génomique est identifiée dans l'ensemble de ces tumeurs, cependant elle n'est pas spécifique d'un type histologique et donc d'une différenciation tumorale donnée. Cette complexité ne serait par conséquent pas à l'origine de cette différenciation. La ligne de différenciation de ces tumeurs pourrait alors être guidée par celle de la cellule d'origine. Ceci a d'ailleurs été observé dans des modèles de tumeurs rhabdoïdes, où l'inactivation de SMARCB1 permet le développement de ce type de tumeurs que si elle a lieu dans des cellules spécifiques (Han *et al.* 2016). Ainsi, la restructuration de ces génomes pourrait conduire à différents types tumoraux, en fonction du type de cellules originelles.

2. Quelle est l'origine de cette instabilité ?

L'origine de cette déstabilisation génomique reste cependant encore inconnue. Des altérations des voies de maintenance de l'intégrité chromosomique, comme celles de réparation de l'ADN ou de la ségrégation chromosomique, pourraient expliquer cette instabilité. Il a d'ailleurs été identifié que la présence de variants pathogéniques du gène *BRCA2*, impliqué dans la réparation de cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue, prédispose au développement de sarcomes (Ballinger *et al.* 2016). Une perte de ce gène conduit à une déficience de réparation par recombinaison homologue des cassures double-brin et favorise l'instabilité chromosomique (Patel *et al.* 1998). Cependant, une

altération dans ces voies de maintien de l'intégrité chromosomique n'a pas été identifiée de manière récurrente et spécifique dans ces tumeurs (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017).

La moitié des génomes des sarcomes à « génétique complexe » a doublé son contenu chromosomique (Cancer Genome Atlas Research Network. 2017). La tétraploïdisation pourrait être un évènement initiateur de cette instabilité. En effet, de nombreuses évidences indiquent que la tétraploïdisation est un évènement précoce de l'oncogenèse (Gerlinger *et al.* 2014). Cet état favorise l'aneuploïdie, notamment par des pertes du nombre de copies et est observé dans les cancers colorectaux (Dewhurst *et al.* 2014). De plus, la tétraploïdie permet de générer et de tolérer l'instabilité génétique. Selon les modèles d'évolution tumorale, le doublement du génome est un évènement ponctuel, permettant l'acquisition en une seule étape de nombreuses altérations génomiques (Gerlinger *et al.* 2014). Dans un modèle tumoral dans lequel le remaniement du génome semble essentiel, ce mécanisme permettrait ainsi de générer une cellule au génome instable, présentant des caractères tumoraux.

II. LA FUSION CELLULAIRE : UN ACCELERATEUR DE L'EVOLUTION TUMORALE

Les différents modèles cellulaires et murins de ces tumeurs, basés sur l'inactivation de p53, pRb ou encore de l'expression de HRAS_{G12V}, ne présentent pas l'instabilité des sarcomes à « génétique complexe » (Hahn *et al.* 1999 ; Tsumura *et al.* 2006 ; Hernando *et al.* 2007 ; Kirsch *et al.* 2007 ; Lin *et al.* 2009 ; Dodd *et al.* 2015). Ils ne reproduisent pas la génétique de ces tumeurs, notamment parce qu'ils sont basés sur l'induction de *drivers* forts, et non pas sur la restructuration du génome. Le manque de récurrence génétique et l'absence d'altérations dans des gènes inducteurs d'instabilité indiquent également que cette instabilité aurait une autre origine.

Le modèle d'oncogénèse que je propose ici est que le développement de ces tumeurs serait la conséquence d'un évènement cellulaire unique réorganisant massivement le génome : la fusion cellulaire. La capacité à fusionner, identifiée dans de nombreuses cellules mésenchymateuses, serait détournée et expliquerait l'instabilité génomique des sarcomes à « génétique complexe ».

A. Un nouveau regard sur l'oncogénèse des sarcomes ?

1. Un modèle de complexité génomique proche de celle des sarcomes à pléomorphes

Alors que le modèle de Weinberg et les modèles murins de sarcomes pléomorphes n'induisent pas d'instabilité génétique, la fusion cellulaire permet de reproduire la complexité génomique et les altérations génétiques des sarcomes à « génétique complexe » ainsi que leurs caractéristiques cliniques (morphologie, différenciation et agressivité).

Le modèle de l'initiation tumorale induite par la fusion cellulaire, décrit dans l'**Article 2**, pourrait alors apporter une meilleure compréhension de l'oncogénèse des sarcomes à « génétique complexe ». Dans ce modèle, l'acquisition d'altérations génomiques et la formation de cellules aneuploïdes sont associées et semblent nécessaires pour le développement tumoral. Ceci supporte alors

notre hypothèse sur l'importance d'une restructuration génomique à des stades précoces de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe ». De plus, tout comme les UPS, les tumeurs de haut grade observées dans ce modèle possèdent des pertes chromosomiques au niveau des chromosomes 10, 13 et 16 et un gain du chromosome 1 (Chibon *et al.* 2000 ; Derré *et al.* 2001 ; Gordon *et al.* 2003 ; Guillou and Aurias 2010). Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que ces altérations, observées de manière récurrente, jouent un rôle important dans l'oncogenèse des tumeurs humaines, notamment lors de l'initiation tumorale.

Alors que les hybrides possèdent l'ensemble des oncogènes nécessaires, le développement des tumeurs des hybrides semble nécessiter l'acquisition de nouvelles altérations spécifiques. Ces oncogènes ne seraient ainsi pas suffisants pour l'initiation tumorale dans un contexte tétraploïde, alors que leur présence dans une cellule diploïde est suffisante pour la transformation cellulaire (Durrieu-Gaillard *et al.* 2018). Nous pourrions même nous demander si ces oncogènes sont nécessaires. Dans un modèle dans lequel la restructuration du génome est générée suite à la fusion des deux cellules, une perte de suppresseurs de tumeurs ainsi qu'un gain d'un oncogène pourrait être acquis dans le génome hybride. Cependant, la formation de cellules aneuploïdes nécessite au préalable une inactivation de p53, qui est inactivé dans les cellules parentales de notre modèle par l'oncogène E6, celle-ci serait probablement indispensable pour une tolérance des cellules à des mécanismes de fusion (Soto *et al.* 2017). Ceci soulève alors la question de la tolérance de la fusion cellulaire, est ce que celle-ci nécessite un fond génétique spécifique ? Est-ce que toutes les cellules peuvent fusionner ? Autant de questions qui n'ont, pour le moment, pas encore de réponse.

Nous définissons ici un modèle cellulaire possible de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe », permettant de reproduire la génétique de ces tumeurs. La formation de cellules plus agressives est alors accessibles, que ce soit lors de l'initiation tumorale ou lors de la progression tumorale, par des mécanismes de fusion cellulaire. Alors que le doublement du génome est observé dans la moitié des sarcomes à « génétique complexe », l'origine de ce doublement n'est pas identifié.

La fusion cellulaire pourrait donc être un évènement impliqué dans au moins une partie des évènements de tétraploïdisation dans ces tumeurs.

2. Evènement oncogénique des sarcomes à « génétique complexe » ?

La fusion cellulaire, identifiée dans de nombreuses cellules mésenchymateuses, pourrait participer au développement d'autres types histologiques de sarcomes à « génétique complexe ». Nos modèles hybrides ont été générés à partir de la fusion de lignées de fibroblastes immortalisés ou transformés. Ces cellules conduisent au développement d'UPS, tumeurs dont l'origine cellulaire serait fibroblastique. Nous pourrions alors émettre l'hypothèse que des mécanismes de fusion impliquant d'autres types de cellules mésenchymateuses pourraient conduire au développement de types histologiques différents, selon une classification similaire aux sarcomes à « génétique complexe » qui regroupent plus d'une dizaine de sous-types histologiques. Ceci est d'ailleurs soutenu par de nombreux travaux démontrant un processus de trans-différenciation lors de la fusion cellulaire, indiquant alors que la ligne de différenciation de la cellule hybride peut être transmise à l'hybride (Blau 1989). Ces tumeurs n'étant pas caractérisées par une génomique spécifique, il serait alors intéressant d'étudier si la fusion de différents types cellulaires influencerait le type de différenciation tumorale, mais également d'identifier si, comme observé dans nos modèles, elle conduirait à des profils génomiques similaires aux tumeurs humaines.

Pour démontrer notre hypothèse, il est indispensable d'identifier ce mécanisme dans les tumeurs humaines. L'identification de cellules hybrides est néanmoins difficile, d'autres mécanismes de tétraploïdisation sont décrits et, hormis dans des contextes très particuliers, les cellules hybrides ne peuvent être distinguées des autres cellules. Les deux méthodes permettant l'identification d'évènements de fusion cellulaire sont basées soit sur l'expression de marqueurs des deux cellules parentales au niveau de l'hybride soit sur la présence de marqueurs génétiques différents dans une même cellule, dans le cas de patients transplantés, de sexe différent, par exemple (Chakraborty *et al.*

2004 ; Yilmaz *et al.* 2005 ; Andersen *et al.* 2007; Shabo *et al.* 2008 ; Clawson *et al.* 2012, 2015 ; Lazova *et al.* 2013 ; Ramakrishnan *et al.* 2013). Cependant, ces deux méthodes impliquent que la fusion cellulaire se réalise soit entre deux cellules de lignages distincts identifiables, soit entre les cellules du donneur et du receveur dans le cas d'une allogreffe. Ceci limite alors l'identification de ce mécanisme, qui pourrait alors être sous-estimé. D'autres méthodes doivent alors être proposées, comme l'identification de protéines impliquées dans la fusion membranaire des cellules tumorales ou encore l'identification de marqueur spécifique aux cellules hybrides. De plus, la fusion cellulaire impliquant une étape de fusion des membranes, serait-il possible d'identifier des « traces » de la fusion cellulaire au niveau de la membrane plasmique des cellules hybrides ? Il est alors indispensable d'observer ce mécanisme dans les sarcomes à « génétique complexe » pour confirmer nos observations et permettre de valider ce mécanisme comme initiateur du développement et de l'agressivité de ces tumeurs.

B. La fusion cellulaire est un médiateur de l'aneuploïdie

1. Un générateur d'instabilité génomique

L'ensemble de nos données montre que la fusion cellulaire favorise l'instabilité chromosomique. Que ce soit lors de l'initiation ou lors de la progression tumorale, les cellules hybrides présentent des altérations chromosomiques numériques et structurales.

Alors que ce mécanisme est important pour la physiologie et la différenciation de nombreuses cellules, il apparaît une différence importante entre les hybrides physiologiques et ceux de notre étude. En effet, la fusion cellulaire physiologique est un état de différenciation, conduisant à un arrêt du cycle et à la formation de cellules multinucléées (syncytia ou hétérokaryons). Cet arrêt du cycle peut s'expliquer soit par un engagement des cellules dans un lignage cellulaire avant la fusion, et donc un arrêt du cycle programmé, soit par la présence de plusieurs noyaux dans la même entité, induisant un arrêt du cycle dans les hybrides (Ogle *et al.* 2005 ; Zhou *et al.* 2015). A l'inverse, les hybrides de notre modèle sont des synkaryons pseudo-tétraploïdes avec des capacités prolifératives. Les synkaryons sont observés dans deux contextes différents, la régénération cellulaire et la tumorigenèse (Vassilopoulos

et al. 2003 ; Wang *et al.* 2003 ; Rizvi *et al.* 2006 ; Bastida-Ruiz *et al.* 2016). Dans les deux cas, les hybrides formés possèdent des capacités prolifératives. Les conséquences de la fusion cellulaire sont alors variables, dépendantes des cellules parentales et du contexte dans lequel ce processus est réalisé. Il apparaît également que le regroupement des deux génomes dans une même entité peut inhiber cette prolifération, notamment si une des deux cellules exprime des gènes freinant la progression dans le cycle cellulaire (Harris *et al.* 1969 ; Harris 1971 ; Stanbridge 1976). Le contexte cellulaire de la fusion est donc déterminant pour le devenir de ces hybrides. Il va induire la transition « hétérokaryon-synkaryon ». Ce passage d'une cellule binucléée à une cellule mononucléée nécessite la progression dans le cycle cellulaire des hybrides et un passage en mitose qui va conduire au regroupement des deux génomes dans un même noyau. Cette première mitose serait vraisemblablement à l'origine des altérations génomiques observées dans l'ensemble des hybrides que nous avons étudiés, via notamment la formation de centrosomes surnuméraires (Ganem *et al.* 2014 ; Zhou *et al.* 2015). Par cette transition, la fusion cellulaire va favoriser l'instabilité chromosomique.

La fusion cellulaire va, de plus, conduire à une instabilité chromosomique. Il est établi que la présence d'un chromosome supplémentaire chez la levure conduit à des pertes de chromosomes, des recombinaisons mitotiques ou encore des défauts de réparation de l'ADN (Storchová *et al.* 2006). La formation de cellules tétraploïdes par le mécanisme de fusion cellulaire serait ainsi favorable à l'acquisition de nouvelles altérations en modifiant la capacité des cellules hybrides à réparer des altérations de leur génome. Ce mécanisme favoriserait une dérégulation du maintien de l'intégrité génomique, c'est une force conductrice de l'instabilité chromosomique.

2. Un évènement complexe du modèle « diploïdie-tétraploïdie-aneuploïdie »

La fusion cellulaire agirait alors selon le modèle d'instabilité génétique « diploïdie-tétraploïdie-aneuploïdie », modèle établi de l'évolution de plusieurs types tumoraux (Gerlinger *et al.* 2014). Mais, alors que les autres mécanismes de tétraploïdisation se basent sur le doublement d'un même génome, la fusion cellulaire permet d'unir différents génomes dans un même compartiment.

Cette différence est alors fondamentale pour le devenir de l'hybride, permettant de regrouper des altérations ou des phénotypes différents. Elle permet alors l'héritage de capacités phénotypiques des cellules parentales. Ce processus peut alors être avantageux dans des conditions tumorales.

De plus, la fusion cellulaire favoriserait une réorganisation globale du génome des hybrides, à l'inverse des mécanismes de tétraploïdisation comme l'endoréplication ou encore une cytokinèse abortive. C'est d'ailleurs ce qui est observé chez les plantes, où la fusion est un évènement majeur de l'évolution phylogénique de certaines espèces (Lazebnik 2014). Deux types de fusion sont observés : des fusions entre deux cellules identiques, autopolyploïdie, et des fusions entre deux cellules différentes, allopolyploïdie. Alors que le premier type de fusion induit peu de réarrangements génomiques, les fusions allopolyploïdes permettent une modification du génome et de l'épigénome des cellules hybrides. Bien que le processus impliqué dans cette restructuration reste inconnu, selon Barbara McClintock, cet effet est la conséquence d'un choc « génomique et épigénomique » (McClintock 1984). Ce mécanisme modifierait alors l'intégrité des programmes génétique et transcriptomique. La fusion cellulaire entraîne également une modification épigénétique, ce processus est d'ailleurs utilisé dans la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (Serov *et al.* 2011). Dans le contexte tumoral, le génome et l'épigénome des cellules tumorales sont modifiés, ces dernières pouvant alors être définies comme des espèces différentes au vu de leur importante divergence avec des cellules normales (Duesberg *et al.* 2011). Ceci expliquerait alors les altérations génomiques observées lors de la fusion des cellules E6E7-CFP et des cellules transformées RST-DsRed. Il apparaît alors que les conséquences de la fusion cellulaire de deux types cellulaires distincts puissent être majeures.

L'état cellulaire est également déterminant dans des processus de fusion cellulaire. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré cela, comme la fusion de cellules apoptotiques ou encore sénescents (Bhatia *et al.* 2007 ; Noubissi *et al.* 2015). Aussi, la fusion cellulaire de cellules apoptotiques pourrait être un mécanisme de survie, permettant aux cellules d'échapper à la mort cellulaire. Cet état favoriserait d'ailleurs des évènements de fusion, et de manière intéressante, l'implication de la phosphatidylsérine dans des évènements de fusions physiologiques a été observée (Lyden *et al.* 1993

; van den Eijnde *et al.* 2001 ; Jeong and Conboy 2011). L'exemple le plus connu est celui de la fusion de cellules à différentes phases du cycle. Observée dans les travaux princeps de Rao and Johnson, elle induit des conséquences génomiques spécifiques, ce qui est d'ailleurs confirmé par notre modèle, dans lequel nous observons des altérations différentes en fonction des phases du cycle (Rao and Johnson 1970, 1972). Les conséquences génomiques de la fusion cellulaire dépendent alors du contexte cellulaire dans lequel elle est réalisée, favorisant alors une modification importante du génome des hybrides.

Il apparaît alors que la fusion cellulaire est un évènement complexe de tétraploïdisation, dont l'état cellulaire des deux cellules parentales va contribuer à l'acquisition d'altérations génomiques mais va également influencer les phénotypes des cellules hybrides. En regroupant et en générant des altérations chromosomiques, mais également des capacités propres à chaque cellule parentale, la fusion cellulaire agit selon un processus d'héritage et d'acquisition de caractères, ce qui, dans un contexte tumoral, va favoriser la diversité génétique et l'émergence de clones aux capacités agressives.

C. Un nouveau modèle de l'évolution tumorale ?

La fusion cellulaire induit la transformation de cellules néoplasiques et l'agressivité de cellules tumorales. C'est un évènement participant de façon active à l'évolution tumorale.

Dans l'évolution phylogénétique, deux modèles sont observés : l'évolution clonale, observée dans les microorganismes et l'évolution sexuelle. L'évolution darwinienne de l'oncogenèse se base sur l'acquisition dans une cellule tumorale d'altérations génétiques, se rapprochant alors plus de l'évolution observée dans le règne microbien (Nowell 1976). Dans ce mode d'évolution, l'acquisition de nouveaux caractères est cumulative, et ne fait pas intervenir de transmission génétique horizontale ; il n'y a pas d'échange génétique entre les cellules tumorales. Ce processus est ainsi moins favorable à la diversité génétique. L'évolution sexuée quant à elle permet le regroupement de deux génomes différents et permet la recombinaison inter-génomique (Gerlinger *et al.* 2014). Ce type d'évolution favorise alors une grande diversité génétique, avec l'émergence de nouveau phénotype avantageux (Sá Martins 2000). La fusion cellulaire induirait ce type d'évolution tumorale, permettant l'héritage et

l'acquisition de phénotypes. Elle génère, en une seule étape, la restructuration complète du génome de l'hybride. Il apparaît alors que des événements de fusion permettraient d'augmenter la diversité génétique au sein de la tumeur. Cet événement favoriserait alors la plasticité cellulaire et pourrait être défini comme un modèle d'évolution tumoral différent de celui communément décrit.

Deux modèles d'acquisition des altérations génétiques lors de l'évolution tumorale ont été proposés : soit cette acquisition serait séquentielle, avec l'acquisition progressive d'altérations, soit un événement ponctuel majeur modifierait l'ensemble du génome. Ce dernier modèle, appelé aussi macro-évolution serait plus délétère pour la cellule, avec un risque important de conduire à la mort cellulaire, mais les cellules issues de ces réarrangements possèderaient une meilleure adaptation à leur environnement. La fusion cellulaire serait ainsi un événement macro-évolutif, où 99% des cellules hybrides ne survivant pas à la fusion (Duelli and Lazebnik 2003). Alors que nous avons décrit un rôle évolutif de la fusion cellulaire, celle-ci peut être délétère, soit en étant létale soit en induisant une perte de capacités parentales dans les cellules hybrides. Ceci est d'ailleurs observé dans notre modèle de progression tumorale, dans lequel les hybrides acquièrent des capacités métastatiques, hormis l'hybride C7, dont le remaniement du génome a induit la perte de l'oncogène HRAS_{G12V}, et ainsi la perte des capacités tumorales de la lignée parentale RST. Comme constaté dans d'autres modèles d'instabilité chromosomique, la fusion cellulaire peut être avantageuse ou délétère, ceci étant probablement dépendant du niveau d'instabilité générée suite à la fusion. Cet événement n'est donc pas sans conséquence(s) pour la cellule hybride.

Le processus même de fusion cellulaire pourrait être considéré comme un oncogène. Cet événement permet, en une seule étape, la restructuration et l'acquisition d'altérations génétiques nécessaires à l'oncogenèse. Il participe à la fois à l'initiation tumorale et à la progression tumorale, et est alors un mécanisme oncogénique d'évolution majeur. Nos travaux, ainsi que ceux rapportés par la communauté scientifique, indiquent que ce mécanisme physiologique peut être considéré comme une caractéristique de certaines, voire de la majorité, des cellules tumorales. Il est alors primordial de

mieux comprendre comment la fusion cellulaire s'opère dans ces cellules, permettant alors d'identifier les cellules hybrides et d'apporter une compréhension nouvelle de l'oncogenèse.

Ces travaux nous ont permis de décrire le premier modèle cellulaire reproduisant les caractéristiques génomiques, cliniques et pathologiques des sarcomes à « génétique complexe ». Ils propulsent ainsi la fusion cellulaire comme un évènement initiateur et évolutif majeur, participant à l'oncogenèse pour permettre une augmentation de l'agressivité tumorale. Des travaux additionnels permettront de mieux comprendre les subtilités mécanistiques qui s'opèrent et qui entraînent ces changements phénotypiques au travers de la génétique.

Nous avons démontré que la fusion cellulaire peut s'opérer *in vivo* dans un modèle murin, ce mécanisme doit néanmoins être identifié dans les tumeurs sarcomateuses humaines afin de confirmer sa véracité clinique. Une telle étude peut être réalisée en s'aidant des méthodes d'identification d'hybrides déjà utilisées, via la recherche de marqueurs moléculaires de cellules de lignages différents exprimés dans la même cellule ou via l'analyse des cellules tumorales de patients transplantés. Dans le cadre du projet « ICGC Léimoyosarcomes » réalisé dans mon équipe d'accueil, le séquençage du génome d'une centaine de tumeurs ainsi que de l'ADN constitutionnel des patients ont été analysés et deux patients transplantés ont été inclus dans cette étude. Ces deux patients ont développés des LMS, et des analyses génétiques ont démontré que les cellules de la tumeur et de l'ADN constitutionnel étaient de deux origines différentes. Ces deux cas sont actuellement à l'étude dans l'équipe, afin d'identifier des cellules présentant des chromosomes de l'hôte et du donneur, pouvant ainsi démontrer des mécanismes de fusion cellulaire. En parallèle, la présence de cellules exprimant des marqueurs macrophagiques (CD163) et des marqueurs tumoraux (transgeline) sont également recherchés sur des coupes tumorales d'une large cohorte de LMS, afin d'identifier des cellules hybrides, issues de la fusion entre macrophages et cellules tumorales.

Alors que nous faisons l'hypothèse que la fusion cellulaire serait capable de reproduire la diversité histologique des sarcomes à « génétique complexe », ceci doit être confirmé sur d'autres types de cellules. Pour cela, la fusion de cellules de lignages de différenciation différentes doit être

réalisée afin de déterminer si ce mécanisme de fusion cellulaire peut reproduire l'ensemble des types histologiques des sarcomes à « génétique complexe ». Ainsi, la fusion de myoblastes, d'adipocytes ou de cellules musculaires lisses, immortalisés ou transformés, dont les lignes de différenciations sont similaires respectivement aux rhabdomyosarcomes, aux liposarcomes et aux LMS, sera étudiée et caractérisé par des analyses génomiques ainsi qu'une classification histologique de ces tumeurs.

Ces différentes études permettront d'identifier des événements de fusion cellulaire dans les tumeurs humaines et leur contribution dans le lignage cellulaire. Mais, afin de démontrer que ce mécanisme cellulaire peut être un mécanisme initiateur de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe », il est indispensable d'établir des modèles murins démontrant ces mécanismes de fusion. D'après les données de la littérature, l'inactivation de p53 et pRb chez des souris est suffisante pour le développement de sarcomes pléomorphes. Ainsi, des souris *Rb1^{Flox/Flox}* pourraient être transplantées avec des cellules de moelle osseuse p53^{-/-} exprimant la recombinaise Cre. Dans ce modèle, seules les cellules hybrides pourraient conduire au développement tumoral, prouvant ainsi l'importance de ce mécanisme au cours de l'oncogenèse.

Les perspectives de ces travaux doivent également permettre de comprendre les différents aspects mécanistiques de la fusion cellulaire. Nos différents modèles soulignent l'importance de la première mitose dans l'acquisition d'altération génomique. L'analyse de celle-ci, que ce soit suite à des fusions synchronisées ou spontanées, sera donc réalisée. Une collaboration avec le Dr. Anna Castro (Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier ; CRBM) est actuellement en cours, afin de pouvoir « visualiser » cette première mitose.

Plusieurs événements sont connus pour favoriser la fusion tels que le stress ou encore une inflammation chronique. Toutefois, une caractérisation globale sera nécessaire pour déterminer s'il existe des conditions pathologiques qui la favorise ou rendent les cellules permissives. Notamment, des conditions de stress tels que l'hypoxie, la sénescence ou encore des conditions pré-apoptotiques pourront être testées. Dans des conditions physiologiques, certaines cellules sont compétentes pour la fusion dans des conditions de restauration ou de régénération tissulaire, ce qui implique de nombreux

types cellulaires. La fusion cellulaire pourrait alors être tolérée dans diverses cellules. Il est primordial de déterminer comment et dans quelle(s) condition(s) celle-ci peut s'effectuer. Si ces mécanismes de fusion sont largement tolérés, ils pourraient alors participer à l'oncogenèse d'autres types tumoraux.

Nous décrivons ainsi un nouveau mécanisme possible de l'oncogenèse des sarcomes à « génétique complexe », et les perspectives de ces travaux pourraient alors permettre de comprendre la biologie et le développement de ces tumeurs avec un nouveau regard.

Partie 4 : Matériels et méthodes

Article 1

Les méthodes et protocoles utilisés dans le cadre de la publication « *Récurrent TRIO fusion in nontranslocation-related sarcomas* » sont présentés dans le manuscrit aux pages 109 et 110.

Ci-dessous sont indiqués les séquences des amorces et des *shRNA* utilisés lors de cette étude ainsi que le tableau de la cohorte de sarcomes analysées en CGH-array.

	Forward	Reverse
<i>TRIO</i> exon 33	ccaaggagacggcagcag	atcaccactgtcagctcaca
<i>TRIO</i> exon 34	gtggttcactgtgcatcgc	gatcatgtgggctggagg
<i>TERT</i> exon 3	gagctgacgtggaagatgag	acgtacacactcatcagcca
<i>TERT</i> exon 2	cagtgcctggtgctcgtg	aaggccagcacgttcttc
<i>ZNF558</i>	gtgatcttattccctcaatctccag	tcctgagagtttaagggaagcc
<i>AK095210</i> intron 2	ggcacacaagagtcttccaa	ggctgcctgattcaaatctc
<i>AK095210</i> intron 3	aagaaccactccctcttctc	catgtcaccatgaggcattc
<i>AK095210</i> exon 4	ggaagccgaggagaagtcat	tggaggttcagtgaggc
<i>FARSA</i>	gtctccgtccagagatgct	gggactgtcatacaccatct
<i>SYCE2</i>	gaagagaactgcgaggagga	tgaagtggatcatgagtca
<i>GSE1</i>	cccgggtgagataagcagtt	gttttgggtggagcgtggt
<i>RP11-980G10.1</i>	tgtgatctctggaagcatct	atctggccttgtctgctc

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits de fusion en RT-PCR.

Correspond à la *Supplementary Table 1* du manuscrit Delespaul *et al.*, 2017.

Transcript	Forward	Reverse	Probe
<i>TRIO(exon 33)-TERT(exon 2)</i>	ctcacggacgtctcagaaca	aaggccagcacgttcttc	taaggtgtcctgcctgaagg
<i>TRIO(exon 33)-TERT(exon 3)</i>	ccagcctgatacattcca	acacagccaacccttatcg	cgcctcacggacgtctcagaac
<i>TRIO(exon 34)-TERT(exon 2)</i>	tccagaagtagcatggaaatgga	cgggccaccagctcctt	catcttcaaccacaaggtgtcctgcc
<i>TRIO(exon 34)-TERT(exon 3)</i>	ccactccagaagtagcatggaa	tgcggccggaacaca	tggagggcatcttcaaccacaagg
<i>TRIO (exon 33-34)</i>	tcacggacgtctcagaacac	gatcaccactgtcgtcaca	tggacagcgataagctctctgtgg

Tableau 9 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour la quantification des transcrits chimériques par RT-qPCR.

Correspond à la *Supplementary Table 2* du manuscrit Delespaul *et al.*, 2017.

ShRNA Name	Sequences
shRNA NT F	5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTT-3'
shRNA NT R	5'-AATTA AAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG-3'
shRNA TRIO33TERT2 F	5'-CCGGGCGATAAGGTGTCTGCCCTCGAGGGCAGGACACCTTATCGCTTTTT-3'
shRNA TRIO33TERT2 R	5'-AATTA AAAAGCGATAAGGTGTCTGCCCTCGAGGGCAGGACACCTTATCGC-3'

Tableau 10 : Séquences des shRNA utilisées pour l'inhibition de l'expression de *TRIO33-TERT2* ainsi que celles du shRNA control (NT : Non targeting).

Correspond à la *Supplementary Table 3* du manuscrit Delespaul *et al.*, 2017.

Characteristics	Cohort (n=24)
Median follow-up (years)	2.41 (CI95% 1.44-6.88)
Median Age (years)	63 (CI95% 56-66)
Sex	
Female	9 (37.5%)
Male	15 (62.5%)
FNCLCC grade (%)	
1	2 (8.33%)
2	4 (16.66%)
3	15 (62.5%)
NA	3 (12.5%)
Histological type (%)	
UPS	8 (33.33%)
LMS	7 (29.16%)
MFS	3 (12.5%)
PLPS	3 (12.5%)
DDLPS	2 (8.33%)
PRMS	1 (4.16%)
Location	
Lower limb	13 (54.16%)
Trunk wall	6 (25%)
Internal trunk	3 (12.5%)
Upper limb	1 (4.16%)
GI tract	1 (4.16%)
Relapse events (%)	
Metastasis	13 (54.16%)
Local recurrences	7 (29.16%)
Median Size of tumour (mm) (n=21)	80 (CI95% 75-120)

Tableau 11 : Cohorte analysées en CGH-array (n=24).

CI : intervalle de confiance ; UPS : Sarcome pléomorphe indifférencié ; LMS : Léiomyosarcome ; DD LPS : liposarcome dédifférencié ; MFS : myxofibrosarcome ; PLPS : liposarcome pléomorphe ; PRMS : rhabdomyosarcome pléomorphe ; GI : gastro intestinal.

Correspond à la *Supplementary Table 4* du manuscrit Delespaul *et al.*, 2017.

« Etude de la relation entre complexité génomique et expression de transcrits chimériques » (Partie 2.1.B)

Description de la cohorte : La cohorte utilisée est celle décrite dans la publication 1 (Delespaul *et al.* 2017). Un cas d'UPS a été reclassé suite à une relecture par des anatomopathologistes et à la détection du transcrit chimérique *NAB2-STAT6* comme tumeur fibreuse solitaire et a donc été exclue de notre analyse.

Extraction ARN, RNA-seq et identification de transcrits chimériques : L'extraction ARN et le *RNA-seq* a été précédemment décrit dans Delespaul *et al.* 2017. L'identification des transcrits chimériques a été réalisée grâce à l'algorithme deFuse (v0.6.1 ; McPherson *et al.* 2011) avec les annotations ENSEMBL GRCh37.74.

L'analyse des transcrits chimériques décrit dans la publication 1 ainsi que l'ensemble des validations que nous avons réalisé nous ont permis de définir de nouveaux filtres de sélection des transcrits chimériques : une probabilité de plus de 50%, non-défini comme *read-through* (Akiva 2005), ne possédant pas les mêmes caractéristiques que les *read-through* (partenaires sur le même chromosome, mécanisme chromosomique indiqué comme étant une délétion, fusion entre deux régions codantes, distance entre les deux gènes < 20 000 pb), l'homologie des points de fusion doit être inférieure à < 30, pourcentage d'identité des alignements des séquences de fusions pour les cDNA, EST et des îlots EST inférieurs à 10%. Pour supprimer les faux négatifs, nous enlevons également les transcrits chimériques précédemment décrits dans du tissu sain (Zhao *et al.* 2015). Les analyses de regroupement non-supervisé ont été réalisé comme décrites dans (Delespaul *et al.* 2017).

Plot circulaire : Les *circos plot* ont été réalisés à l'aide du logiciel CIRCOS (Krzywinski *et al.* 2009). Un test binomial a été réalisé pour identifier les régions significativement enrichis en gène de fusion.

Article 2

Les méthodes et protocoles utilisés dans le cadre de la publication «*Human mesenchymal cell hybrid initiates genetically instable tumors*» sont présentés dans le manuscrit aux pages 152 à 155.

« Implication du cycle cellulaire dans la formation d'altérations dans les hybrides » (Partie 2.II.B)

Lignées cellulaires et réactifs : Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du RPMI-1640 (Invitrogen) complété avec 10% (SVF) à 37°C dans incubateur humide à 5% de CO₂. Les lignées d'IMR90 E6E7 RST ont été données par l'équipe du Dr. M. Teichmann (Haurie *et al.* 2010). Ces lignées sont transformées suite à l'infection des oncogènes E6, E7, HRAS_{G12V}, SmallT et hTERT. Les lignées Tomato et GFP ont été générées suite à l'infection lentivirale des vecteurs vER305 hPGK-Tomato-SV40-Blast et pLenti CMV/TO GFP-Zeo. Les hybrides ont été obtenus à l'aide de la particule d'enveloppe du virus Sendai avec le kit *GenomONE™ - CF EX Sendai virus (HVJ) Enveloppe Fusion Kit* (Cosmo Bio) selon la méthode en suspension décrite par le fournisseur. Suite à la fusion, les hybrides sontensemencés dans des plaques six puits à 200 000 cellules par puits. Après 24h de culture, la sélection antibiotique est ajoutée sur les cellules, la zéocine (InvivoGen) à une concentration de 250 µg/mL et la blasticidine (ThermoFisher Scientific) à une concentration de 16µg/mL.

Synchronisation cellulaire : Une déprivation en sérum pendant 48h est réalisée pour une synchronisation en G0/G1. Pour la synchronisation en S, un premier bloc de thymidine à 2,5 mM (Sigma Aldrich) est réalisé pendant 18h, suivi d'une relâche de 10h. Un nouveau bloc de thymine 2,5 mM est réalisé pendant 16h suivi d'une relâche de 2h. Les cellules synchronisées en G2 sont incubées avec de la thymidine 2,5 mM pendant 24h, suivi d'une relâche de 4h. Une incubation avec 12 µM de RO-3306 (AxonMedChem) pendant 15h. Enfin, les cellules synchronisées en M sont incubés pendant 24h avec de la thymidine 2,5 mM, suivi d'une relâche de 4h. Une incubation avec 100 ng/µL de nocodazole (Sigma Aldrich). Les cellules récupérées sont les cellules non-adhérentes.

Cycle cellulaire : Les cellules sont fixées avec de l'éthanol 70% et incubés à - 20% durant au moins 24h. La suspension cellulaire est marquée avec du iodure de propidium (Sigma Aldrich) à 0,05 mg/mL et 0,5 µg/mL de RNase A (Invitrogen). L'incorporation d'iodure de propidium est évaluée par

cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Bioscience). Les données sont acquises en utilisant le logiciel CellQuest (BD FACS Systems) et analysées en utilisant le logiciel FlowJo (Tree Star).

Western blotting : La lyse cellulaire a été réalisée avec du tampon de lyse RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0,25% DOC, 0,1% SDS, 1mM EDTA, 1mM de PMSF, 1X PIC, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride) pendant 30 min dans la glace. Suite à la lyse, les échantillons ont été centrifugés 30 min, 13 000 rpm à 4°C et le surnageant contenant les protéines a été récupéré. Le dosage protéique a été obtenu à l'aide du kit *protein assay* Biorad DC™ et a été analysé grâce au spectrophotomètre PowerwaveX (BioTek Instruments). Une quantité égale de protéines pour chaque échantillon a été utilisée (50 µg). Du Laemmli 2X (Tris HCl 126 mM, glycérol 20%, SDS 4%, bleu de bromphénol 0,02%) a été ajouté aux échantillons qui ont été incubés 5 min à 100°C avant d'être déposés sur un gel SDS-PAGE. Le gel est ensuite transféré sur une membrane nitrocellulose par un transfert liquide. Les membranes sont bloquées avec du lait demi-écrémé dans du TBS-0,3% pendant une heure et incubé avec 1µg/ ml d'anti-phospho-Ser/Thr-Pro MPM2 (Merck Millipore) durant la nuit à 4°C. La membrane est lavée deux fois avec de l'eau et incubée avec un anticorps secondaire dirigé contre la souris (Amersham) dans du TBS 0,3% lait 0,05% Tween 20 pendant une heure et demi. La membrane est lavée deux fois avec de l'eau et une fois dans du TBS 0,05% Tween 20. La révélation s'effectue à l'aide du kit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Le signal est détecté à l'aide du système d'imagerie Fusion Fx7 (ThermoFisher Scientific). La β-actine (Sigma) est utilisée comme contrôle de charge.

Marquage BrdU : Le marquage a été réalisé en utilisant le kit *5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I* (Roche) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. Les données sont acquises en utilisant le logiciel CellQuest (BD FACS Systems) et analysés en utilisant le logiciel FlowJo (Tree Star).

Extraction ADN, analyse des profils génomiques et calcul du *genomic index* (GI) : Les ADN ont été extraits en utilisant une méthode standard de phénol-chloroforme et quantifié en utilisant le *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Les profils génomiques ont été réalisés en utilisant les puces Affymetrix CytoScan HD (Affymetrix) selon les recommandations du fournisseur. Les fichiers CEL obtenus par le scan des puces ont été analysés en utilisant le logiciel *Chromosome Analysis Suite* (Affymetrix) et les annotations de la version du génome GRCH37 (hg19).

Le GI a été calculé de la manière suivante : $GI = A^2/C$, A correspondant au nombre d'altérations et C au nombre de chromosomes portant une altération.

Le ratio « B » (rB) est défini de la manière suivante : $rB = AB/AT$, AB correspondant au nombre d'altérations issus d'une anomalie « B », c'est-à-dire touchant un bras de chromosome ou un chromosome entier et AT correspondant au nombre total d'altérations. Les altérations ayant un signal lissé supérieur à 2,2 ou inférieur à 1,8 ont été utilisées pour ce calcul. Pour chaque combinaison, les clones présentant le rB le plus distant du reste du groupe sont enlevés de l'analyse. Les altérations présentes dans les lignées parentales ne sont pas prises en compte pour le calcul du GI et du rB.

Expériences *in vivo* : Les animaux ont été maintenus dans des conditions sans pathogènes au Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales (CREFRE). Les expériences ont été réalisées dans la conformité des lois du comité d'éthique en expérimentation animal (A31555010). Pour les expériences, 100 000 cellules ont été injectées sur le flanc droit de souris NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) âgées de six à huit semaines. La taille des tumeurs a été mesurée deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse et le volume tumoral a été calculé en utilisant la formule $V = \text{longueur} \times \text{largeur}^2/2$. Les souris ont été sacrifiées lorsque la tumeur atteignait 2 000 mm³ par dislocation cervicale. Les tumeurs ont été ensuite mesurées et divisées en deux parties : une pour de la congélation à l'azote et une pour une fixation à la formaline. Les poumons, le foie, les reins et la rate ont été récupérés et analysés au PhotonImager.

« Implication de la fusion cellulaire dans la progression tumorale » (Partie 2.II.C)

Lignées cellulaires et réactifs : Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du RPMI-1640 (Invitrogen) complété avec 10% de sérum bovin fœtal (SVF) à 37°C dans incubateur humide à 5% de CO₂. Les lignées d'IMR90 E6/E7 et IMR90 E6/E7/RST ont été données par l'équipe du Dr. M. Teichmann (Haurie *et al.* 2010). Ces lignées contiennent : 1/ les oncogènes viraux E6 et E7 pour la lignée d'IMR90 E6 E7 et 2/ les oncogènes E6, E7, HRAS_{G12V}, SmallT et hTERT pour la lignée IMR90 E6E7RST. Les lignées DsRed et CFP ont été générées suite à l'infection lentivirale des vecteurs pSD136-puromycin-DsRed et pER167-Blasticidin-CFP. Les hybrides spontanés ont été obtenus suite à la co-culture de 150 000 cellules des deux lignées parentales par puits d'une plaque six puits pendant 72h. Ils sont ensuite sélectionnés par leur double résistance aux antibiotiques puromycine (ThermoFisher Scientific) à une concentration de 2µg/mL et blasticidine (ThermoFisher Scientific) à une concentration de 16µg/mL.

Étalement chromosomique : Les cellules sont incubées pendant la nuit avec de la colchicine (0.01µg/ml; Gibco, Thermofisher) et resuspendues dans une solution isotonique d'un tampon KCl 0,075 M. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de la solution de fixation méthanol-acide acétique 3 :1. Après plusieurs lavages, les cellules sont étalées sur une lame de verre humide. Les lames sont montées en utilisant du Vectashield Dapi (Vector Laboratories). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide du microscope Cell Observer (Zeiss).

Fluorescence des hybrides : Pour confirmer la fluorescence des hybrides, la fluorescence de chaque lignée cellulaire a été analysée en utilisant le microscope Olympus CKX41.

Extraction ADN, analyse des profils génomiques et calcul du *genomic index* (GI) : Les ADN ont été extraits comme décrit dans la partie de méthodologie **II.B**.

Test de prolifération cellulaire : 5 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits. Tous les deux à trois jours, les cellules de trois puits sont récupérées et reprises dans un volume final de 500 μ L. Le nombre de cellules viables est évalué par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Bioscience) en fonction de leur taille et de leur granulosité. Les données sont acquises en utilisant le logiciel CellQuest (BD FACS Systems) et analysées avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

Test de formation de colonies en agar mou : Les cellules sont diluées dans du RPMI contenant 0,3% d'agar et 10% de SVF. Elles sont ensuite placées dans des plaques six puits recouvertes au préalable par du RPMI contenant 0,5% d'agar et 10% de SVF à une dilution de 2 500 cellules par puits. Les cellules sont placées pendant 21 jours à 37°C dans un incubateur humide à 5% de CO₂. Le nombre de colonies a été évalué à l'aide du microscope Olympus CKX41.

Test de migration et d'invasion : La migration des dilutions limites a été évaluée par un test de cicatrisation. Les cellules sontensemencées à confluence et 24h plus tard, une brèche au niveau de la couche cellulaire est créée à l'aide d'un cône. Des images en contraste de phase ont été acquises à l'aide du microscope Olympus CKX41 et du microscope Cell Observer (Zeiss) au temps 0 et 8h. Le calcul de l'aire de surface occupé a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ. Les tests d'invasion et de migration ont été réalisés à l'aide de chambres de Boyden recouvertes ou non par du matrigel et contenant des pores de 8 μ m (Dutscher). Les inserts sont placés dans des plaques 24 puits contenant 500 μ L de RPMI 10%SVF. Puis, 2 500 cellules sont placées dans la partie haute de l'insert dans 500 μ L de RPMI 5% SVF. Après 20h, les cellules encore présentes au niveau de la partie haute sont enlevées en utilisant un coton tige. Les cellules ayant migrées, placées sur la partie inférieure de l'insert, sont fixées avec de l'éthanol froid et marquées avec du Hoechst 33342. Chaque insert a été imagé à l'aide du microscope Olympus CKX41. La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Expériences *in vivo* : Les animaux ont été maintenus dans des conditions sans pathogènes à l'animalerie A2 de l'Université de Bordeaux. Les expériences ont été réalisées dans la conformité des lois du comité d'éthique en expérimentation animal (DIR13109). Ces expériences ont été réalisées comme décrites dans la partie de méthodologie **II.B**.

Immunohistochimie et marquage H&E : Les blocs de tissus ont été fixés à la formaline, incorporés en paraffine et coupés en section de 5 µm d'épaisseur. Les immunohistochimies ont été réalisées en utilisant des anticorps monoclonaux humains dirigés contre la vimentine, le S100 et le pan-cytokératine. Les marquages H&E ont été réalisés suivant les protocoles standards. L'acquisition des images a été réalisée en utilisant le microscope Olympus CKX41.

Immunofluorescence sur paraffine : Les tissus inclus en paraffine a été coupés en section de 5µm. Les lames ont été ensuite déparaffinées avec du toluène. Les épitopes sont libérés grâce à un tampon citrate pH 6.0. Les lames sont incubées avec un anticorps primaire anti-CFP de souris (Santa Cruz Biotechnology sc9996, dilution au 1/50) et un anticorps primaire anti-RFP de lapin (Abcam ab62341, dilution au 1/50) pendant 1h à température ambiante. Les anticorps secondaire Alexa Fluor 488 goat anti-mouse et 647 goat anti-rabbit (Molecular Probes) sont incubés pendant 1h à température ambiante. Les lames sont montées en utilisant du Vectashield Dapi (Vector Laboratories). L'acquisition des images a été réalisée en utilisant le microscope Olympus CKX41.

Références bibliographiques

- Aagaard L., Bjerregaard B., Kjeldbjerg A.L., Pedersen F.S., Larsson L.-I. & Rossi J.J. 2012. Silencing of endogenous envelope genes in human choriocarcinoma cells shows that envPb1 is involved in heterotypic cell fusions. *The Journal of General Virology* 93: 1696–1699.
- Abbas T., Keaton M.A. & Dutta A. 2013. Genomic Instability in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a012914–a012914.
- Adamowicz M., Radlwimmer B., Rieker R.J., Mertens D., Schwarzbach M., Schraml P., Benner A., Lichter P., et al. 2006. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45: 829–838.
- Aghababaei M., Hogg K., Perdu S., Robinson W.P. & Beristain A.G. 2015. ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion. *Cell Death and Differentiation* 22: 1970–1984.
- Aguilar P.S., Baylies M.K., Fleissner A., Helming L., Inoue N., Podbilewicz B., Wang H. & Wong M. 2013. Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends in genetics: TIG* 29: 427–437.
- Aichel O. 1911. Über zellverschmelzung mit quantitativ abnormer chromosomenverteilung als ursache der geschwulstbildung. In: *Vorträge und aufsätze über entwicklungsmechanik der organismen*, Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany, pp. 1–115.
- Akiva P. 2005. Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome Research* 16: 30–36.
- Alexander R.P., Fang G., Rozowsky J., Snyder M. & Gerstein M.B. 2010. Annotating non-coding regions of the genome. *Nature Reviews Genetics* 11: 559–571.
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Campbell P.J. & Stratton M.R. 2013a. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Reports* 3: 246–259.
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., et al. 2013b. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500: 415–421.
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J. & Alvarez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425: 968–973.
- Andersen T.L., Boissy P., Sondergaard T.E., Kupisiewicz K., Plesner T., Rasmussen T., Haaber J., Kølvrå S. & Delaissé J.-M. 2007. Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer-host partnership? *The Journal of Pathology* 211: 10–17.
- Anderson N.D., Borja R. de, Young M.D., Fuligni F., Rosic A., Roberts N.D., Hajjar S., Layeghifard M., et al. 2018. Rearrangement bursts generate canonical gene fusions in bone and soft tissue tumors. *Science* 361: eaam8419.
- Armitage P. & Doll R. 1954. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer* 8: 1–12.
- Aurias A., Rimbaut C., Buffé D., Dubousset J. & Mazabraud A. 1983. [Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma]. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 296: 1105–1107.
- Avery O.T., Macleod C.M. & McCarty M. 1944. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *The Journal of Experimental Medicine* 79: 137–158.
- Avinoam O. & Podbilewicz B. 2011. Eukaryotic Cell–Cell Fusion Families. In: *Current Topics in Membranes*, Elsevier, pp. 209–234.

- Baca S.C., Prandi D., Lawrence M.S., Mosquera J.M., Romanel A., Drier Y., Park K., Kitabayashi N., et al. 2013. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 153: 666–677.
- Bailey M.H., Tokheim C., Porta-Pardo E., Sengupta S., Bertrand D., Weerasinghe A., Colaprico A., Wendl M.C., et al. 2018. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* 173: 371–385.e18.
- Bainbridge M.N., Warren R.L., Hirst M., Romanuik T., Zeng T., Go A., Delaney A., Griffith M., et al. 2006. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC genomics* 7: 246.
- Baird K., Davis S., Antonescu C.R., Harper U.L., Walker R.L., Chen Y., Glatfelter A.A., Duray P.H. & Meltzer P.S. 2005. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Research* 65: 9226–9235.
- Bakhroum S.F., Ngo B., Laughney A.M., Cavallo J.-A., Murphy C.J., Ly P., Shah P., Sriram R.K., et al. 2018. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 553: 467–472.
- Ballinger M.L., Goode D.L., Ray-Coquard I., James P.A., Mitchell G., Niedermayr E., Puri A., Schiffman J.D., et al. 2016. Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *The Lancet Oncology* 17: 1261–1271.
- Barbieri C.E., Baca S.C., Lawrence M.S., Demichelis F., Blattner M., Theurillat J.-P., White T.A., Stojanov P., et al. 2012. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics* 44: 685–689.
- Barra V. & Fachinetti D. 2018. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nature Communications* 9.
- Barrett M.T., Pritchard D., Palanca-Wessels C., Anderson J., Reid B.J. & Rabinovitch P.S. 2003. Molecular phenotype of spontaneously arising 4N (G2-tetraploid) intermediates of neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Research* 63: 4211–4217.
- Bastida-Ruiz D., Van Hoesen K. & Cohen M. 2016. The Dark Side of Cell Fusion. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 638.
- Ben-David U., Arad G., Weissbein U., Mandefro B., Maimon A., Golan-Lev T., Narwani K., Clark A.T., et al. 2014. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 5: 4825.
- Berger R. 1997. Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 94: 8–12.
- Bhatia B., Multani A.S., Patrawala L., Chen X., Calhoun-Davis T., Zhou J., Schroeder L., Schneider-Broussard R., et al. 2007. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: Cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *International Journal of Cancer* 122: 1483–1495.
- Bi P., Ramirez-Martinez A., Li H., Cannavino J., McAnally J.R., Shelton J.M., Sánchez-Ortiz E., Bassel-Duby R. & Olson E.N. 2017. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science (New York, N.Y.)* 356: 323–327.
- Bianchi A.B., Aldaz C.M. & Conti C.J. 1990. Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 6902–6906.
- Bianchi E., Doe B., Goulding D. & Wright G.J. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508: 483–487.

- Birkbak N.J., Eklund A.C., Li Q., McClelland S.E., Endesfelder D., Tan P., Tan I.B., Richardson A.L., et al. 2011. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Research* 71: 3447–3452.
- Bittner R.E., Schöfer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., Freilinger M., Höger H., et al. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and Embryology* 199: 391–396.
- Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S., Najbauer J. & Terzis A.J.A. 2005. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer* 5: 899.
- Bjerregaard B., Holck S., Christensen I.J. & Larsson L.-I. 2006. Syncytin is involved in breast cancer-endothelial cell fusions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 63: 1906–1911.
- Bjerregaard B., Ziolkiewicz I., Schulz A. & Larsson L.-I. 2014. Syncytin-1 in differentiating human myoblasts: relationship to caveolin-3 and myogenin. *Cell and Tissue Research* 357: 355–362.
- Blaise S., Parseval N. de, Bénit L. & Heidmann T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13013–13018.
- Blaise S., Parseval N. de & Heidmann T. 2005. Functional characterization of two newly identified Human Endogenous Retrovirus coding envelope genes. *Retrovirology* 2: 19.
- Blau H.M., Chiu C.-P. & Webster C. 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterokaryons. *Cell* 32: 1171–1180.
- Blau H.M., Pavlath G., Hardeman E., Chiu C., Silberstein L., Webster S., Miller S. & Webster C. 1985. Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758–766.
- Blau H.M. 1989. How fixed is the differentiated state?: Lessons from heterokaryons. *Trends in Genetics* 5: 268–272.
- Blau H.M. & Blakely B.T. 1999. Plasticity of cell fate: Insights from heterokaryons. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10: 267–272.
- Blay J.-Y., Le Cesne A., Cassier P.A. & Ray-Coquard I.L. 2012. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): a rare entity, a tumor model for personalized therapy, and yet ten different molecular subtypes. *Discovery Medicine* 13: 357–367.
- Blond J.L., Besème F., Duret L., Bouton O., Bedin F., Perron H., Mandrand B. & Mallet F. 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of Virology* 73: 1175–1185.
- Blond J.L., Lavillette D., Cheynet V., Bouton O., Oriol G., Chapel-Fernandes S., Mandrand B., Mallet F. & Cosset F.L. 2000. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *Journal of Virology* 74: 3321–3329.
- Blount P.L., Galipeau P.C., Sanchez C.A., Neshat K., Levine D.S., Yin J., Suzuki H., Abraham J.M., et al. 1994. 17p allelic losses in diploid cells of patients with Barrett's esophagus who develop aneuploidy. *Cancer Research* 54: 2292–2295.
- Boutillier J. & Duncan R. 2011. The reovirus fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Current Topics in Membranes* 68: 107–140.
- Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Science* 40: 857–859.

- Brito D.A. & Rieder C.L. 2006. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Current biology: CB* 16: 1194–1200.
- Brzóška E., Bello V., Darribère T. & Moraczewski J. 2006. Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 74: 105–118.
- Bunting S.F., Callén E., Wong N., Chen H.-T., Polato F., Gunn A., Bothmer A., Feldhahn N., et al. 2010. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141: 243–254.
- Burkhardt D.L. & Sage J. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* 8: 671–682.
- Burrell R.A. & Swanton C. 2016. Re-Evaluating Clonal Dominance in Cancer Evolution. *Trends in Cancer* 2: 263–276.
- Camargo F.D., Green R., Capetanaki Y., Jackson K.A., Goodell M.A. & Capetanaki Y. 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature Medicine* 9: 1520–1527.
- Can Z., Yilmaz S., Riza A., Apaydin E.I. & Kuzu I. 1998. Sarcoma developing in a burn scar: case report and review of the literature. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 24: 68–71.
- Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330–337.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Ley T.J., Miller C., Ding L., Raphael B.J., Mungall A.J., Robertson A.G., Hoadley K., et al. 2013a. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 368: 2059–2074.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C., Schultz N., Cherniack A.D., Akbani R., Liu Y., Shen H., Robertson A.G., et al. 2013b. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497: 67–73.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2017. Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* 171: 950-965.e28.
- Carter S.L., Cibulskis K., Helman E., McKenna A., Shen H., Zack T., Laird P.W., Onofrio R.C., et al. 2012. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nature Biotechnology* 30: 413–421.
- Casali P.G., Abecassis N., Bauer S., Biagini R., Bielack S., Bonvalot S., Boukovinas I., Bovee J.V.M.G., et al. 2018. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 29: iv51–iv67.
- Castillo A., Morse H.C., Godfrey V.L., Naeem R. & Justice M.J. 2007. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Research* 67: 10138–10147.
- Castro-Giner F., Ratcliffe P. & Tomlinson I. 2015. The mini-driver model of polygenic cancer evolution. *Nature Reviews Cancer* 15: 680.
- Chakraborty A., Lazova R., Davies S., Bäckvall H., Ponten F., Brash D. & Pawelek J. 2004. Donor DNA in a renal cell carcinoma metastasis from a bone marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplantation* 34: 183–186.
- Chakraborty A.K., Freitas Sousa J. de, Espreafico E.M. & Pawelek J.M. 2001. Human monocyte \times mouse melanoma fusion hybrids express human gene. *Gene* 275: 103–106.

- Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M. & Moore P.S. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science (New York, N.Y.)* 266: 1865–1869.
- Charlton C.A., Mohler W.A., Radice G.L., Hynes R.O. & Blau H.M. 1997. Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *The Journal of Cell Biology* 138: 331–336.
- Cheeseman I.M., Anderson S., Jwa M., Green E.M., Kang J. seog, Yates J.R., Chan C.S.M., Drubin D.G. & Barnes G. 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell* 111: 163–172.
- Cheeseman I.M., Chappie J.S., Wilson-Kubalek E.M. & Desai A. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127: 983–997.
- Chen E.H. 2005. Unveiling the Mechanisms of Cell-Cell Fusion. *Science* 308: 369–373.
- Chibon F., Mairal A., Fréneaux P., Terrier P., Coindre J.-M., Sastre X. & Aurias A. 2000. The RB1 gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer research* 60: 6339–6345.
- Chibon F., Mariani O., Derré J., Malinge S., Coindre J.-M., Guillou L., Lagacé R. & Aurias A. 2002. A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer genetics and cytogenetics* 139: 24–29.
- Chibon F., Mariani O., Derré J., Mairal A., Coindre J.-M., Guillou L., Sastre X., Pédeutour F. & Aurias A. 2004. ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Genes, Chromosomes & Cancer* 40: 32–37.
- Chibon F. & Aurias A. 2007. Biologie moléculaire des sarcomes des tissus mous. *Oncologie* 9: 88–96.
- Chibon F., Lagarde P., Salas S., Pérot G., Brouste V., Tirode F., Lucchesi C., Reynies A. de, et al. 2010. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nature Medicine* 16: 781–787.
- Chmielecki J., Crago A.M., Rosenberg M., O'Connor R., Walker S.R., Ambrogio L., Auclair D., McKenna A., et al. 2013. Whole-exome sequencing identifies a recurrent NAB2-STAT6 fusion in solitary fibrous tumors. *Nature Genetics* 45: 131–132.
- Choma D., Daurès J.P., Quantin X. & Pujol J.L. 2001. Aneuploidy and prognosis of non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of published data. *British Journal of Cancer* 85: 14–22.
- Chudasama P., Mughal S.S., Sanders M.A., Hübschmann D., Chung I., Deeg K.I., Wong S.-H., Rabe S., et al. 2018. Integrative genomic and transcriptomic analysis of leiomyosarcoma. *Nature Communications* 9.
- Ciechonska M. & Duncan R. 2014. Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends in Microbiology* 22: 715–724.
- Cimini D., Howell B., Maddox P., Khodjakov A., Degross F. & Salmon E.D. 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *The Journal of Cell Biology* 153: 517–527.
- Cimini D., Cameron L.A. & Salmon E.D. 2004. Anaphase spindle mechanics prevent mis-segregation of merotelically oriented chromosomes. *Current biology: CB* 14: 2149–2155.
- Cimini D., Wan X., Hirel C.B. & Salmon E.D. 2006. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Current biology: CB* 16: 1711–1718.
- Ciriello G., Miller M.L., Aksoy B.A., Senbabaoglu Y., Schultz N. & Sander C. 2013. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics* 45: 1127–1133.

- Clark J., Rocques P.J., Crew A.J., Gill S., Shipley J., Chan A.M., Gusterson B.A. & Cooper C.S. 1994. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genetics* 7: 502–508.
- Clark J., Merson S., Jhavar S., Flohr P., Edwards S., Foster C.S., Eeles R., Martin F.L., et al. 2007. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26: 2667–2673.
- Clavel F. & Charneau P. 1994. Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles. *Journal of Virology* 68: 1179–1185.
- Clawson G.A., Kimchi E., Patrick S.D., Xin P., Harouaka R., Zheng S., Berg A., Schell T., et al. 2012. Circulating tumor cells in melanoma patients. *PloS One* 7: e41052.
- Clawson G.A., Matters G.L., Xin P., Imamura-Kawasawa Y., Du Z., Thiboutot D.M., Helm K.F., Neves R.I. & Abraham T. 2015. Macrophage-tumor cell fusions from peripheral blood of melanoma patients. *PloS One* 10: e0134320.
- Cohen F.S. & Melikyan G.B. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *The Journal of Membrane Biology* 199: 1–14.
- Coindre J.-M., Terrier P., Guillou L., Le Doussal V., Collin F., Ranchère D., Sastre X., Vilain M.-O., et al. 2001. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 91: 1914–1926.
- Coindre J.-M., Mariani O., Chibon F., Mairal A., De Saint Aubain Somerhausen N., Favre-Guillevin E., Bui N.B., Stoeckle E., et al. 2003. Most malignant fibrous histiocytomas developed in the retroperitoneum are dedifferentiated liposarcomas: a review of 25 cases initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16: 256–262.
- Coindre J.-M. 2006. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1448–1453.
- Coindre J.-M., Pédeutour F. & Aurias A. 2010. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Archiv* 456: 167–179.
- Corbel S.Y., Lee A., Yi L., Duenas J., Brazelton T.R., Blau H.M. & Rossi F.M.V. 2003. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nature Medicine* 9: 1528–1532.
- Coutifaris C., Kao L.C., Sehdev H.M., Chin U., Babalola G.O., Blaschuk O.W. & Strauss J.F. 1991. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development (Cambridge, England)* 113: 767–777.
- Coyaud E., Struski S., Prade N., Familiades J., Eichner R., Quelen C., Bousquet M., Mugneret F., et al. 2010. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique study. *Blood* 115: 3089–3097.
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., et al. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* 482: 53–58.
- Crew A.J., Clark J., Fisher C., Gill S., Grimer R., Chand A., Shipley J., Gusterson B.A. & Cooper C.S. 1995. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *The EMBO journal* 14: 2333–2340.
- Croce S., Ribeiro A., Brulard C., Noel J.-C., Amant F., Stoeckle E., Devouassoux-Shisheborah M., Floquet A., et al. 2015. Uterine smooth muscle tumor analysis by comparative genomic hybridization: a useful diagnostic tool in challenging lesions. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 28: 1001–1010.

- Croce S., Ducoulombier A., Ribeiro A., Lesluyes T., Noel J.-C., Amant F., Guillou L., Stoeckle E., et al. 2018. Genome profiling is an efficient tool to avoid the STUMP classification of uterine smooth muscle lesions: a comprehensive array-genomic hybridization analysis of 77 tumors. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 31: 816–828.
- Dai W., Wang Q., Liu T., Swamy M., Fang Y., Xie S., Mahmood R., Yang Y.-M., et al. 2004. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Research* 64: 440–445.
- Dal Cin P., Sciot R., Panagopoulos I., Aman P., Samson I., Mandahl N., Mitelman F., Van den Berghe H. & Fletcher C.D. 1997. Additional evidence of a variant translocation t(12;22) with EWS/CHOP fusion in myxoid liposarcoma: clinicopathological features. *The Journal of Pathology* 182: 437–441.
- Davies P.S., Powell A.E., Swain J.R. & Wong M.H. 2009. Inflammation and proliferation act together to mediate intestinal cell fusion. *PLoS One* 4: e6530.
- Davoli T., Denchi E.L. & Lange T. de. 2010. Persistent Telomere Damage Induces Bypass of Mitosis and Tetraploidy. *Cell* 141: 81–93.
- Davoli T., Xu A.W., Mengwasser K.E., Sack L.M., Yoon J.C., Park P.J. & Elledge S.J. 2013. Cumulative Haploinsufficiency and Triplosensitivity Drive Aneuploidy Patterns and Shape the Cancer Genome. *Cell* 155: 948–962.
- De Baetselier P., Roos E., Brys L., Remels L., Gobert M., Dekegel D., Segal S. & Feldman M. 1984. Nonmetastatic tumor cells acquire metastatic properties following somatic hybridization with normal cells. *Cancer Metastasis Reviews* 3: 5–24.
- Debant A., Serra-Pagès C., Seipel K., O'Brien S., Tang M., Park S.-H. & Streuli M. 1996. The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5466–5471.
- Dei Tos A. 2000. Liposarcoma: New entities and evolving concepts. *Annals of Diagnostic Pathology* 4: 252–266.
- Delattre O., Zucman J., Plougastel B., Desmaze C., Melot T., Peter M., Kovar H., Joubert I., et al. 1992. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359: 162–165.
- Delattre O., Zucman J., Melot T., Garau X.S., Zucker J.M., Lenoir G.M., Ambros P.F., Sheer D., et al. 1994. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *The New England Journal of Medicine* 331: 294–299.
- Delepaul L., Lesluyes T., Pérot G., Brulard C., Lartigue L., Baud J., Lagarde P., Le Guellec S., et al. 2017. Recurrent TRIO Fusion in Nontranslocation-Related Sarcomas. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 23: 857–867.
- Deng S., Azevedo M. & Baylies M. 2017. Acting on identity: Myoblast fusion and the formation of the syncytial muscle fiber. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72: 45–55.
- Derré J., Lagacé R., Nicolas A., Mairal A., Chibon F., Coindre J.-M., Terrier P., Sastre X. & Aurias A. 2001. Leiomyosarcomas and most malignant fibrous histiocytomas share very similar comparative genomic hybridization imbalances: an analysis of a series of 27 leiomyosarcomas. *Laboratory investigation* 81: 211.
- Dewannieux M., Blaise S. & Heidmann T. 2005. Identification of a functional envelope protein from the HERV-K family of human endogenous retroviruses. *Journal of Virology* 79: 15573–15577.

- Dewhurst S.M., McGranahan N., Burrell R.A., Rowan A.J., Gronroos E., Endesfelder D., Joshi T., Mouradov D., et al. 2014. Tolerance of Whole-Genome Doubling Propagates Chromosomal Instability and Accelerates Cancer Genome Evolution. *Cancer Discovery* 4: 175–185.
- Di Fiore R., D'Anneo A., Tesoriere G. & Vento R. 2013. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology* 228: 1676–1687.
- Diederichs S., Bartsch L., Berkmann J.C., Fröse K., Heitmann J., Hoppe C., Iggena D., Jazmati D., et al. 2016. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Molecular Medicine* 8: 442–457.
- Dijkstra M.D., Balm A.J., Gregor R.T., Hilgers F.J. & Loftus B.M. 1995. Soft tissue sarcomas of the head and neck associated with surgical trauma. *The Journal of Laryngology and Otology* 109: 126–129.
- Dittmar T. & Zänker K. 2015. Tissue Regeneration in the Chronically Inflamed Tumor Environment: Implications for Cell Fusion Driven Tumor Progression and Therapy Resistant Tumor Hybrid Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 30362–30381.
- Dodd R.D., Añó L., Blum J.M., Li Z., Van Mater D. & Kirsch D.G. 2015. Methods to generate genetically engineered mouse models of soft tissue sarcoma. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1267: 283–295.
- Donepudi M.S., Kondapalli K., Amos S.J. & Venkanteshan P. 2014. Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10: 506–511.
- Ducimetière F., Lurkin A., Ranchère-Vince D., Decouvelaere A.-V., Péoc'h M., Istier L., Chalabreysse P., Muller C., et al. 2011. Incidence of Sarcoma Histotypes and Molecular Subtypes in a Prospective Epidemiological Study with Central Pathology Review and Molecular Testing Najbauer J. (ed.). *PLoS ONE* 6: e20294.
- Duelli D. & Lazebnik Y. 2003. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* 3: 445–448.
- Duelli D. & Lazebnik Y. 2007. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature Reviews Cancer* 7: 968.
- Duelli D.M., Hearn S., Myers M.P. & Lazebnik Y. 2005. A primate virus generates transformed human cells by fusion. *The Journal of Cell Biology* 171: 493–503.
- Duelli D.M., Padilla-Nash H.M., Berman D., Murphy K.M., Ried T. & Lazebnik Y. 2007. A Virus Causes Cancer by Inducing Massive Chromosomal Instability through Cell Fusion. *Current Biology* 17: 431–437.
- Duensing A., Medeiros F., McConarty B., Joseph N.E., Panigrahy D., Singer S., Fletcher C.D.M., Demetri G.D. & Fletcher J.A. 2004. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 23: 3999–4006.
- Duesberg P. & Rasnick D. 2000. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 47: 81–107.
- Duesberg P., Mandrioli D., McCormack A. & Nicholson J.M. 2011. Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10: 2100–2114.
- Duncan A.W., Hickey R.D., Paulk N.K., Culbertson A.J., Olson S.B., Finegold M.J. & Grompe M. 2009. Ploidy reductions in murine fusion-derived hepatocytes. *PLoS genetics* 5: e1000385.
- Duncan A.W., Taylor M.H., Hickey R.D., Hanlon Newell A.E., Lenzi M.L., Olson S.B., Finegold M.J. & Grompe M. 2010. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. *Nature* 467: 707–710.

- Duro D., Bernard O., Della Valle V., Leblanc T., Berger R. & Larsen C.J. 1996. Inactivation of the P16INK4/MTS1 gene by a chromosome translocation t(9;14)(p21-22;q11) in an acute lymphoblastic leukemia of B-cell type. *Cancer Research* 56: 848–854.
- Durrieu-Gaillard S., Dumay-Odelot H., Boldina G., Tourasse N.J., Allard D., André F., Macari F., Choquet A., et al. 2018. Regulation of RNA polymerase III transcription during transformation of human IMR90 fibroblasts with defined genetic elements. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 17: 605–615.
- Dutrillaux B., Gerbault-Seureau M., Remvikos Y., Zafrani B. & Prieur M. 1991. Breast cancer genetic evolution: I. Data from cytogenetics and DNA content. *Breast Cancer Research and Treatment* 19: 245–255.
- Dworaczek H. & Xiao W. 2007. Xeroderma pigmentosum: a glimpse into nucleotide excision repair, genetic instability, and cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis* 13: 159–177.
- Dyson N.J. 2016. *RB1* : a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & Development* 30: 1492–1502.
- Ebauer M., Wachtel M., Niggli F.K. & Schäfer B.W. 2007. Comparative expression profiling identifies an in vivo target gene signature with TFAP2B as a mediator of the survival function of PAX3/FKHR. *Oncogene* 26: 7267–7281.
- Eguchi A., Kondoh T., Kosaka H., Suzuki T., Momota H., Masago A., Yoshida T., Taira H., et al. 2000. Identification and characterization of cell lines with a defect in a post-adsorption stage of Sendai virus-mediated membrane fusion. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 17549–17555.
- Eijnde S.M. van den, Hoff M.J. van den, Reutelingsperger C.P., Heerde W.L. van, Henfling M.E., Vermeij-Keers C., Schutte B., Borgers M. & Ramaekers F.C. 2001. Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *Journal of Cell Science* 114: 3631–3642.
- El-Rifai W., Sarlomo-Rikala M., Andersson L.C., Knuutila S. & Miettinen M. 2000. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Research* 60: 3899–3903.
- Eltzschig H.K. & Carmeliet P. 2011. Hypoxia and inflammation. *The New England Journal of Medicine* 364: 656–665.
- Ephrussi B., Davidson R.L. & Weiss M.C. 1969. Malignancy of Somatic Cell Hybrids. *Nature* 224: 1314–1315.
- Eriksson M., Hardell L., Berg N.O., Möller T. & Axelson O. 1981. Soft-tissue sarcomas and exposure to chemical substances: a case-referent study. *British Journal of Industrial Medicine* 38: 27–33.
- Eriksson M., Hardell L. & Adami H.O. 1990. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *Journal of the National Cancer Institute* 82: 486–490.
- Ertych N., Stolz A., Stenzinger A., Weichert W., Kaulfuß S., Burfeind P., Aigner A., Wordeman L. & Bastians H. 2014. Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells. *Nature Cell Biology* 16: 779–791.
- Evans J.P. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update* 8: 297–311.
- Fearon E.R. & Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759–767.
- Ferrand J., Noël D., Lehours P., Prochazkova-Carlotti M., Chambonnier L., Ménard A., Mégraud F. & Varon C. 2011. Human Bone Marrow-Derived Stem Cells Acquire Epithelial Characteristics through Fusion with Gastrointestinal Epithelial Cells Ludgate M. (ed.). *PLoS ONE* 6: e19569.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. & Mavilio F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science (New York, N.Y.)* 279: 1528–1530.

- Fiorino C. & Harrison R.E. 2016. E-cadherin is important for cell differentiation during osteoclastogenesis. *Bone* 86: 106–118.
- Fletcher C.D.M., Weltgesundheitsorganisation & International Agency for Research on Cancer (eds.). 2013. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone*. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Flynn R.L., Cox K.E., Jeitany M., Wakimoto H., Bryll A.R., Ganem N.J., Bersani F., Pineda J.R., et al. 2015. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science (New York, N.Y.)* 347: 273–277.
- Fortuna M.B., Dewey M.J. & Furmanski P. 1989. Cell fusion in tumor development and progression: occurrence of cell fusion in primary methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 44: 731–737.
- Fröhling S. & Döhner H. 2008. Chromosomal abnormalities in cancer. *New England Journal of Medicine* 359: 722–734.
- Fujiwara T., Bandi M., Nitta M., Ivanova E.V., Bronson R.T. & Pellman D. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437: 1043–1047.
- Furlong M.A., Mentzel T. & Fanburg-Smith J.C. 2001. Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: a clinicopathologic study of 38 cases with emphasis on morphologic variants and recent skeletal muscle-specific markers. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14: 595–603.
- Galili N., Davis R.J., Fredericks W.J., Mukhopadhyay S., Rauscher F.J., Emanuel B.S., Rovera G. & Barr F.G. 1993. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics* 5: 230–235.
- Galipeau P.C., Cowan D.S., Sanchez C.A., Barrett M.T., Emond M.J., Levine D.S., Rabinovitch P.S. & Reid B.J. 1996. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7081–7084.
- Ganem N.J., Storchova Z. & Pellman D. 2007. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 157–162.
- Ganem N.J., Godinho S.A. & Pellman D. 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460: 278–282.
- Ganem N.J., Cornils H., Chiu S.-Y., O'Rourke K.P., Arnaud J., Yimlamai D., Théry M., Camargo F.D. & Pellman D. 2014. Cytokinesis Failure Triggers Hippo Tumor Suppressor Pathway Activation. *Cell* 158: 833–848.
- Gao Q., Liang W.-W., Foltz S.M., Mutharasu G., Jayasinghe R.G., Cao S., Liao W.-W., Reynolds S.M., et al. 2018. Driver Fusions and Their Implications in the Development and Treatment of Human Cancers. *Cell Reports* 23: 227-238.e3.
- Garraway L.A. & Lander E.S. 2013. Lessons from the Cancer Genome. *Cell* 153: 17–37.
- Garsed D.W., Marshall O.J., Corbin V.D.A., Hsu A., Di Stefano L., Schröder J., Li J., Feng Z.-P., et al. 2014. The Architecture and Evolution of Cancer Neochromosomes. *Cancer Cell* 26: 653–667.
- Gebhard S., Coindre J.-M., Michels J.-J., Terrier P., Bertrand G., Trassard M., Taylor S., Château M.-C., et al. 2002. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *The American Journal of Surgical Pathology* 26: 601–616.

- Georgadaki K., Khoury N., Spandidos D.A. & Zoumpourlis V. 2016. The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 38: 979–986.
- Gerbaud P. & Pidoux G. 2015. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* 36 Suppl 1: S35–42.
- Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Math M., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., et al. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine* 366: 883–892.
- Gerlinger M., McGranahan N., Dewhurst S.M., Burrell R.A., Tomlinson I. & Swanton C. 2014. Cancer: Evolution Within a Lifetime. *Annual Review of Genetics* 48: 215–236.
- Ghosh S. & Paweletz N. 1987. Centrosome-kinetochore interaction in multinucleate cells. *Chromosoma* 95: 136–143.
- Giam M. & Rancati G. 2015. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Division* 10.
- Gibault L., Pérot G., Chibon F., Bonnin S., Lagarde P., Terrier P., Coindre J.-M. & Aurias A. 2011. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *The Journal of Pathology* 223: 64–71.
- Gibson A.J., Karasinski J., Relvas J., Moss J., Sherratt T.G., Strong P.N. & Watt D.J. 1995. Dermal fibroblasts convert to a myogenic lineage in mdx mouse muscle. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 1): 207–214.
- Gladdy R.A., Qin L.-X., Moraco N., Edgar M.A., Antonescu C.R., Alektiar K.M., Brennan M.F. & Singer S. 2010. Do radiation-associated soft tissue sarcomas have the same prognosis as sporadic soft tissue sarcomas? *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28: 2064–2069.
- Godinho S.A. & Pellman D. 2014. Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369: 20130467–20130467.
- Goldenberg D.M., Pavia R.A. & Tsao M.C. 1974. In vivo hybridisation of human tumour and normal hamster cells. *Nature* 250: 649–651.
- Goldenberg D.M., Zagzag D., Heselmeyer-Haddad K.M., Berroa Garcia L.Y., Ried T., Loo M., Chang C.-H. & Gold D.V. 2012. Horizontal transmission and retention of malignancy, as well as functional human genes, after spontaneous fusion of human glioblastoma and hamster host cells in vivo. *International Journal of Cancer* 131: 49–58.
- Gong R., Peng X., Kang S., Feng H., Huang J., Zhang W., Lin D., Tien P. & Xiao G. 2005. Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 1193–1200.
- Gordon A., McManus A., Anderson J., Fisher C., Abe S., Nojima T., Pritchard-Jones K. & Shipley J. 2003. Chromosomal imbalances in pleomorphic rhabdomyosarcomas and identification of the alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX3-FOXO1A fusion gene in one case. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 140: 73–77.
- Götz H. & Goldenberg D.M. 1968. Antigenic characterization of a heterotransplanted human tumour, GW-127. *Experientia* 24: 957–958.
- Griffin D.E. 2010. Measles virus-induced suppression of immune responses: Measles virus-induced immunosuppression. *Immunological Reviews* 236: 176–189.

- Groffen J., Stephenson J., Heisterkamp N., Deklein A., Bartram C. & Grosveld G. 1984. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36: 93–99.
- Guillotin D. & Martin S.A. 2014. Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy. *Experimental Cell Research* 329: 110–115.
- Guillou L. & Aurias A. 2010. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Archiv* 456: 201–217.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., Buzney E.A., Khan M.K., Flint A.F., Kunkel L.M. & Mulligan R.C. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390–394.
- Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R., Meyerrose T., Nolte J.A., Gilgoff I., Stein J., Chan Y.-M., et al. 2002. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *The Journal of Clinical Investigation* 110: 807–814.
- Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.L., Brooks M.W. & Weinberg R.A. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464–468.
- Hahn W.C., Dessain S.K., Brooks M.W., King J.E., Elenbaas B., Sabatini D.M., DeCaprio J.A. & Weinberg R.A. 2002. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Molecular and Cellular Biology* 22: 2111–2123.
- Haldar M., Hancock J.D., Coffin C.M., Lessnick S.L. & Capocchi M.R. 2007. A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer Cell* 11: 375–388.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)* 279: 509–514.
- Han Z.-Y., Richer W., Fréneaux P., Chauvin C., Lucchesi C., Guillemot D., Grison C., Lequin D., et al. 2016. The occurrence of intracranial rhabdoid tumours in mice depends on temporal control of Smarcb1 inactivation. *Nature Communications* 7: 10421.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674.
- Hanks S., Coleman K., Reid S., Plaja A., Firth H., Fitzpatrick D., Kidd A., Méhes K., et al. 2004. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nature Genetics* 36: 1159–1161.
- Hansemann D. 1890. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin* 119: 299–326.
- Harris H. & Watkins J.F. 1965. HYBRID CELLS DERIVED FROM MOUSE AND MAN: ARTIFICIAL HETEROKARYONS OF MAMMALIAN CELLS FROM DIFFERENT SPECIES. *Nature* 205: 640–646.
- Harris H., Miller O.J., Klein G., Worst P. & Tachibana T. 1969. Suppression of Malignancy by Cell Fusion. *Nature* 223: 363–368.
- Harris H. 1971. The Croonian Lecture, 1971: Cell Fusion and the Analysis of Malignancy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 179: 1–20.
- Harris H. 1993. How tumour suppressor genes were discovered. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7: 978–979.
- Hasle H., Clemmensen I.H. & Mikkelsen M. 2000. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet (London, England)* 355: 165–169.

- Hastings P.J., Lupski J.R., Rosenberg S.M. & Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews. Genetics* 10: 551–564.
- Haurie V., Durrieu-Gaillard S., Dumay-Odelot H., Da Silva D., Rey C., Prochazkova M., Roeder R.G., Besser D. & Teichmann M. 2010. Two isoforms of human RNA polymerase III with specific functions in cell growth and transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 4176–4181.
- Heinrich M.C., Rubin B.P., Longley B.J. & Fletcher J.A. 2002. Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Human Pathology* 33: 484–495.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., McGreevey L., Chen C.-J., Joseph N., Singer S., Griffith D.J., et al. 2003a. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science (New York, N.Y.)* 299: 708–710.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Demetri G.D., Blanke C.D., Mehren M. von, Joensuu H., McGreevey L.S., Chen C.-J., et al. 2003b. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21: 4342–4349.
- Helleday T., Eshtad S. & Nik-Zainal S. 2014. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nature Reviews Genetics* 15: 585–598.
- Hernández J.M. & Podbilewicz B. 2017. The hallmarks of cell-cell fusion. *Development* 144: 4481–4495.
- Hernando E., Charytonowicz E., Dudas M.E., Menendez S., Matushansky I., Mills J., Socci N.D., Behrendt N., et al. 2007. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nature Medicine* 13: 748–753.
- Hillmer A.M., Yao F., Inaki K., Lee W.H., Ariyaratne P.N., Teo A.S.M., Woo X.Y., Zhang Z., et al. 2011. Comprehensive long-span paired-end-tag mapping reveals characteristic patterns of structural variations in epithelial cancer genomes. *Genome Research* 21: 665–675.
- Hirota S. 1998. Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science* 279: 577–580.
- Hofvander J., Tayebwa J., Nilsson J., Magnusson L., Brosjö O., Larsson O., Vult von Steyern F., Mandahl N., et al. 2015. Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21: 864–869.
- Holland A.J. & Cleveland D.W. 2012. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nature Medicine* 18: 1630–1638.
- Honoré C., Méus P., Stoeckle E. & Bonvalot S. 2015. Soft tissue sarcoma in France in 2015: Epidemiology, classification and organization of clinical care. *Journal of Visceral Surgery* 152: 223–230.
- Hornick J.L., Bosenberg M.W., Mentzel T., McMenamin M.E., Oliveira A.M. & Fletcher C.D.M. 2004. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic analysis of 57 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 28: 1257–1267.
- Horváth G., Serru V., Clay D., Billard M., Boucheix C. & Rubinstein E. 1998. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 30537–30543.
- Hosaka Y. 1988. Sendai virion structure and its interaction with cellular membranes. *Electron Microscopy Reviews* 1: 17–38.
- Howitt B.E., Shukla S.A., Sholl L.M., Ritterhouse L.L., Watkins J.C., Rodig S., Stover E., Strickland K.C., et al. 2015. Association of Polymerase ϵ -Mutated and Microsatellite-Unstable Endometrial Cancers With

- Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA oncology* 1: 1319–1323.
- Hu L., Plafker K., Vorozhko V., Zuna R.E., Hanigan M.H., Gorbysky G.J., Plafker S.M., Angeletti P.C. & Ceresa B.P. 2009. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology* 384: 125–134.
- Huang T.T. & Yanagimachi R. 1985. Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *The American Journal of Anatomy* 174: 249–268.
- Ikehata H. & Ono T. 2011. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* 52: 115–125.
- Inaki K. & Liu E.T. 2012. Structural mutations in cancer: mechanistic and functional insights. *Trends in Genetics* 28: 550–559.
- Inoue N., Ikawa M., Isotani A. & Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434: 234–238.
- Iranzo J., Martincorena I. & Koonin E.V. 2018. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E6010–E6019.
- Italiano A., Bianchini L., Keslair F., Bonnafous S., Cardot-Leccia N., Coindre J.-M., Dumollard J.-M., Hofman P., et al. 2008. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *International Journal of Cancer* 122: 2233–2241.
- Iwanaga Y., Chi Y.-H., Miyazato A., Sheleg S., Haller K., Peloponese J.-M., Li Y., Ward J.M., et al. 2007. Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. *Cancer Research* 67: 160–166.
- Jeganathan K., Malureanu L., Baker D.J., Abraham S.C. & Deursen J.M. van. 2007. Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *The Journal of Cell Biology* 179: 255–267.
- Jemaà M., Abdallah S., Lledo G., Perrot G., Lesluyes T., Teyssier C., Roux P., Dijk J. van, et al. 2017. Heterogeneity in sarcoma cell lines reveals enhanced motility of tetraploid versus diploid cells. *Oncotarget* 8: 16669–16689.
- Jeong J. & Conboy I.M. 2011. Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414: 9–13.
- Jing W., Lan T., Chen H., Zhang Z., Chen M., Peng R., He X. & Zhang H. 2018. Amplification of FRS2 in atypical lipomatous tumour/well-differentiated liposarcoma and de-differentiated liposarcoma: a clinicopathological and genetic study of 146 cases. *Histopathology* 72: 1145–1155.
- Johansson C.B., Youssef S., Koleckar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S.Y., Steinman L., Rossi F.M.V. & Blau H.M. 2008. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nature Cell Biology* 10: 575–583.
- Johnson M.H., Eager D., Muggleton-Harris A. & Grave H.M. 1975. Mosaicism in organisation concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature* 257: 321–322.
- Johnson R.T. & Rao P.N. 1970. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226: 717–722.
- Kaji K. & Kudo A. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)* 127: 423–429.

- Kalitsis P., Fowler K.J., Griffiths B., Earle E., Chow C.W., Jansen K. & Choo K.H.A. 2005. Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice. *Genes, Chromosomes & Cancer* 44: 29–36.
- Kang J.S., Gao M., Feinleib J.L., Cotter P.D., Guadagno S.N. & Krauss R.S. 1997. CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *The Journal of Cell Biology* 138: 203–213.
- Kang J.S., Mulieri P.J., Miller C., Sassoon D.A. & Krauss R.S. 1998. CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *The Journal of Cell Biology* 143: 403–413.
- Kang J.-S., Feinleib J.L., Knox S., Ketteringham M.A. & Krauss R.S. 2003. Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3989–3994.
- Kastenhuber E.R. & Lowe S.W. 2017. Putting p53 in Context. *Cell* 170: 1062–1078.
- Kawamata N., Pennella M.A., Woo J.L., Berk A.J. & Koeffler H.P. 2012. Dominant-negative mechanism of leukemogenic PAX5 fusions. *Oncogene* 31: 966–977.
- Kim J.H. & Kim N. 2014. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *Journal of Bone Metabolism* 21: 233.
- Kim N.-G., Kim J.J., Ahn J.-Y., Seong C.-M., Noh S.H., Kim C.B., Min J.S. & Kim H. 2000. Putative chromosomal deletions on 9p, 9q and 22q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors. *International Journal of Cancer* 85: 633–638.
- Kim R. & Guo J. 2010. Systematic analysis of short internal indels and their impact on protein folding. *BMC structural biology* 10: 24.
- Kirsch D.G., Dinulescu D.M., Miller J.B., Grimm J., Santiago P.M., Young N.P., Nielsen G.P., Quade B.J., et al. 2007. A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nature Medicine* 13: 992–997.
- Kleyman M., Kabeche L. & Compton D.A. 2014. STAG2 promotes error correction in mitosis by regulating kinetochore-microtubule attachments. *Journal of Cell Science* 127: 4225–4233.
- Klimstra D.S. & Longnecker D.S. 1994. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *The American Journal of Pathology* 145: 1547–1550.
- Knezevich S.R., McFadden D.E., Tao W., Lim J.F. & Sorensen P.H. 1998. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nature Genetics* 18: 184–187.
- Knouse K.A., Wu J., Whittaker C.A. & Amon A. 2014. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 13409–13414.
- Knudson A.G. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 820–823.
- Knutton S. 1979. Studies of membrane fusion. III. Fusion of erythrocytes with polyethylene glycol. *Journal of Cell Science* 36: 61–72.
- Koelle D.M., Huang M.L., Chandran B., Vieira J., Piepkorn M. & Corey L. 1997. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *The Journal of Infectious Diseases* 176: 94–102.

- Koelsche C., Renner M., Johann P., Leiss I., Sahn F., Schimmack S., Wardelmann E., Renker E.-K., et al. 2016. Differential nuclear ATRX expression in sarcomas. *Histopathology* 68: 738–745.
- Kovacs G. 1985. Premature chromosome condensation: evidence for in vivo cell fusion in human malignant tumours. *International journal of cancer* 36: 637–641.
- Krauss R.S., Joseph G.A. & Goel A.J. 2017. Keep Your Friends Close: Cell–Cell Contact and Skeletal Myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9: a029298.
- Krontiris T.G. & Cooper G.M. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 1181–1184.
- Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones S.J. & Marra M.A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research* 19: 1639–1645.
- Kuppili Venkata S., Repana D., Nulsen J., Dressler L., Bortolomeazzi M., Tourna A., Yakovleva A., Palmieri T. & Ciccarelli F.D. 2018. The Network of Cancer Genes (NCG): a comprehensive catalogue of known and candidate cancer genes from cancer sequencing screens.
- Kuznetsova A.Y., Seget K., Moeller G.K., Pagter M.S. de, Roos J.A.D.M. de, Dürrbaum M., Kuffer C., Müller S., et al. 2015. Chromosomal instability, tolerance of mitotic errors and multidrug resistance are promoted by tetraploidization in human cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 14: 2810–2820.
- Kyriakides T.R., Foster M.J., Keeney G.E., Tsai A., Giachelli C.M., Clark-Lewis I., Rollins B.J. & Bornstein P. 2004. The CC Chemokine Ligand, CCL2/MCP1, Participates in Macrophage Fusion and Foreign Body Giant Cell Formation. *The American Journal of Pathology* 165: 2157–2166.
- Lafuste P., Sonnet C., Chazaud B., Dreyfus P.A., Gherardi R.K., Wewer U.M. & Authier F.-J. 2005. ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Molecular Biology of the Cell* 16: 861–870.
- Lagarde P., Perot G., Kauffmann A., Brulard C., Dapremont V., Hostein I., Neuville A., Wozniak A., et al. 2012. Mitotic Checkpoints and Chromosome Instability Are Strong Predictors of Clinical Outcome in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clinical Cancer Research* 18: 826–838.
- Lagarde P., Przybyl J., Brulard C., Pérot G., Pierron G., Delattre O., Sciot R., Wozniak A., et al. 2013. Chromosome Instability Accounts for Reverse Metastatic Outcomes of Pediatric and Adult Synovial Sarcomas. *Journal of Clinical Oncology* 31: 608–615.
- Lagarde P., Brulard C., Pérot G., Mauduit O., Delespaul L., Neuville A., Stoeckle E., Le Guellec S., et al. 2015. Stable Instability of Sarcoma Cell Lines Genome Despite Intra-Tumoral Heterogeneity: A Genomic and Transcriptomic Study of Sarcoma Cell Lines. *Austin J Genet Genomic Res.*
- Lartigue L., Neuville A., Lagarde P., Brulard C., Rutkowski P., Tos P.D., Wardelmann E., Debiec-Rychter M., et al. 2015. Genomic index predicts clinical outcome of intermediate-risk gastrointestinal stromal tumours, providing a new inclusion criterion for imatinib adjuvant therapy. *European Journal of Cancer* 51: 75–83.
- Lasota J., Dansonka-Mieszkowska A., Sobin L.H. & Miettinen M. 2004. A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 84: 874–883.
- Laurin M., Fradet N., Blangy A., Hall A., Vuori K. & Côté J.-F. 2008. The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15446–15451.
- Lazebnik Y. 2014. The shock of being united and symphiliosis: Another lesson from plants? *Cell Cycle* 13: 2323–2329.

- Lazova R., LaBerge G.S., Duvall E., Spoelstra N., Klump V., Sznol M., Cooper D., Spritz R.A., et al. 2013. A Melanoma Brain Metastasis with a Donor-Patient Hybrid Genome following Bone Marrow Transplantation: First Evidence for Fusion in Human Cancer Mezey E. (ed.). *PLoS ONE* 8: e66731.
- Lentz B.R. 1994. Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events. *Chemistry and Physics of Lipids* 73: 91–106.
- Lessnick S.L., Dacwag C.S. & Golub T.R. 2002. The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts. *Cancer Cell* 1: 393–401.
- Levine D.S., Rabinovitch P.S., Haggitt R.C., Blount P.L., Dean P.J., Rubin C.E. & Reid B.J. 1991. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* 101: 1198–1210.
- Li F.P. & Fraumeni J.F. 1969. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Annals of Internal Medicine* 71: 747–752.
- Liau J.-Y., Lee J.-C., Tsai J.-H., Yang C.-Y., Liu T.-L., Ke Z.-L., Hsu H.-H. & Jeng Y.-M. 2015. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Modern Pathology* 28: 1545–1554.
- Lieber M.R., Yu K. & Raghavan S.C. 2006. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA repair* 5: 1234–1245.
- Lin P.P., Pandey M.K., Jin F., Raymond A.K., Akiyama H. & Lozano G. 2009. Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis* 30: 1789–1795.
- Lluis F. & Cosma M.P. 2010. Cell-fusion-mediated somatic-cell reprogramming: a mechanism for tissue regeneration. *Journal of Cellular Physiology* 223: 6–13.
- Losick V.P., Fox D.T. & Spradling A.C. 2013. Polyploidization and Cell Fusion Contribute to Wound Healing in the Adult *Drosophila* Epithelium. *Current Biology* 23: 2224–2232.
- Lu M. & Krauss R.S. 2010. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 4212–4217.
- Lu X. & Kang Y. 2009. Efficient acquisition of dual metastasis organotropism to bone and lung through stable spontaneous fusion between MDA-MB-231 variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9385–9390.
- Ly P. & Cleveland D.W. 2017. Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends in Cell Biology* 27: 917–930.
- Lyden T.W., Ng A.K. & Rote N.S. 1993. Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* 14: 177–186.
- MacCarthy A., Bayne A.M., Brownbill P.A., Bunch K.J., Diggins N.L., Draper G.J., Hawkins M.M., Jenkinson H.C., et al. 2013. Second and subsequent tumours among 1927 retinoblastoma patients diagnosed in Britain 1951–2004. *British Journal of Cancer* 108: 2455–2463.
- Maciejowski J., Li Y., Bosco N., Campbell P.J. & Lange T. de. 2015. Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell* 163: 1641–1654.
- Maciejowski J. & Lange T. de. 2017. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18: 175–186.

- Maehama T. & Dixon J.E. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 13375–13378.
- Mairal A., Chibon F., Rousselet A., Couturier J., Terrier P. & Aurias A. 2000. Establishment of a human malignant fibrous histiocytoma cell line, COMA. Characterization By conventional cytogenetics, comparative genomic hybridization, and multiplex fluorescence In situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 121: 117–123.
- Malassiné A., Blaise S., Handschuh K., Lalucque H., Dupressoir A., Evain-Brion D. & Heidmann T. 2007. Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28: 185–191.
- Mani R.-S., Tomlins S.A., Callahan K., Ghosh A., Nyati M.K., Varambally S., Palanisamy N. & Chinnaiyan A.M. 2009. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)* 326: 1230.
- Mao X., Boyd L.K., Yáñez-Muñoz R.J., Chaplin T., Xue L., Lin D., Shan L., Berney D.M., et al. 2011. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *American Journal of Cancer Research* 1: 604–617.
- Mariani O., Brennetot C., Coindre J.-M., Gruel N., Ganem C., Delattre O., Stern M.-H. & Aurias A. 2007. JUN Oncogene Amplification and Overexpression Block Adipocytic Differentiation in Highly Aggressive Sarcomas. *Cancer Cell* 11: 361–374.
- Marioni J.C., Mason C.E., Mane S.M., Stephens M. & Gilad Y. 2008. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Research* 18: 1509–1517.
- Martincorena I., Raine K.M., Gerstung M., Dawson K.J., Haase K., Van Loo P., Davies H., Stratton M.R. & Campbell P.J. 2017. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell* 171: 1029–1041.e21.
- Marzec P., Armenise C., Pérot G., Roumelioti F.-M., Basyuk E., Gagos S., Chibon F. & Déjardin J. 2015. Nuclear-Receptor-Mediated Telomere Insertion Leads to Genome Instability in ALT Cancers. *Cell* 160: 913–927.
- Matheu A., Maraver A. & Serrano M. 2008. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Research* 68: 6031–6034.
- May W.A., Gishizky M.L., Lessnick S.L., Lunsford L.B., Lewis B.C., Delattre O., Zucman J., Thomas G. & Denny C.T. 1993. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 5752–5756.
- McClain K.L., Leach C.T., Jenson H.B., Joshi V.V., Pollock B.H., Parmley R.T., DiCarlo F.J., Chadwick E.G. & Murphy S.B. 1995. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *The New England Journal of Medicine* 332: 12–18.
- McClintock B. 1951. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 16: 13–47.
- McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science (New York, N.Y.)* 226: 792–801.
- McGranahan N. & Swanton C. 2015. Biological and Therapeutic Impact of Intratumor Heterogeneity in Cancer Evolution. *Cancer Cell* 27: 15–26.

- McHugh K.P., Hodivala-Dilke K., Zheng M.-H., Namba N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F.P., et al. 2000. Mice lacking $\beta 3$ integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *Journal of Clinical Investigation* 105: 433–440.
- McInnes A. 1988. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *Journal of Experimental Medicine* 167: 598–611.
- McNally A.K. & Anderson J.M. 2002. $\beta 1$ and $\beta 2$ Integrins Mediate Adhesion during Macrophage Fusion and Multinucleated Foreign Body Giant Cell Formation. *The American Journal of Pathology* 160: 621–630.
- McPherson A., Hormozdiari F., Zayed A., Giuliany R., Ha G., Sun M.G.F., Griffith M., Heravi Moussavi A., et al. 2011. deFuse: an algorithm for gene fusion discovery in tumor RNA-Seq data. *PLoS computational biology* 7: e1001138.
- Mechtersheimer G., Otaño-Joos M., Ohl S., Benner A., Lehnert T., Willeke F., Möller P., Otto H.F., et al. 1999. Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 25: 362–369.
- Mehta A. & Haber J.E. 2014. Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: a016428–a016428.
- Mentzel T., Calonje E., Wadden C., Camplejohn R.S., Beham A., Smith M.A. & Fletcher C.D. 1996. Myxofibrosarcoma. Clinicopathologic analysis of 75 cases with emphasis on the low-grade variant. *The American Journal of Surgical Pathology* 20: 391–405.
- Meraldi P., Honda R. & Nigg E.A. 2004. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Current Opinion in Genetics & Development* 14: 29–36.
- Mertens F., Panagopoulos I. & Mandahl N. 2010. Genomic characteristics of soft tissue sarcomas. *Virchows Archiv* 456: 129–139.
- Mertens F., Johansson B., Fioretos T. & Mitelman F. 2015. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nature Reviews Cancer* 15: 371–381.
- Mertens F., Antonescu C.R. & Mitelman F. 2016. Gene fusions in soft tissue tumors: Recurrent and overlapping pathogenetic themes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 55: 291–310.
- Mi S., Lee X., Li X., Veldman G.M., Finnerty H., Racie L., LaVallie E., Tang X.Y., et al. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403: 785–789.
- Miake-Lye R. & Kirschner M.W. 1985. Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell* 41: 165–175.
- Mian A.A., Oancea C., Zhao Z., Ottmann O.G. & Ruthardt M. 2009. Oligomerization inhibition, combined with allosteric inhibition, abrogates the transformation potential of T315I-positive BCR/ABL. *Leukemia* 23: 2242–2247.
- Michel L.S., Liberal V., Chatterjee A., Kirchwegger R., Pasche B., Gerald W., Dobles M., Sorger P.K., et al. 2001. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409: 355–359.
- Miettinen M. & Lasota J. 2006. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1466–1478.
- Millay D.P., O'Rourke J.R., Sutherland L.B., Bezprozvannaya S., Shelton J.M., Bassel-Duby R. & Olson E.N. 2013. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499: 301–305.
- Miller D.G. 1980. On the nature of susceptibility to cancer. The presidential address. *Cancer* 46: 1307–1318.

- Miller F.R., McInerney D., Rogers C. & Miller B.E. 1988. Spontaneous fusion between metastatic mammary tumor subpopulations. *Journal of Cellular Biochemistry* 36: 129–136.
- Miller F.R., Mohamed A.N. & McEachern D. 1989. Production of a more aggressive tumor cell variant by spontaneous fusion of two mouse tumor subpopulations. *Cancer Research* 49: 4316–4321.
- Miller J.A. & Miller E.C. 1968. The Metabolic Activation of Carcinogenic Aromatic Amines and Amides 1. In: *Progress in Tumor Research*, S. Karger AG, pp. 273–301.
- Miller J.A. & Miller E.C. 1975. Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutation Research* 33: 25–26.
- Miller J.A. & Miller E.C. 1976. Carcinogens occurring naturally in foods. *Federation Proceedings* 35: 1316–1321.
- Miller J.A. & Miller E.C. 1983a. Some historical aspects of N-aryl carcinogens and their metabolic activation. *Environmental Health Perspectives* 49: 3–12.
- Miller J.A. & Miller E.C. 1983b. The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *British Journal of Cancer* 48: 1–15.
- Mitelman F., Johansson B. & Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews Cancer* 7: 233–245.
- Miyamoto H., Katsuyama E., Miyauchi Y., Hoshi H., Miyamoto K., Sato Y., Kobayashi T., Iwasaki R., et al. 2012. An Essential Role for STAT6-STAT1 Protein Signaling in Promoting Macrophage Cell-Cell Fusion. *Journal of Biological Chemistry* 287: 32479–32484.
- Mohr M., Zaenker K.S. & Dittmar T. 2015. Fusion in Cancer: An Explanatory Model for Aneuploidy, Metastasis Formation, and Drug Resistance. In: Pfannkuche K. (ed.), *Cell Fusion*, Springer New York, New York, NY, pp. 21–40.
- Moreno J.L., Mikhailenko I., Tondravi M.M. & Keegan A.D. 2007. IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. *Journal of Leukocyte Biology* 82: 1542–1553.
- Morgan E.M., Re G.G. & Kingsbury D.W. 1984. Complete sequence of the Sendai virus NP gene from a cloned insert. *Virology* 135: 279–287.
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L. & Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5: 621–628.
- Mothes W., Sherer N.M., Jin J. & Zhong P. 2010. Virus cell-to-cell transmission. *Journal of Virology* 84: 8360–8368.
- Mullins J.M. & Biesele J.J. 1977. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *The Journal of Cell Biology* 73: 672–684.
- Nakayama R., Nemoto T., Takahashi H., Ohta T., Kawai A., Seki K., Yoshida T., Toyama Y., et al. 2007. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20: 749–759.
- Nambiar M., Kari V. & Raghavan S.C. 2008. Chromosomal translocations in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1786: 139–152.
- Naylor R.M. & Deursen J.M. van. 2016. Aneuploidy in Cancer and Aging. *Annual Review of Genetics* 50: 45–66.

- Neuville A. & Coindre J.-M. 2013. Sarcomas, example of a pathologist network organization. *Bulletin du Cancer*: 1275–1281.
- Neuville A., Chibon F. & Coindre J.-M. 2014. Grading of soft tissue sarcomas: from histological to molecular assessment. *Pathology* 46: 113–120.
- Nigg E.A. & Stearns T. 2011. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biology* 13: 1154–1160.
- Nik-Zainal S., Alexandrov L.B., Wedge D.C., Van Loo P., Greenman C.D., Raine K., Jones D., Hinton J., et al. 2012. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* 149: 979–993.
- Noubissi F.K., Harkness T., Alexander C.M. & Ogle B.M. 2015. Apoptosis-induced cancer cell fusion: a mechanism of breast cancer metastasis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29: 4036–4045.
- Nowell P.C. & Hungerford D. 1960. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*.
- Nowell P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)* 194: 23–28.
- Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Säwén P., Röhl W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K. & Jacobsen S.E.W. 2004. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine* 10: 494–501.
- Nygren J.M., Liuba K., Breitbach M., Stott S., Thorén L., Roell W., Geisen C., Sasse P., et al. 2008. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nature Cell Biology* 10: 584–592.
- O'Brien K.P., Seroussi E., Dal Cin P., Sciort R., Mandahl N., Fletcher J.A., Turc-Carel C. & Dumanski J.P. 1998. Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant-cell fibroblastomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* 23: 187–193.
- Ogle B.M., Cascalho M. & Platt J.L. 2005. Biological implications of cell fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 567–575.
- Ognjanovic S., Olivier M., Bergemann T.L. & Hainaut P. 2012. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer* 118: 1387–1396.
- Ogura K., Hosoda F., Arai Y., Nakamura H., Hama N., Totoki Y., Yoshida A., Nagai M., et al. 2018. Integrated genetic and epigenetic analysis of myxofibrosarcoma. *Nature Communications* 9: 2765.
- Olaharski A.J., Sotelo R., Solorza-Luna G., Gonshebbatt M.E., Guzman P., Mohar A. & Eastmond D.A. 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27: 337–343.
- O'Leary T., Ernst S., Przygodzki R., Emory T. & Sobin L. 1999. Loss of heterozygosity at 1p36 predicts poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 79: 1461–1467.
- O'Neil J. & Look A.T. 2007. Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* 26: 6838–6849.
- Orbach D., Mosseri V., Pissaloux D., Pierron G., Brennan B., Ferrari A., Chibon F., Bisogno G., et al. 2018. Genomic complexity in pediatric synovial sarcomas (Synobio study): the European pediatric soft tissue sarcoma group (EpSSG) experience. *Cancer Medicine* 7: 1384–1393.

- Otaño-Joos M., Mechttersheimer G., Ohl S., Wilgenbus K.K., Scheurlen W., Lehnert T., Willeke F., Otto H.F., et al. 2000. Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. *Cytogenetics and Cell Genetics* 90: 86–92.
- Ozawa M. 2015. E-cadherin cytoplasmic domain inhibits cell surface localization of endogenous cadherins and fusion of C2C12 myoblasts. *Biology Open* 4: 1427–1435.
- Ozercan I.H., Okur M.I., Coskun F. & Yildirim A.M. 2004. Malignant fibrous histiocytoma and squamous carcinoma derived from a burn scar. *Acta Chirurgica Belgica* 104: 745–747.
- Pajcini K.V., Pomerantz J.H., Alkan O., Doyonnas R. & Blau H.M. 2008. Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *The Journal of Cell Biology* 180: 1005–1019.
- Parham D.M. & Ellison D.A. 2006. Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1454–1465.
- Patel K.J., Yu V.P.C., Lee H., Corcoran A., Thistlethwaite F.C., Evans M.J., Colledge W.H., Friedman L.S., et al. 1998. Involvement of Brca2 in DNA Repair. *Molecular Cell* 1: 347–357.
- Pawelek J.M., Chakraborty A.K., Rachkovsky M.L., Orlow S.J., Bolognia J.L. & Sodi S.A. 1999. Altered N-glycosylation in macrophage x melanoma fusion hybrids. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 45: 1011–1027.
- Pawelek J.M. & Chakraborty A.K. 2008. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nature Reviews Cancer* 8: 377.
- Pedeutour F., Suijkerbuijk R.F., Forus A., Van Gaal J., Van de Klundert W., Coindre J.M., Nicolo G., Collin F., 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: 85–94.
- Pedeutour F., Simon M.P., Minoletti F., Barcelo G., Terrier-Lacombe M.J., Combemale P., Sozzi G., Ayraud N. & Turc-Carel C. 1996. Translocation, t(17;22)(q22;q13), in dermatofibrosarcoma protuberans: a new tumor-associated chromosome rearrangement. *Cytogenetics and Cell Genetics* 72: 171–174.
- Pereira M., Petretto E., Gordon S., Bassett J.H.D., Williams G.R. & Behmoaras J. 2018. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *Journal of Cell Science* 131: jcs216267.
- Pérez-Vargas J., Krey T., Valansi C., Avinoam O., Haouz A., Jamin M., Raveh-Barak H., Podbilewicz B. & Rey F.A. 2014. Structural Basis of Eukaryotic Cell-Cell Fusion. *Cell* 157: 407–419.
- Pérot G., Derré J., Coindre J.-M., Tirode F., Lucchesi C., Mariani O., Gibault L., Guillou L., et al. 2009. Strong smooth muscle differentiation is dependent on myocardin gene amplification in most human retroperitoneal leiomyosarcomas. *Cancer Research* 69: 2269–2278.
- Pérot G., Chibon F., Montero A., Lagarde P., Thé H. de, Terrier P., Guillou L., Ranchère D., et al. 2010. Constant p53 Pathway Inactivation in a Large Series of Soft Tissue Sarcomas with Complex Genetics. *The American Journal of Pathology* 177: 2080–2090.
- Pierron G., Tirode F., Lucchesi C., Reynaud S., Ballet S., Cohen-Gogo S., Perrin V., Coindre J.-M. & Delattre O. 2012. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nature Genetics* 44: 461–466.
- Pilotti S., Della Torre G., Lavarino C., Sozzi G., Minoletti F., Vergani B., Azzarelli A., Rilke F. & Pierotti M.A. 1998. Molecular abnormalities in liposarcoma: role of MDM2 and CDK4-containing amplicons at 12q13-22. *The Journal of Pathology* 185: 188–190.
- Piquer-Gil M., García-Verdugo J.M., Zipancic I., Sánchez M.J. & Alvarez-Dolado M. 2009. Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29: 480–485.

- Podbilewicz B. 2014. Virus and Cell Fusion Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 111–139.
- Pol R.A., Dannenberg H., Robertus J.-L. & Ginkel R.J. van. 2012. Cutaneous leiomyosarcoma arising in a smallpox scar. *World Journal of Surgical Oncology* 10: 148.
- Pon J.R. & Marra M.A. 2015. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10: 25–50.
- Popova T., Manie E., Rieunier G., Caux-Moncoutier V., Tirapo C., Dubois T., Delattre O., Sigal-Zafrani B., et al. 2012. Ploidy and Large-Scale Genomic Instability Consistently Identify Basal-like Breast Carcinomas with BRCA1/2 Inactivation. *Cancer Research* 72: 5454–5462.
- Pötgens A.J.G., Drewlo S., Kokozidou M. & Kaufmann P. 2004. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action. *Human Reproduction Update* 10: 487–496.
- Quinn M.E., Goh Q., Kurosaka M., Gamage D.G., Petrany M.J., Prasad V. & Millay D.P. 2017. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nature Communications* 8: 15665.
- Rachkovsky M., Sodi S., Chakraborty A., Avissar Y., Bolognia J., McNiff J.M., Platt J., Bermudes D. & Pawelek J. 1998. Melanoma x macrophage hybrids with enhanced metastatic potential. *Clinical & Experimental Metastasis* 16: 299–312.
- Radice G.L., Rayburn H., Matsunami H., Knudsen K.A., Takeichi M. & Hynes R.O. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology* 181: 64–78.
- Radomska H.S. & Eckhardt L.A. 1995. Mammalian cell fusion in an electroporation device. *Journal of Immunological Methods* 188: 209–217.
- Rai M., Katti P. & Nongthomba U. 2016. Spatio-temporal coordination of cell cycle exit, fusion and differentiation of adult muscle precursors by *Drosophila* Erect wing (Ewg). *Mechanisms of Development* 141: 109–118.
- Ramakrishnan M., Mathur S.R. & Mukhopadhyay A. 2013. Fusion-derived epithelial cancer cells express hematopoietic markers and contribute to stem cell and migratory phenotype in ovarian carcinoma. *Cancer Research* 73: 5360–5370.
- Rao P.N. & Johnson R.T. 1970. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159–164.
- Rao P.N. & Johnson R.T. 1972. Premature chromosome condensation: a mechanism for the elimination of chromosomes in virus-fused cells. *Journal of Cell Science* 10: 495–513.
- Rappa G., Mercapide J. & Lorico A. 2012. Spontaneous formation of tumorigenic hybrids between breast cancer and multipotent stromal cells is a source of tumor heterogeneity. *The American Journal of Pathology* 180: 2504–2515.
- Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E. & Barbacid M. 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300: 149–152.
- Relvas J.B., Aldridge H., Wells K.E., Wells D.J. & Watt D.J. 1997. Exogenous genes are expressed in mdx muscle fibres following implantation of primary mouse skin cells. *Basic App. Myol.*: 211–219.
- Ren X., Tu C., Tang Z., Ma R. & Li Z. 2018. Alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Oncology Letters* 15: 7489–7496.

- Renard M., Varela P.F., Letzelter C., Duquerroy S., Rey F.A. & Heidmann T. 2005. Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. *Journal of Molecular Biology* 352: 1029–1034.
- Ried T., Knutzen R., Steinbeck R., Blegen H., Schröck E., Heselmeyer K., Manoir S. du & Auer G. 1996. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* 15: 234–245.
- Rifai W. el-, Sarlomo-Rikala M., Miettinen M., Knuutila S. & Andersson L.C. 1996. DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research* 56: 3230–3233.
- Riscal R., Schrepfer E., Arena G., Cissé M.Y., Bellvert F., Heuillet M., Rambow F., Bonneil E., et al. 2016. Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53. *Molecular Cell* 62: 890–902.
- Rizvi A.Z., Swain J.R., Davies P.S., Bailey A.S., Decker A.D., Willenbring H., Grompe M., Fleming W.H. & Wong M.H. 2006. Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6321–6325.
- Robbiani D.F. & Nussenzweig M.C. 2013. Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Annual Review of Pathology* 8: 79–103.
- Robinson D.R., Wu Y.-M., Kalyana-Sundaram S., Cao X., Lonigro R.J., Sung Y.-S., Chen C.-L., Zhang L., et al. 2013. Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nature Genetics* 45: 180–185.
- Roldan E.R.S. & Shi Q.X. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12: 89–104.
- Roukos V., Voss T.C., Schmidt C.K., Lee S., Wangsa D. & Misteli T. 2013. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science (New York, N.Y.)* 341: 660–664.
- Rowald K., Mantovan M., Passos J., Buccitelli C., Mardin B.R., Korbel J.O., Jechlinger M. & Sotillo R. 2016. Negative Selection and Chromosome Instability Induced by Mad2 Overexpression Delay Breast Cancer but Facilitate Oncogene-Independent Outgrowth. *Cell Reports* 15: 2679–2691.
- Rubin B.P., Singer S., Tsao C., Duensing A., Lux M.L., Ruiz R., Hibbard M.K., Chen C.J., et al. 2001. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research* 61: 8118–8121.
- Rubin B.P., Heinrich M.C. & Corless C.L. 2007. Gastrointestinal stromal tumour. *The Lancet* 369: 1731–1741.
- Ruebner M., Strissel P.L., Langbein M., Fahlbusch F., Wachter D.L., Faschingbauer F., Beckmann M.W. & Strick R. 2010. Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88: 1143–1156.
- Runge K.E., Evans J.E., He Z.-Y., Gupta S., McDonald K.L., Stahlberg H., Primakoff P. & Myles D.G. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental Biology* 304: 317–325.
- Rutledge S.D., Douglas T.A., Nicholson J.M., Vila-Casadesús M., Kantzler C.L., Wangsa D., Barroso-Vilares M., Kale S.D., et al. 2016. Selective advantage of trisomic human cells cultured in non-standard conditions. *Scientific Reports* 6.
- Sá Martins J.S. 2000. Simulated coevolution in a mutating ecology. *Physical Review. E, Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* 61: R2212-2215.

- Salsman J., Top D., Barry C. & Duncan R. 2008. A virus-encoded cell-cell fusion machine dependent on surrogate adhesins. *PLoS pathogens* 4: e1000016.
- Sampath S.C., Sampath S.C. & Millay D.P. 2018. Myoblast fusion confusion: the resolution begins. *Skeletal Muscle* 8: 3.
- Sanges D., Romo N., Simonte G., Di Vicino U., Tahoces A.D., Fernández E. & Cosma M.P. 2013. Wnt/ β -Catenin Signaling Triggers Neuron Reprogramming and Regeneration in the Mouse Retina. *Cell Reports* 4: 271–286.
- Sansregret L. & Swanton C. 2017. The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7: a028373.
- Sansregret L., Vanhaesebroeck B. & Swanton C. 2018. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 15: 139–150.
- Santaguida S., Vasile E., White E. & Amon A. 2015. Aneuploidy-induced cellular stresses limit autophagic degradation. *Genes & Development* 29: 2010–2021.
- Schaefer I.-M., Wang Y., Liang C.-W., Bahri N., Quattrone A., Doyle L., Mariño-Enríquez A., Lauria A., et al. 2017. MAX inactivation is an early event in GIST development that regulates p16 and cell proliferation. *Nature Communications* 8: 14674.
- Schukken K.M. & Fojter F. 2018. CIN and Aneuploidy: Different Concepts, Different Consequences. *BioEssays* 40: 1700147.
- Schumacher T.N. & Hacohen N. 2016. Neoantigens encoded in the cancer genome. *Current Opinion in Immunology* 41: 98–103.
- Schwander M., Leu M., Stumm M., Dorchies O.M., Ruegg U.T., Schittny J. & Müller U. 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Developmental Cell* 4: 673–685.
- Searles S.C., Santosa E.K. & Bui J.D. 2018. Cell-cell fusion as a mechanism of DNA exchange in cancer. *Oncotarget* 9: 6156.
- Segal N.H., Pavlidis P., Antonescu C.R., Maki R.G., Noble W.S., DeSantis D., Woodruff J.M., Lewis J.J., et al. 2003. Classification and Subtype Prediction of Adult Soft Tissue Sarcoma by Functional Genomics. *The American Journal of Pathology* 163: 691–700.
- Serov O.L., Matveeva N.M. & Khabarova A.A. 2011. Reprogramming Mediated by Cell Fusion Technology. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*, Elsevier, pp. 155–190.
- Seyfried T.N. & Huysentruyt L.C. 2013. On the origin of cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 18: 43–73.
- Shabo I., Stål O., Olsson H., Doré S. & Svanvik J. 2008. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *International Journal of Cancer* 123: 780–786.
- Sheltzer J.M., Ko J.H., Replogle J.M., Habibe Burgos N.C., Chung E.S., Meehl C.M., Sayles N.M., Passerini V., et al. 2017. Single-chromosome Gains Commonly Function as Tumor Suppressors. *Cancer Cell* 31: 240–255.
- Sherlock D.J., Rickards H., Gardecki T.I. & Hamer J.D. 1987. Development of a sarcoma in a surgical scar. *Postgraduate Medical Journal* 63: 1097–1098.
- Shi Q. & King R.W. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437: 1038–1042.

- Shih C., Padhy L.C., Murray M. & Weinberg R.A. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290: 261–264.
- Shioda T., Hidaka Y., Kanda T., Shibuta H., Nomoto A. & Iwasaki K. 1983. Sequence of 3,687 nucleotides from the 3' end of Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequences of viral NP, P and C proteins. *Nucleic Acids Research* 11: 7317–7330.
- Silk A.D., Zasadil L.M., Holland A.J., Vitre B., Cleveland D.W. & Weaver B.A. 2013. Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E4134–E4141.
- Simillion C., Vandepoele K., Van Montagu M.C.E., Zabeau M. & Van de Peer Y. 2002. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13627–13632.
- Sodi S.A., Chakraborty A.K., Platt J.T., Kolesnikova N., Rosemblat S., Keh-Yen A., Bolognia J.L., Rachkovsky M.L., et al. 1998. Melanoma x macrophage fusion hybrids acquire increased melanogenesis and metastatic potential: altered N-glycosylation as an underlying mechanism. *Pigment Cell Research* 11: 299–309.
- Søe K., Andersen T.L., Hobolt-Pedersen A.-S., Bjerregaard B., Larsson L.-I. & Delaissé J.-M. 2011. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone* 48: 837–846.
- Sohn R.L., Huang P., Kawahara G., Mitchell M., Guyon J., Kalluri R., Kunkel L.M. & Gussoni E. 2009. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9274–9279.
- Solomon D.A., Kim T., Diaz-Martinez L.A., Fair J., Elkahloun A.G., Harris B.T., Toretsky J.A., Rosenberg S.A., et al. 2011. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science (New York, N.Y.)* 333: 1039–1043.
- Song K., Zhu F., Zhang H. & Shang Z. 2012. Tumor necrosis factor- α enhanced fusions between oral squamous cell carcinoma cells and endothelial cells via VCAM-1/VLA-4 pathway. *Experimental Cell Research* 318: 1707–1715.
- Sørensen S.A., Mulvihill J.J. & Nielsen A. 1986. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *The New England Journal of Medicine* 314: 1010–1015.
- Sotillo R., Hernando E., Díaz-Rodríguez E., Teruya-Feldstein J., Córdón-Cardo C., Lowe S.W. & Benezra R. 2007. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 11: 9–23.
- Soto M., Raaijmakers J.A., Bakker B., Spierings D.C.J., Lansdorp P.M., Foijer F. & Medema R.H. 2017. p53 Prohibits Propagation of Chromosome Segregation Errors that Produce Structural Aneuploidies. *Cell Reports* 19: 2423–2431.
- Sottile F., Alicino F., Theka I. & Cosma M.P. 2016. Mesenchymal stem cells generate distinct functional hybrids in vitro via cell fusion or entosis. *Scientific Reports* 6.
- Squire J.A., Park P.C., Yoshimoto M., Alami J., Williams J.L., Evans A. & Joshua A.M. 2011. Prostate cancer as a model system for genetic diversity in tumors. *Advances in Cancer Research* 112: 183–216.
- Stanbridge E.J. 1976. Suppression of malignancy in human cells. *Nature* 260: 17–20.
- Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., Lau K.W., et al. 2011. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144: 27–40.

- Stingele S., Stoehr G., Peplowska K., Cox J., Mann M. & Storchova Z. 2012. Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Molecular Systems Biology* 8.
- Storchová Z., Breneman A., Cande J., Dunn J., Burbank K., O'Toole E. & Pellman D. 2006. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* 443: 541–547.
- Storlazzi C.T., Von Steyern F.V., Domanski H.A., Mandahl N. & Mertens F. 2005. Biallelic somatic inactivation of the NF1 gene through chromosomal translocations in a sporadic neurofibroma. *International Journal of Cancer* 117: 1055–1057.
- Stratton M.R., Campbell P.J. & Futreal P.A. 2009. The cancer genome. *Nature* 458: 719–724.
- Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R. & Chang E.H. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300: 143–149.
- Takaesu G., Kang J.-S., Bae G.-U., Yi M.-J., Lee C.M., Reddy E.P. & Krauss R.S. 2006. Activation of p38alpha/beta MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *The Journal of Cell Biology* 175: 383–388.
- Tanaka K., Goto H., Nishimura Y., Kasahara K., Mizoguchi A. & Inagaki M. 2018. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging. *Cancer Science*.
- Tanaka S., Takahashi N., Udagawa N., Tamura T., Akatsu T., Stanley E.R., Kurokawa T. & Suda T. 1993. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *Journal of Clinical Investigation* 91: 257–263.
- Tang Y.-C., Williams B.R., Siegel J.J. & Amon A. 2011. Identification of Aneuploidy-Selective Antiproliferation Compounds. *Cell* 144: 499–512.
- Taylor B.S., Barretina J., Maki R.G., Antonescu C.R., Singer S. & Ladanyi M. 2011. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* 11: 541–557.
- Thompson S.L. & Compton D.A. 2008. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *The Journal of Cell Biology* 180: 665–672.
- Thompson S.L. & Compton D.A. 2011. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 17974–17978.
- Tirode F., Laud-Duval K., Prieur A., Delorme B., Charbord P. & Delattre O. 2007. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11: 421–429.
- Tirode F., Surdez D., Ma X., Parker M., Le Deley M.C., Bahrami A., Zhang Z., Lapouble E., et al. 2014. Genomic Landscape of Ewing Sarcoma Defines an Aggressive Subtype with Co-Association of STAG2 and TP53 Mutations. *Cancer Discovery* 4: 1342–1353.
- Tran P., Ho S.-M., Kim B.-G., Vuong T.A., Leem Y.-E., Bae G.-U. & Kang J.-S. 2012. TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) interact with the promyogenic receptor Cdo to promote myogenic differentiation via activation of p38MAPK pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 11602–11615.
- Trojani M., Contesso G., Coindre J.M., Rouesse J., Bui N.B., Mascarel A. de, Goussot J.F., David M., et al. 1984. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *International Journal of Cancer* 33: 37–42.
- Tsumura H., Yoshida T., Saito H., Imanaka-Yoshida K. & Suzuki N. 2006. Cooperation of oncogenic K-ras and p53 deficiency in pleomorphic rhabdomyosarcoma development in adult mice. *Oncogene* 25: 7673–7679.

- Turajlic S. & Swanton C. 2016. Metastasis as an evolutionary process. *Science (New York, N.Y.)* 352: 169–175.
- Turc-Carel C., Philip I., Berger M.P., Philip T. & Lenoir G. 1983. [Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma]. *Comptes rendus des seances de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 296: 1101–1103.
- Turc-Carel C., Lizard-Nacol S., Justrabo E., Favrot M., Philip T. & Tabone E. 1986. Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 19: 361–362.
- Turner G., Barbulescu M., Su M., Jensen-Seaman M.I., Kidd K.K. & Lenz J. 2001. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Current biology: CB* 11: 1531–1535.
- Valansi C., Moi D., Leikina E., Matveev E., Graña M., Chernomordik L.V., Romero H., Aguilar P.S. & Podbilewicz B. 2017. Arabidopsis HAP2/GCS1 is a gamete fusion protein homologous to somatic and viral fusogens. *The Journal of Cell Biology* 216: 571–581.
- Van Mater D., Añó L., Blum J.M., Webster M.T., Huang W., Williams N., Ma Y., Cardona D.M., et al. 2015. Acute tissue injury activates satellite cells and promotes sarcoma formation via the HGF/c-MET signaling pathway. *Cancer Research* 75: 605–614.
- Vassilopoulos G., Wang P.-R. & Russell D.W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422: 901–904.
- Vasyutina E., Martarelli B., Brakebusch C., Wende H. & Birchmeier C. 2009. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8935–8940.
- Venkatesan S. & Swanton C. 2016. Tumor Evolutionary Principles: How Intratumor Heterogeneity Influences Cancer Treatment and Outcome. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* 35: e141-149.
- Vignery A. 2005. Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *The Journal of Experimental Medicine* 202: 337–340.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. & Kinzler K.W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)* 339: 1546–1558.
- Wakeling W.F., Greetham J. & Bennett D.C. 1994. Efficient spontaneous fusion between some co-cultured cells, especially murine melanoma cells. *Cell Biology International* 18: 207–210.
- Walker D. 1975a. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* 190: 784–785.
- Walker D. 1975b. Spleen cells transmit osteopetrosis in mice. *Science* 190: 785–787.
- Wang J., Wang M. & Liu J.M. 2004. Domains involved in ETO and human N-CoR interaction and ETO transcription repression. *Leukemia Research* 28: 409–414.
- Wang J., Yi S., Zhou J., Zhang Y. & Guo F. 2016. The NF-κB subunit RelB regulates the migration and invasion abilities and the radio-sensitivity of prostate cancer cells. *International Journal of Oncology* 49: 381–392.
- Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., et al. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897–901.
- Wardelmann E., Losen I., Hans V., Neidt I., Speidel N., Bierhoff E., Heinicke T., Pietsch T., et al. 2003. Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *International Journal of Cancer* 106: 887–895.

- Watson J.D. & Crick F.H. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737–738.
- Watson S., Perrin V., Guillemot D., Reynaud S., Coindre J.-M., Karanian M., Guinebretière J.-M., Freneaux P., et al. 2018. Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *The Journal of Pathology* 245: 29–40.
- Weaver B.A.A., Silk A.D., Montagna C., Verdier-Pinard P. & Cleveland D.W. 2007. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* 11: 25–36.
- Weir B.A., Woo M.S., Getz G., Perner S., Ding L., Beroukhi R., Lin W.M., Province M.A., et al. 2007. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 450: 893–898.
- Wenzel E.S. & Singh A.T.K. 2018. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo (Athens, Greece)* 32: 1–5.
- White J.M., Delos S.E., Brecher M. & Schornberg K. 2008. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43: 189–219.
- Willan R.J. 1930. Sarcoma and trauma. *British Journal of Surgery* 18: 321–325.
- Willems S.M., Debiec-Rychter M., Szuhai K., Hogendoorn P.C.W. & Sciot R. 2006. Local recurrence of myxofibrosarcoma is associated with increase in tumour grade and cytogenetic aberrations, suggesting a multistep tumour progression model. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19: 407–416.
- Williams B.R., Prabhu V.R., Hunter K.E., Glazier C.M., Whittaker C.A., Housman D.E. & Amon A. 2008. Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science* 322: 703–709.
- Willkomm L. & Bloch W. 2015. State of the art in cell–cell fusion. In: *Cell Fusion*, Springer, pp. 1–19.
- Woodham E.F. & Machesky L.M. 2014. Polarised cell migration: intrinsic and extrinsic drivers. *Current Opinion in Cell Biology* 30: 25–32.
- Wu Z., Woodring P.J., Bhakta K.S., Tamura K., Wen F., Feramisco J.R., Karin M., Wang J.Y. & Puri P.L. 2000. p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Molecular and Cellular Biology* 20: 3951–3964.
- Yagi M., Miyamoto T., Toyama Y. & Suda T. 2006. Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 24: 355–358.
- Yan B., Wang J. & Liu L. 2016. Chemotherapy promotes tumour cell hybridization in vivo. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37: 5025–5030.
- Yang B., Li X., Lei L. & Chen J. 2017. APOBEC: From mutator to editor. *Journal of Genetics and Genomics* 44: 423–437.
- Yang C.-Y., Liao J.-Y., Huang W.-J., Chang Y.-T., Chang M.-C., Lee J.-C., Tsai J.-H., Su Y.-N., et al. 2015. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *American Journal of Translational Research* 7: 2072–2081.
- Yilmaz Y., Lazova R., Qumsiyeh M., Cooper D. & Pawelek J. 2005. Donor Y chromosome in renal carcinoma cells of a female BMT recipient: visualization of putative BMT-tumor hybrids by FISH. *Bone Marrow Transplantation* 35: 1021–1024.

- Ylipää A., Hunt K.K., Yang J., Lazar A.J.F., Torres K.E., Lev D.C., Nykter M., Pollock R.E., et al. 2011. Integrative genomic characterization and a genomic staging system for gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 117: 380–389.
- Yoshihara K., Wang Q., Torres-Garcia W., Zheng S., Vegesna R., Kim H. & Verhaak R.G.W. 2015. The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. *Oncogene* 34: 4845–4854.
- Yusuf F. & Brand-Saberi B. 2012. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochemistry and Cell Biology* 138: 187–199.
- Zack T.I., Schumacher S.E., Carter S.L., Cherniack A.D., Saksena G., Tabak B., Lawrence M.S., Zhang C.-Z., et al. 2013. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nature Genetics* 45: 1134–1140.
- Zellmer V.R. & Zhang S. 2014. Evolving concepts of tumor heterogeneity. *Cell & Bioscience* 4: 69.
- Zhang Q., Vashisht A.A., O'Rourke J., Corbel S.Y., Moran R., Romero A., Miraglia L., Zhang J., et al. 2017. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature Communications* 8: 15664.
- Zhao S., Zhang Y., Gordon W., Quan J., Xi H., Du S., Schack D. von & Zhang B. 2015. Comparison of stranded and non-stranded RNA-seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genomics* 16.
- Zhong P., Agosto L.M., Munro J.B. & Mothes W. 2013. Cell-to-cell transmission of viruses. *Current Opinion in Virology* 3: 44–50.
- Zhou X., Merchak K., Lee W., Grande J.P., Cascalho M. & Platt J.L. 2015. Cell Fusion Connects Oncogenesis with Tumor Evolution. *The American Journal of Pathology* 185: 2049–2060.
- Zöller M.E., Rembeck B., Odén A., Samuelsson M. & Angervall L. 1997. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. *Cancer* 79: 2125–2131.

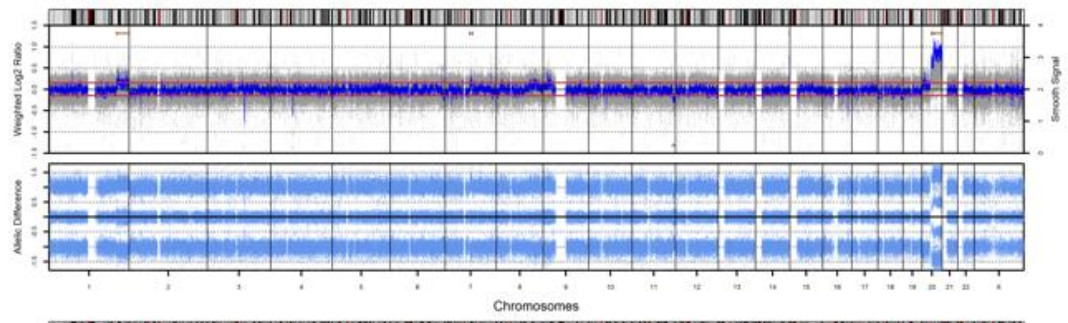
Annexes

L'ensemble des profils génomiques de la partie « Implication du cycle cellulaire dans la formation d'altérations dans les hybrides » sont présentés ci-dessous.

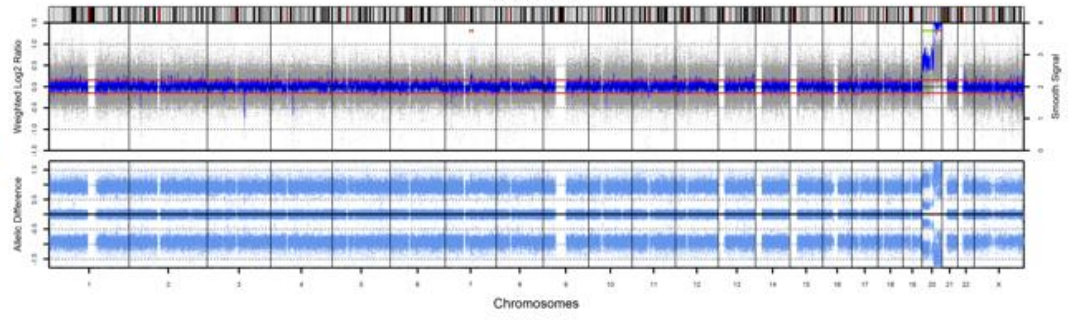
Pour chaque profil, l'axe des abscisses représentent les chromosomes de 1 à Y. Pour la partie supérieure, l'axe des ordonnées indiquent le ratio \log_2 indiquant la quantité d'ADN de la lignée d'intérêt comparé à un ADN de référence. La ligne bleue indique le Signal lissé. L'axe des ordonnées de la partie inférieure représente le ratio allélique

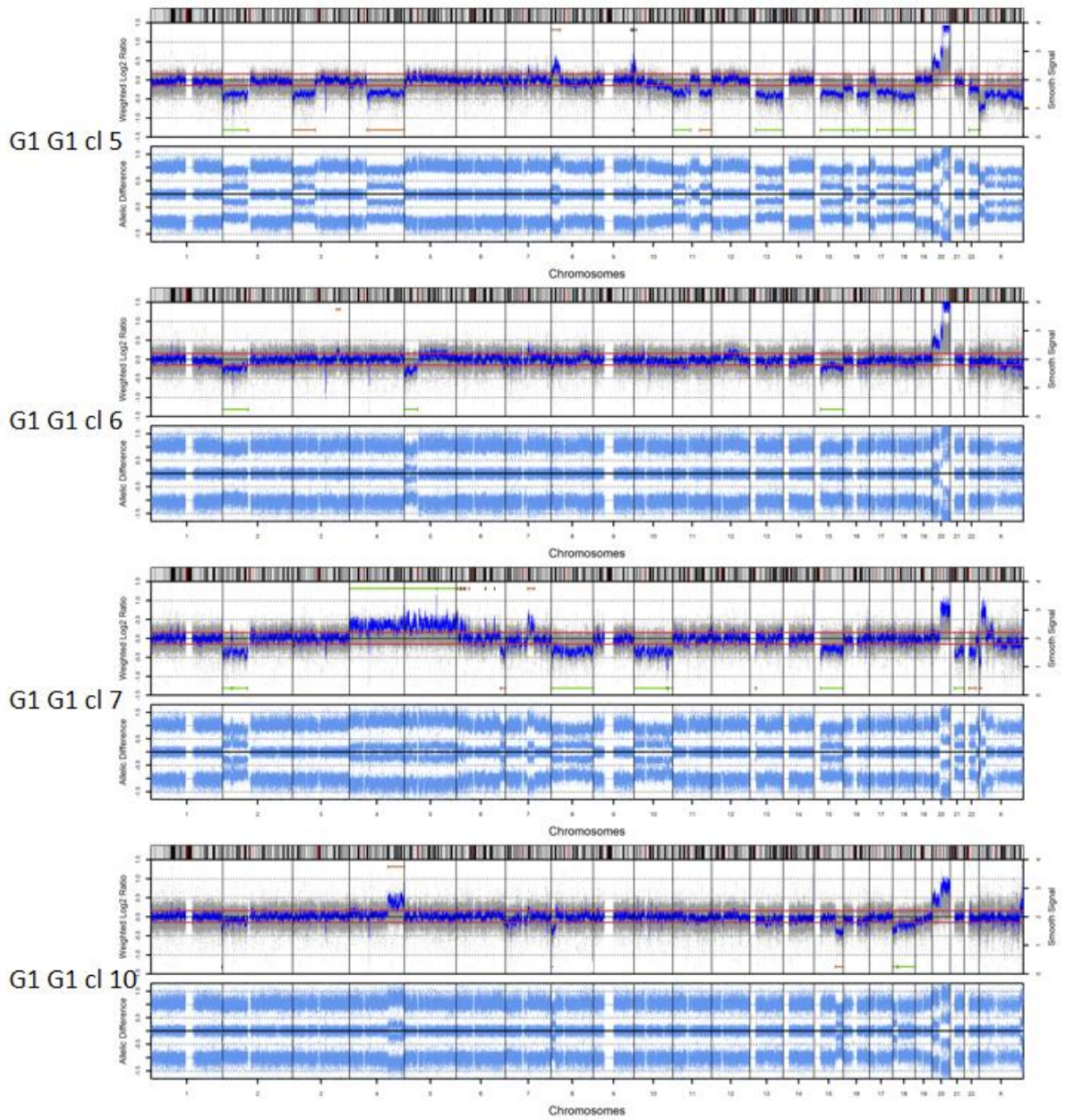
Les segments en vert indiquent les régions présentant une altération de type « B » et en rouge celles présentant une altération de types « R ».

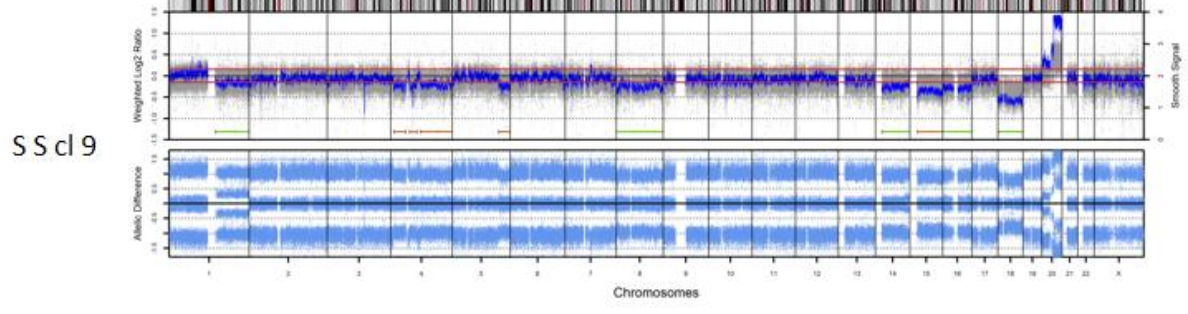
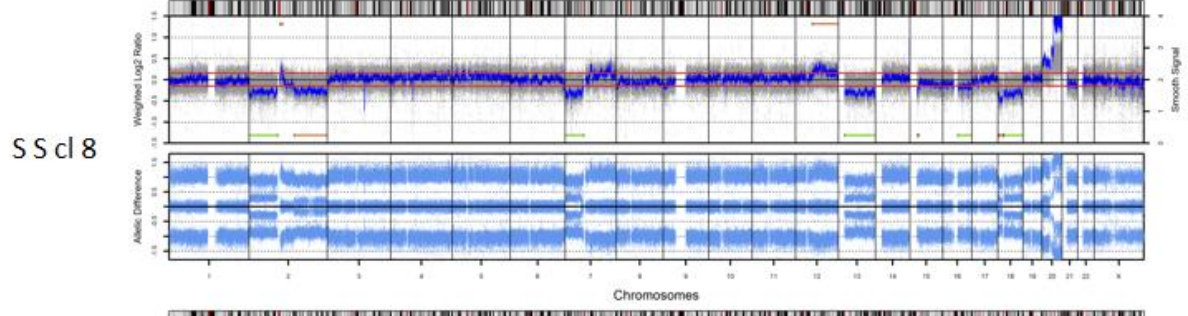
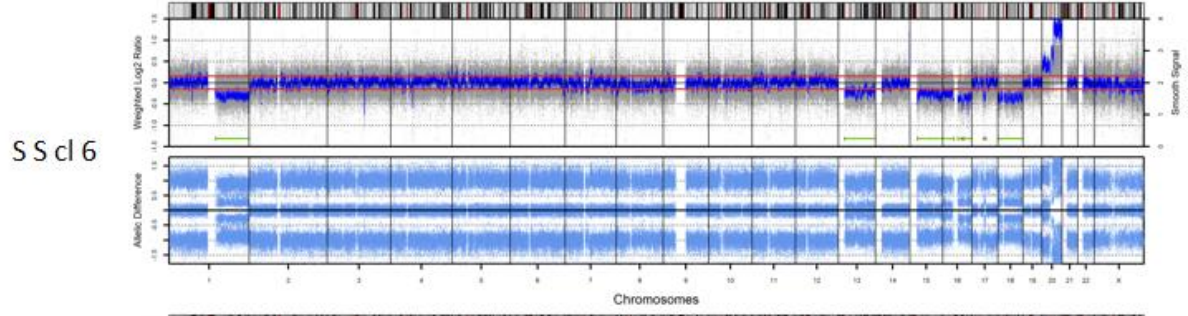
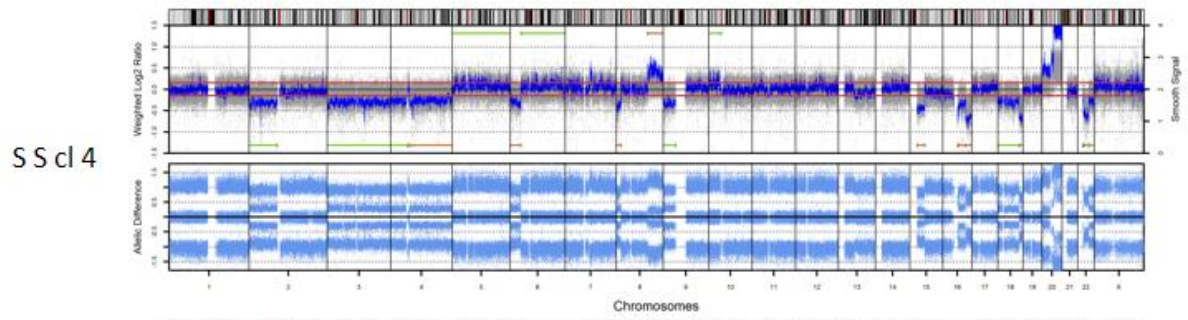
RST
Tomato

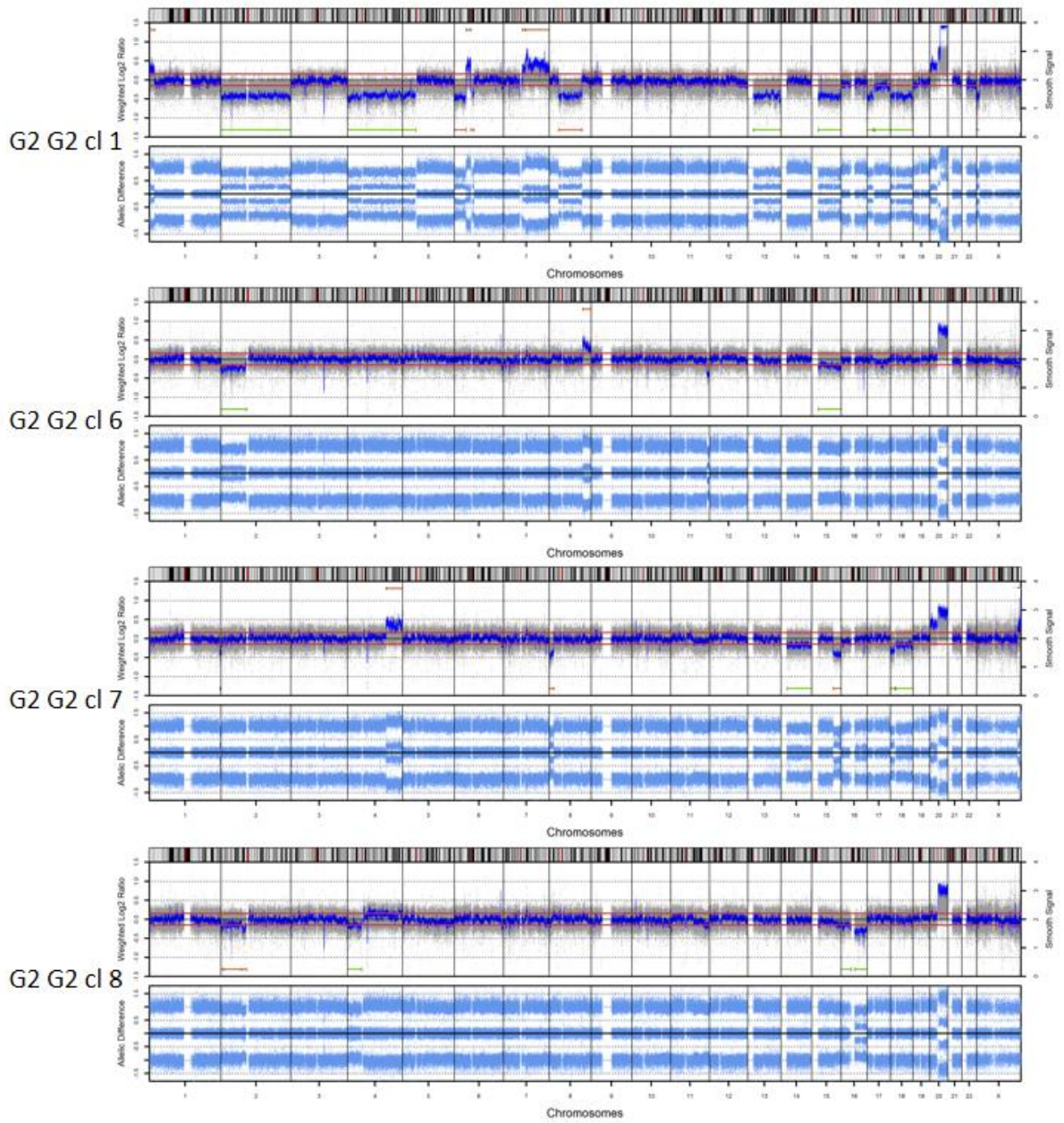


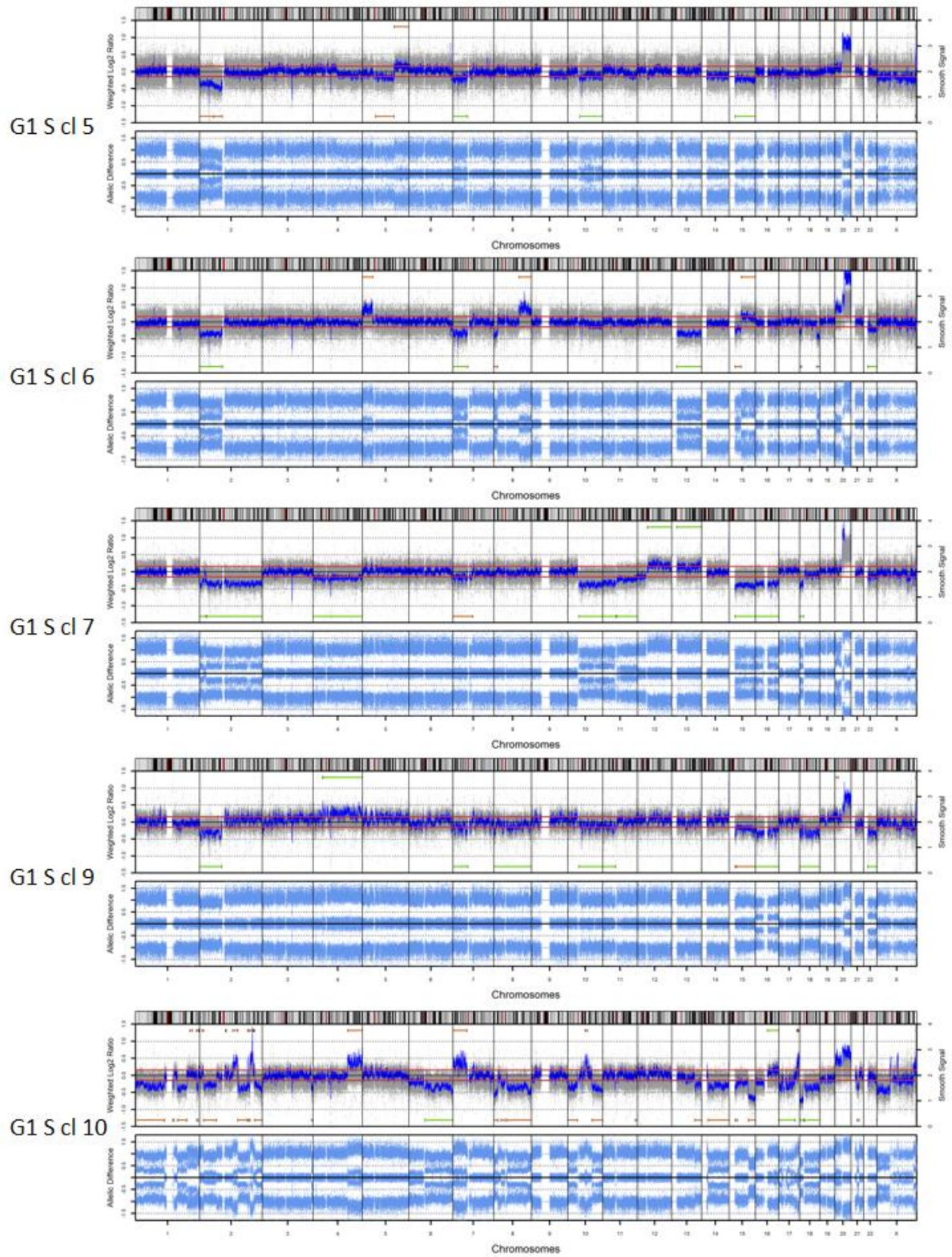
RST GFP

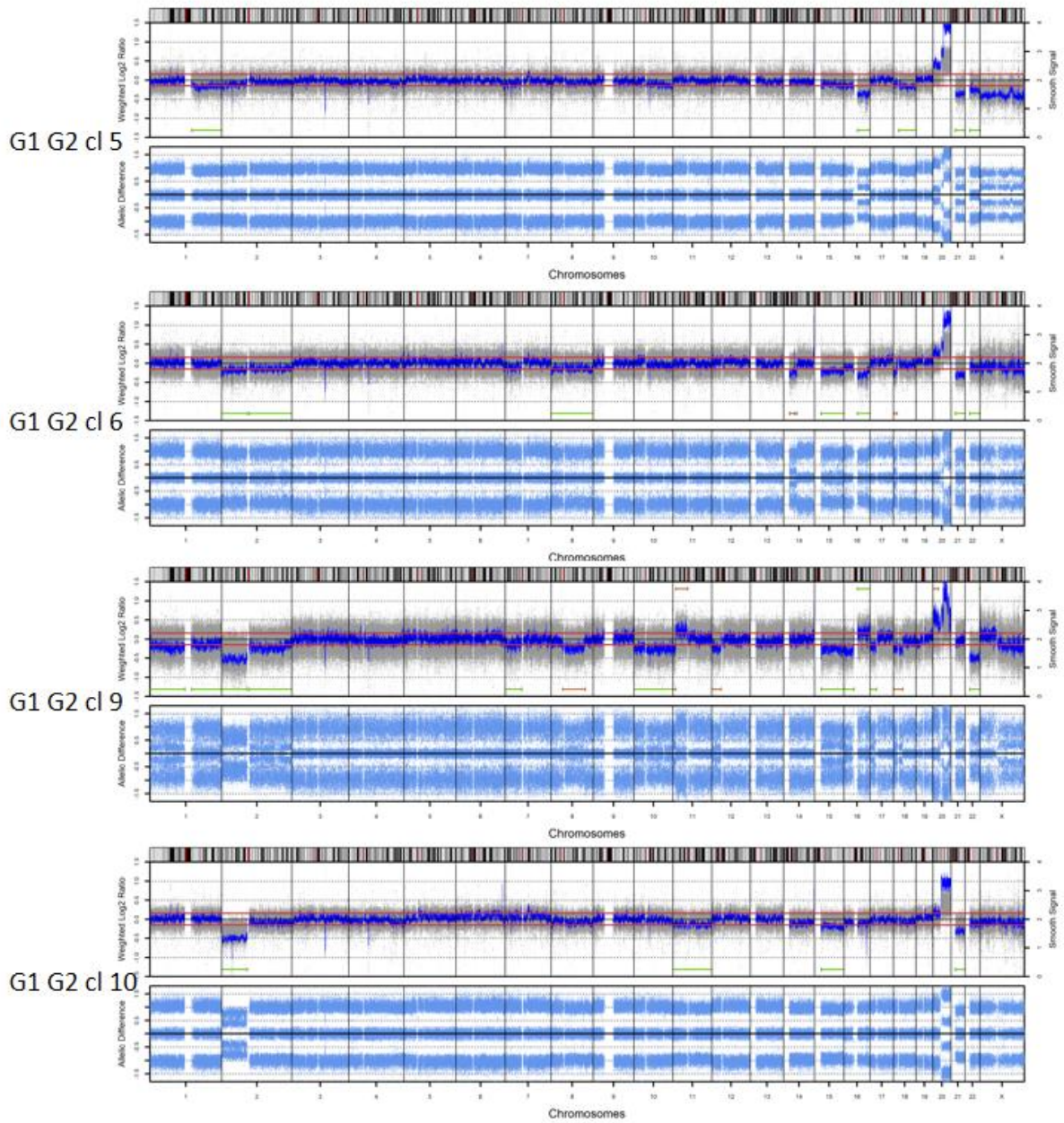


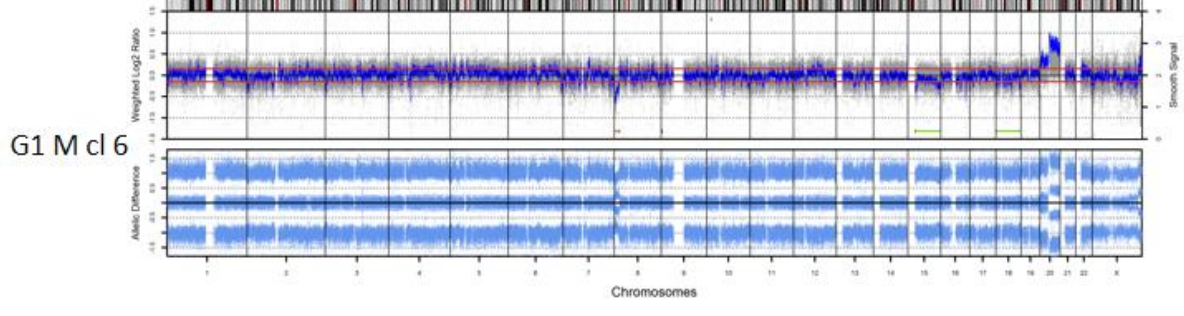
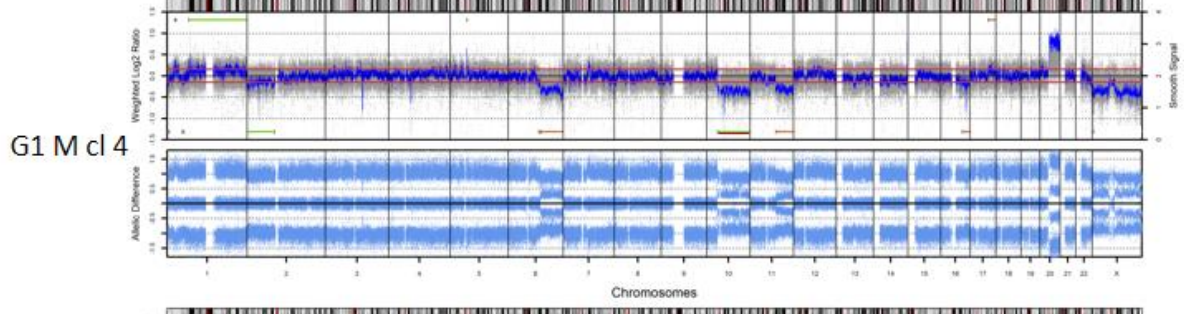
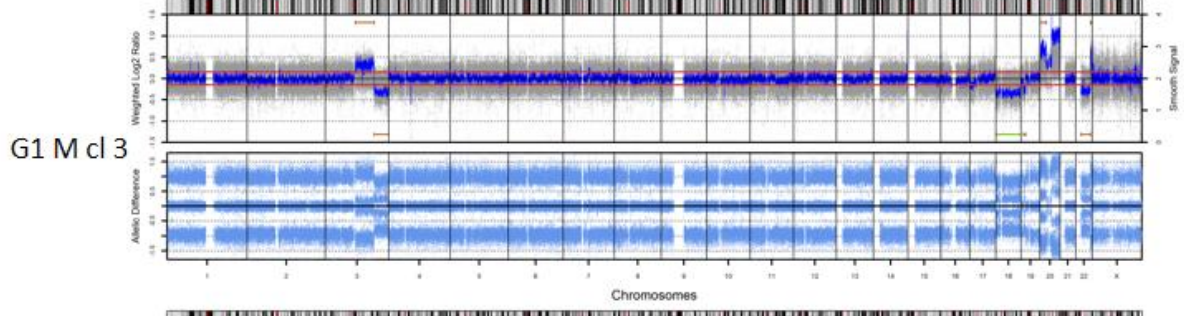
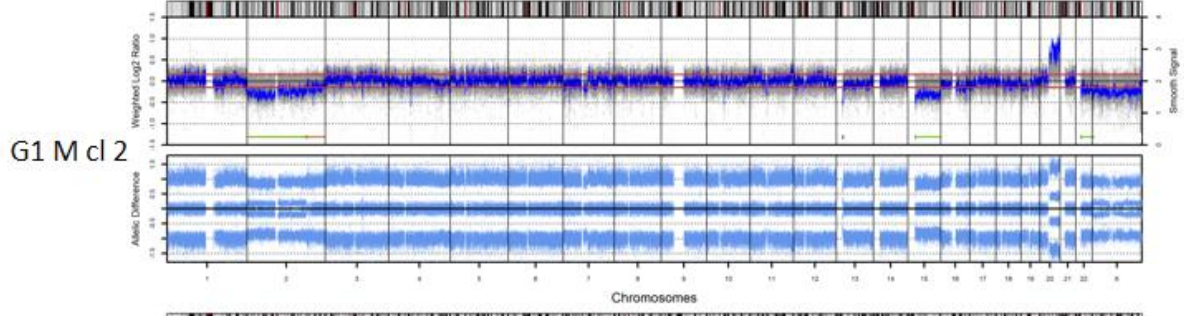
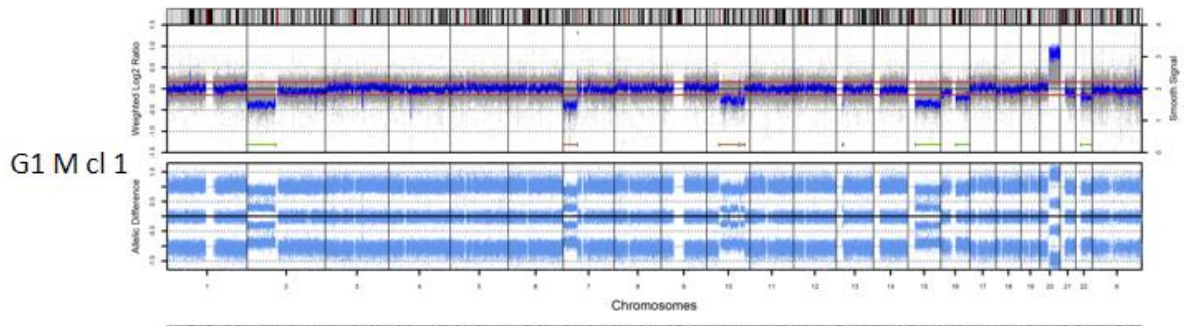


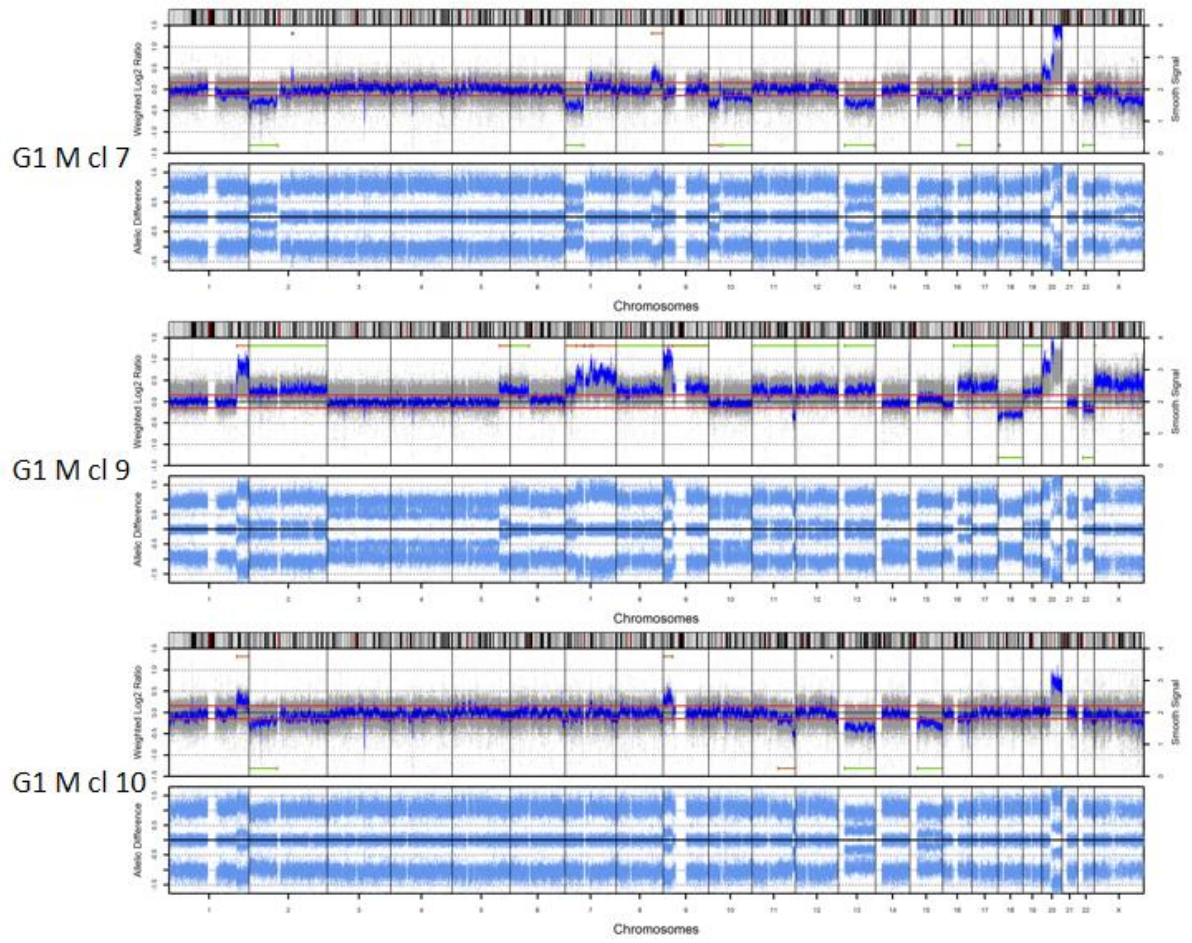


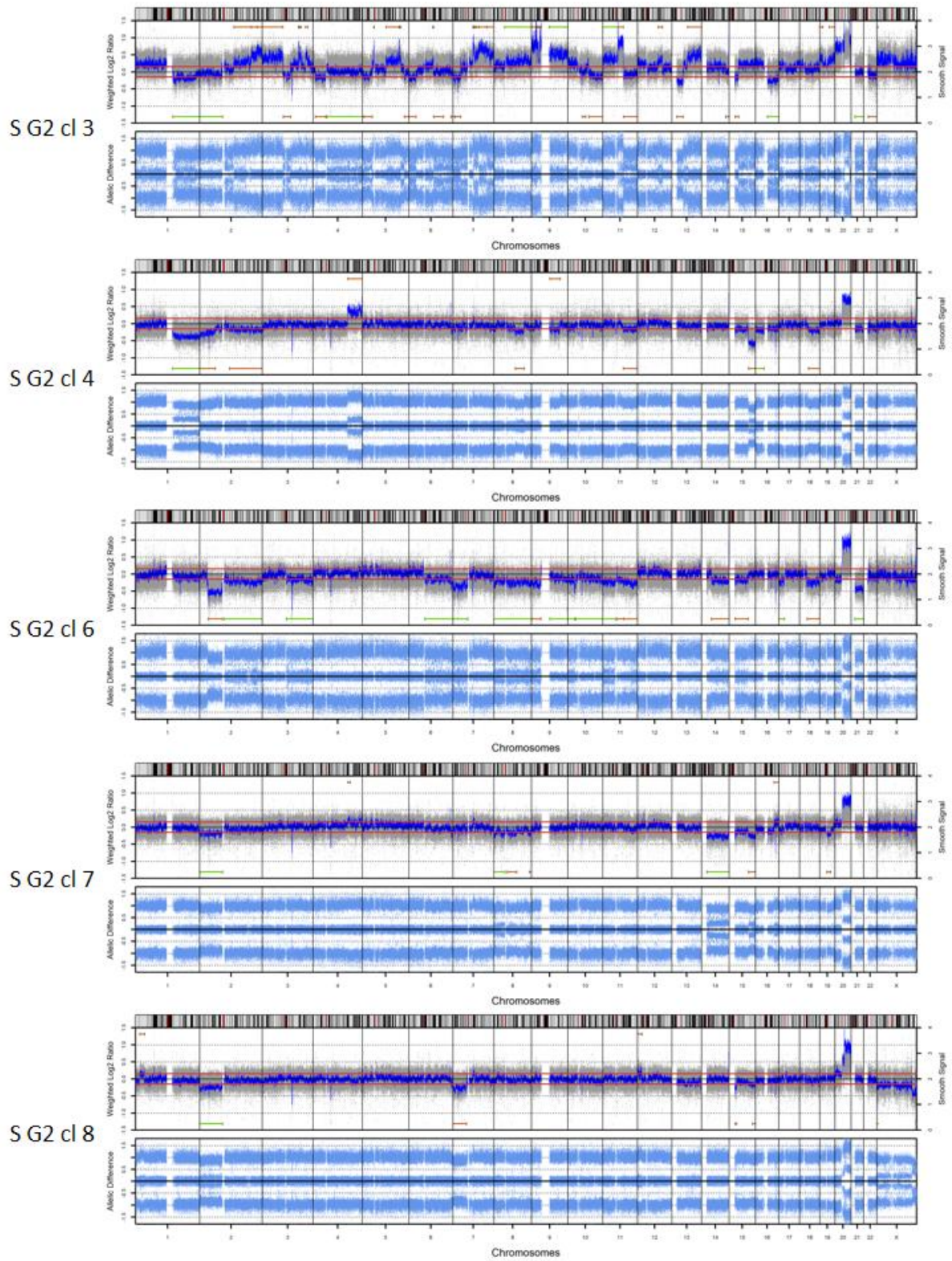












SG2 d19

