



Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des anomalies moléculaires récurrentes des sarcomes du stroma endométrial

Mehdi Brahmi

► To cite this version:

Mehdi Brahmi. Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des anomalies moléculaires récurrentes des sarcomes du stroma endométrial. Cancer. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1209 . tel-03483417v1

HAL Id: tel-03483417

<https://theses.hal.science/tel-03483417v1>

Submitted on 16 Dec 2021 (v1), last revised 16 Dec 2021 (v2)

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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1209

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Effectuée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire
Spécialité de doctorat : Cancérologie

Soutenue publiquement le 10 novembre 2020, par :
Mehdi Brahmi

Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des anomalies moléculaires récurrentes des sarcomes du stroma endométrial

Devant le jury composé de :

Professeure Isabelle Ray-Coquard, PU-PH, université de Lyon,
Présidente

Professeure Florence Duffaud, PU-PH, université d'Aix-Marseille
Rapporteur

Docteur Frédéric Chibon, DR, université de Toulouse
Rapporteur

Docteur Thomas Grünwald, PD Dr. Dr., Université de Heidelberg
Examineur

Professeur Jean-Yves Blay, PU-PH, université de Lyon
Directeur de thèse

Docteur Franck Tirode, DR, université de Lyon
Co-directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

A nos directeurs de thèse,

Monsieur le Professeur **Jean-Yves Blay**, je mesure la chance de travailler à tes côtés, merci de m'avoir accueilli avec tant de bienveillance au CLB et de m'avoir guidé dans mes premiers pas de médecin et de chercheur.

Monsieur le Docteur **Franck Tirode**, j'ai pu bénéficier d'un encadrement hors-pair et je t'en remercie sincèrement. Je me réjouis que nous puissions continuer à travailler ensemble.

A notre présidente du jury, Madame le Professeure **Isabelle Ray-Coquard**, je suis tellement ravi que tu aies acceptée de présider ce jury ! Ta capacité à mener de fronts les projets de recherche tout en gardant un sens clinique impressionnant constitue pour moi un exemple. Tu nous portes vers le haut, on a de la chance de t'avoir au CLB.

Aux membres du jury, Madame le Professeure **Florence Duffaud**, Monsieur le Docteur **Frédéric Chibon** et Monsieur le Docteur **Thomas Grünewald**, lors du choix du jury, vos noms m'ont paru une évidence. Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre lecture attentive et critique de ce travail.

A mes patients, puisque ce travail de thèse n'a de sens pour moi qu'à travers mon activité clinique au quotidien.

A mes collègues, ce travail n'aurait jamais vu le jour sans quelques personnes clés, notamment le Docteur **Philippe Cassier**, par son dynamisme et ses capacités à stimuler nos esprits scientifiques, avec toujours beaucoup de bienveillance. Le Dr **Armelle Dufresne**, mon binôme du sarcome, les semaines passeraient franchement moins vite sans toi ! **Adeline Duc**, quel bonheur de travailler à tes côtés, toujours opérationnelle, motivée, efficace, merci pour toute ton aide. **Virginie Perrin**, notre rayon de soleil du laboratoire, merci pour ta bonne humeur constante et ton aide au quotidien. Mes collègues les Docteurs **Matthieu Sarabi** et **Marie Karanian**, merci de vous être également lancés dans cette aventure, je me suis senti moins seul grâce à vous.

A ma famille, à Fabrice, pour toujours croire en moi !!! Que serais-je sans toi... Et à mes parents bien sûr.

Titre

Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des anomalies moléculaires récurrentes des sarcomes du stroma endométrial.

Mots clés

Sarcomes du stroma endométrial; Séquençage ARN; Gènes de fusion; Pronostic; Sarcome; Profil d'expression.

Résumé

Les sarcomes du stroma endométrial (SSE) sont caractérisés dans 50% des cas par un transcrit de fusion *JAZF1-SUZ12* ou *YWHAE-NUTM2*, impliqué dans la carcinogenèse. L'exploration par séquençage ARN (RNAseq) d'une série rétrospective de 42 tumeurs utérines diagnostiquées « SSE » mais sans transcrit de fusion classique *JAZF1-SUZ12* et/ou *YWHAE-NUTM2* a permis de montrer que les SSE représentent en fait une pathologie hétérogène à la fois sur le plan clinique, moléculaire et immunitaire. L'analyse de l'expression des gènes en RNAseq a permis de classer ces tumeurs en 3 groupes ou « clusters » : un groupe de haut grade (principalement composé de tumeurs avec réarrangement du gène *BCOR*), un groupe de bas grade (principalement composé de tumeurs avec réarrangements du gène *JAZF1*) et le dernier groupe de grade intermédiaire (composé de divers sous-types moléculaires). Cette classification était directement corrélée à la survie des patientes. De plus, nous avons mis en évidence que le transcrit de fusion *YWHAE-NUTM2* n'était pas systématiquement synonyme de haut grade. Enfin, le RNAseq a permis de reclasser un quart des tumeurs de la série et de découvrir de nouvelles anomalies moléculaires dans les SSE. Nous avons également noté que les anomalies moléculaires retrouvées par RNAseq comprenaient dans la grande majorité des cas des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (notamment via les complexes PRC1 et 2), ce qui peut suggérer qu'ils activent une voie oncogénique analogue.

Title

Transcriptomic and functional analysis of recurrent genetic abnormalities in endometrial stromal sarcomas.

Keywords

Endometrial stromal sarcomas; RNA-sequencing; Gene fusions; Prognostic; Sarcoma; Expression profile

Abstract

In about half of cases, endometrial stromal sarcomas (ESS) are characterized in by a *JAZF1-SUZ12* or *YWHAE-NUTM2* fusion transcript, which is involved in carcinogenesis. The exploration by RNA sequencing of a retrospective series of 42 uterine sarcomas diagnosed as ESS but negative for *JAZF1* and/or *YWHAE* rearrangement in FISH shows that ESS actually represent a heterogeneous disease both in terms of clinical behavior and molecular genetics. Cluster analyses on the expression profiles indicated that tumors could be gather in three distinct subgroups: one mainly composed of *BCOR*-rearranged samples; one mainly composed of *JAZF1*-fused ESS and the last composed of various molecular subtypes. These three subgroups display different gene signatures, different in silico cell cycle score, and very different clinical presentation, natural history and survival. While *YWHAE-NUTM2* fusion genes may be present in both high and low grade ESS, the high-grade presenting with an additional *BCOR* or *BCORL1* gene mutations. RNAseq brings clinically relevant molecular classification, enabling to reclassify diseases and to guide therapeutic strategy. The functional similarities between the classical *JAZF1-SUZ12* and the alternative transcripts (most commonly chromosomal translocations that frequently involve chromatin remodeling genes) may suggest that they activate a similar oncogenic pathway.

Table des matières

Abréviations	11
Introduction générale	12
Les sarcomes	12
Réarrangement chromosomiques et sarcomes	22
Translocations chromosomiques	22
Sarcomes à translocation	35
Les sarcomes du stroma endométrial	38
Les SSE de bas grade	38
Les SSE de haut grade	42
Problématiques, hypothèses initiales et objectifs	46
Problématiques	46
Hypothèses initiales et objectifs	48
Travaux de recherche	51
Introduction	51
Article 1	52
Conclusions	83
Perspectives	85
Sarcomes du stroma endométrial	85
Introduction	85
Article 2	86
Conclusion	99
Autres sous-types tumoraux	100
Article 3	101
Conclusions	104
Bibliographie	106

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BCOR : BCL-6 corepressor
BCORL1 : BCL6 Corepressor Like 1
CGH : Comparative Genomic Hybridization
CLB : Centre Léon Bérard
CNV Copy Number Variation
COSMIC : Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
ESS : Endometrial stromal sarcomas
FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
FT : Facteur de transcription
IHC : Immunohistochemistry
IRM : Imagerie par resonance magnétique nucléaire
JAZF1 : JAZF Zinc Finger 1
NUTM2 : NUT family member 2
NGS Next Generation Sequencing
NHEJ Non Homologous End Joining
PDX : Patient-Derived Xenograft
PRC : Polycomb Repressive Complex
RNAseq : RNA sequencing
STS : Soft Tissue Sarcoma
TDM : Tomodsentitométrie
TEP : Tomographie par émission de positon
WHO : World Health Organization

Introduction générale

Les sarcomes

D'un point de vue étymologique, le mot sarcome vient du grec *sarkôma* et du latin *sarcoma* et signifie des tumeurs de couleur chair. Les sarcomes désignent des cancers des tissus conjonctifs ou dérivés d'un tissu conjonctif. Ce sont des tumeurs rares, complexes et hétérogènes qui affectent environ 4 000 individus par an en France (1). Les sarcomes ne représentent que 2% des cancers de l'adulte et 10 à 15 % des cancers de l'enfant. La majorité des sarcomes surviennent de manière sporadique. La littérature scientifique portant sur l'identification de facteurs de risques des sarcomes est pauvre et souvent contradictoire. Certains facteurs sont toutefois bien identifiés comme favorisant la survenue de sarcomes :

- Des maladies génétiques très rares (Rétinoblastome, syndrome de Werner, maladie de Recklinghausen, syndrome de Li–Fraumeni) (2).
- L'exposition à des radiations ionisantes (radiothérapie), à des toxiques (chlorure de vinyle, dioxyde de thorium), ou à des virus (herpès, VIH) (3).
- Le lymphœdème (4).

Les sarcomes affectent surtout les tissus mous mais également les viscères et les os et peuvent donc se développer dans tout le corps. Une classification adéquate de ce groupe de tumeurs très hétérogènes est indispensable, dès le début de la prise en charge, pour établir un plan

thérapeutique précis. Historiquement, les sarcomes étaient classés selon leur localisation anatomique (Figure 1) : les sarcomes tissus mous (75%), les sarcomes osseux (10%) et les sarcomes des viscères (15%).

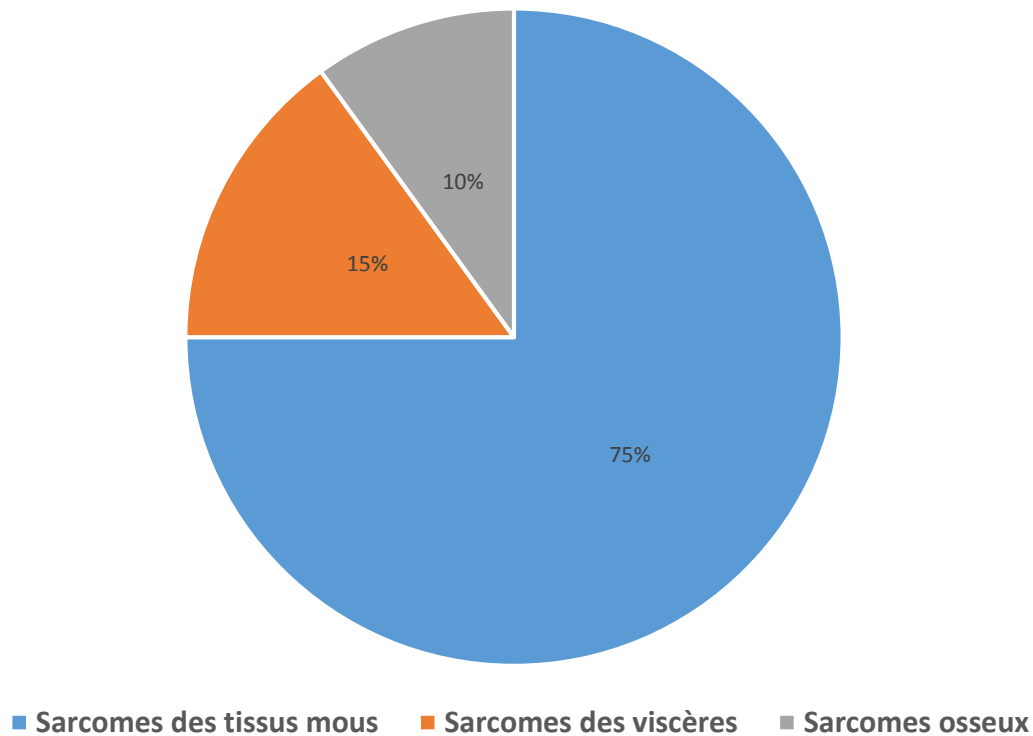


Figure 1. Classification anatomique des sarcomes.

Est apparue dans un second temps la classification histologique des sarcomes, par l’OMS, répertoriant les tumeurs bénignes et malignes des os et des tissus mous en 12 grandes classes (illustrées dans le Tableau 1A) secondairement subdivisées en sous-types histologiques. Cette classification est analogique : elle se base sur l’identification de la ligne de différenciation (adipeuse, musculaire lisse, musculaire striée, cartilagineuse, etc...) de la tumeur, c’est-à-dire sur l’aspect du tissu normal auquel la tumeur ressemble le plus. Cette classification repose sur des arguments histologiques obtenus en microscopie optique. A cette classification histologique

s'ajoute, pour les sarcomes des tissus mous, l'analyse de l'agressivité tumorale évaluée par le grade histologique de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer (FNCLCC) (Tableau 1B).

Classes histologiques selon l'OMS
<i>Tumeurs adipeuses</i>
<i>Tumeurs fibroblastiques / myofibroblastiques</i>
<i>Tumeurs fibrohistiocytaires</i>
<i>Tumeurs musculaires lisses</i>
<i>Tumeurs péricytaires (périvasculaires)</i>
<i>Tumeurs musculaires striées</i>
<i>Tumeurs vasculaires</i>
<i>Tumeurs chondro-osseuses</i>
<i>Tumeurs stromales gastro-intestinales (GSIT)</i>
<i>Tumeurs des gaines nerveuses</i>
<i>Tumeurs à différenciation incertaines</i>
<i>Sarcomes inclassés et indifférenciés</i>

Grade histologique de la FNCLCC	
Score	Description
Différenciation tumorale	
1	<i>Sarcome ressemblant à un tissu normal</i>
2	<i>Sarcome à diagnostic histologique certain</i>
3	<i>Synoviosarcomes, sarcomes épithélioïdes, à cellules claires, alvéolaires des parties molles, rhabdomyosarcomes embryonnaires, sarcomes indifférenciés et sarcomes pour lesquels le type histologique est incertain</i>
Index mitotique	
1	<i>0-9 mitoses / 10 champs</i>
2	<i>10-19 mitoses / 10 champs</i>
3	<i>> 19 mitoses / 10 champs</i>
Nécrose tumorale	
1	<i>Pas de nécrose</i>
2	<i>< 50 % nécrose tumorale</i>
3	<i>> 50 % nécrose tumorale</i>

Tableau 1. A. Liste des 12 grandes classes histologiques de sarcomes selon l'OMS. B. Grade histologique de la FNCLCC: Grade 1 = somme des scores entre 2 et 3 ; Grade 2 = Somme des scores entre 4 et 5 ; Grade 3 = somme des scores \geq 6.

Plus récemment, avec l'émergence des techniques d'immunohistochimie (IHC) et de biologie moléculaire, ainsi que le développement en parallèle des thérapies ciblées en oncologie, nous avons assisté au démantèlement moléculaire des sarcomes avec actuellement plus de 150 sous-types différents de sarcomes, répertoriés dans la cinquième et dernière classification OMS (5). Il est important de noter que le diagnostic moléculaire des sarcomes n'a de sens qu'en association avec l'analyse clinique, morphologique et IHC puisqu'il rassemble des entités cliniquement et microscopiquement distinctes mais présentant des anomalies génétiques identiques exemple des sarcomes à cellules claires et des histiocytofibromes angiomatoïdes fibreux avec transcrite de fusion EWSR1-ATF1), et différencie des tumeurs cliniquement et morphologiquement identiques mais présentant des anomalies moléculaires différentes (sarcomes d'Ewing avec fusion EWSR1-FLI1 ou FUS-ERG ; GIST avec mutation de KIT ou PDGFRA).

Cette nouvelle forme de classification des sarcomes, que l'on appelle « biopathologique », intègre donc la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes à type de translocations, amplifications d'oncogènes et perte de gènes suppresseurs de tumeur. Ces altérations moléculaires permettent d'optimiser la classification des sarcomes en poursuivant leur subdivision en une myriade d'entités différentes (Figure 2). Pourtant, elle est essentielle, de par son triple impact: diagnostique, pronostique et thérapeutique.

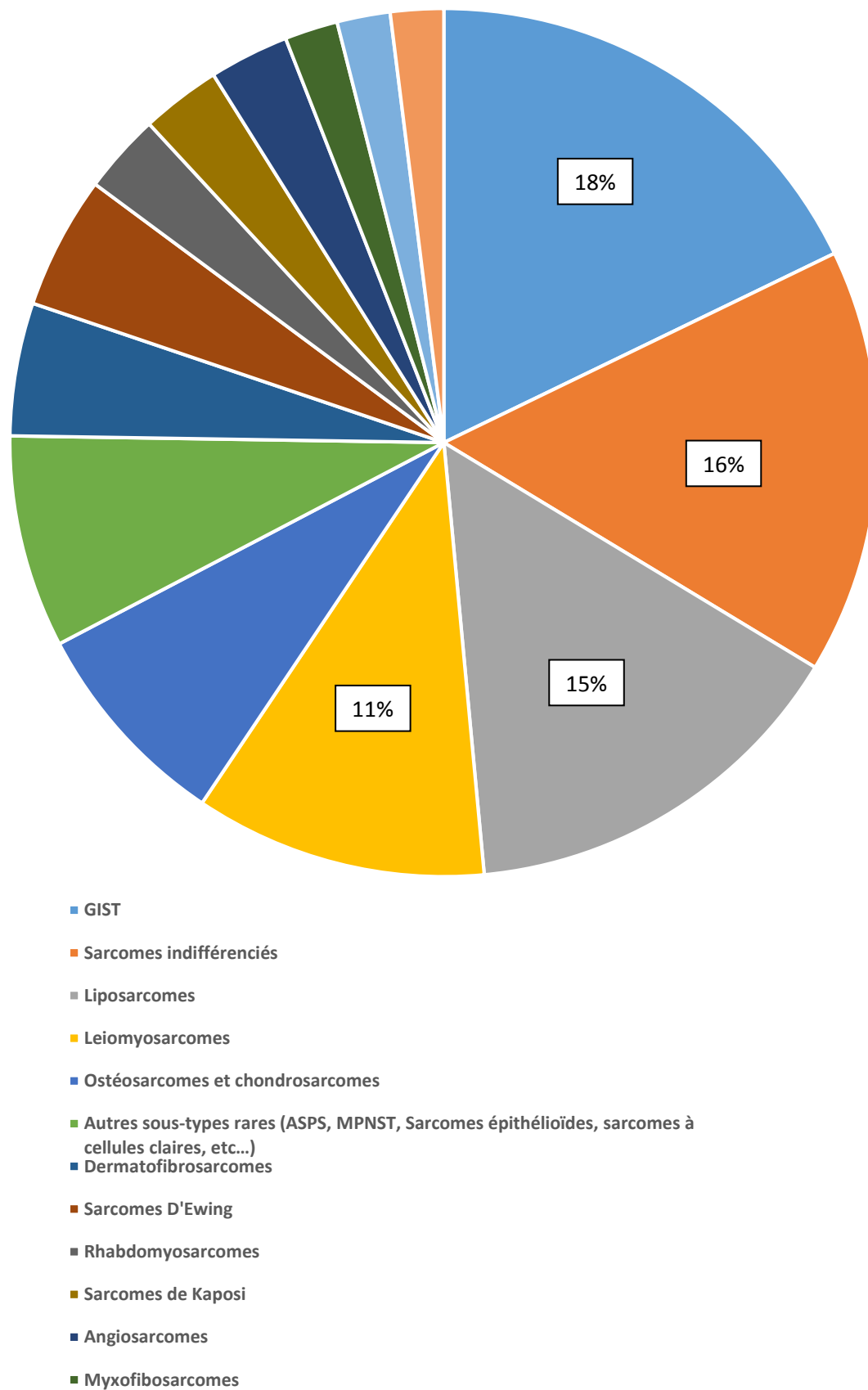


Figure 2. Classification biopathologique des sarcomes.

Ainsi, plusieurs grands groupes de sarcomes sont identifiés en fonction du type d'anomalie moléculaire qui les caractérise, et l'on distingue les sarcomes à génétique simple des sarcomes à génétique complexe.

Les sarcomes à génétique simple sont porteurs d'une anomalie génomique identifiable, spécifique, impliquée généralement dans les phénomènes précoces de carcinogénèse.

- **Sarcomes avec mutation activatrice (20 %)**

Une mutation ponctuelle activatrice peut survenir dans une séquence codante pour un oncogène, lui-même codant un facteur de croissance (exemple : mutation FGF), un récepteur transmembranaire de facteur de croissance (exemple : EGFR), une G-protéines ou protéine membranaires liant le GTP (exemple : RAS), une protéine-kinases membranaires ou cytosoliques, ou une protéines à activité nucléaire. Cette mutation est capable d'activer l'oncogène, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation constitutive de la protéine. Tout domaine de liaison à un cofacteur peut être la cible d'une mutation activatrice, et certaines positions génomiques sont considérées comme des hotspots de mutation (très forts taux de mutation par rapport aux séquences voisines).

Dans le cas des récepteur tyrosine-kinase, une mutation ponctuelle entraîne l'activation constitutive ou la stabilisation de la protéine. C'est le cas par exemple des GIST, dont 95% présentent une mutation activatrice de *KIT* ou *PDGFRA*, qui sont mutuellement exclusives (6). Ces mutations entraînent le plus souvent une dimérisation du récepteur à tyrosine kinase et donc son activation indépendante du ligand (7). Un autre exemple est celui des tumeur desmoïde dont le diagnostic est confirmé par la présence d'une

mutation du gène *CTNNB1* dans 85 % des cas ou du gène *APC* dans 5% des cas, aboutissant à la stabilisation de la bêta-caténine qui est transloquée vers le noyau et induit la transcription de gènes cibles qui sont des oncogènes (8).

- Sarcomes avec **mutation inactivatrice** (< 1 %)

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction des gènes suppresseurs dans les tumeurs solides sont variées. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions ou d'anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription. Par exemple, l'inactivation constitutionnelle du gène suppresseur RB est à l'origine des formes héréditaires de rétinoblastome et représente également un facteur de risque génétique pour le développement d'ostéosarcomes. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène constituent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes. *INI1* est un gène suppresseur de tumeur localisé sur le chromosome 22 dont la protéine est exprimée dans le noyau de tous les tissus normaux et intervient dans le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (9). L'inactivation bi-allélique de ce gène, le plus souvent liée à une délétion, détectée par la mise en évidence d'une délétion en FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou perte d'expression de la protéine en IHC, est impliquée dans les mécanismes de carcinogénèse de certains sarcomes. Cette anomalie est notamment caractéristique des tumeurs rhabdoïdes malignes mais elle est également retrouvée dans 80% des sarcomes épithélioïdes (10,11). Dans la neurofibromatose de type 1, le gène suppresseur de tumeur *NF1*, localisé sur le chromosome 17, est porteur d'une mutation inactivatrice (le

plus fréquemment une délétion) qui bloque la synthèse de la protéine neurofibromine (12).

- Sarcomes avec **amplification simple (15 %)**

L'amplification correspond à une augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors, soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de minichromosomes surnuméraires. Cette amplification entraîne généralement une augmentation du niveau de l'expression du gène. Les liposarcomes bien différenciés et dédifférenciés représentent 15% de l'ensemble des sarcomes. Ils présentent une amplification constante du gène *MDM2* et dans 90% des cas, du gène *CDK4* (13). Cette co-amplification est responsable du processus tumoral. En inhibant p53, MDM2 augmente la survie cellulaire tandis qu'en inhibant Rb1, CDK4 augmente la prolifération cellulaire. L'amplification de *MDM2* et *CDK4* identifiée par IHC ou FISH est maintenant un outil diagnostique de routine. L'amplification du gène *MYC* est détectée dans plus de la moitié des angiosarcomes se développant en territoire irradié (14).

- Sarcomes avec **translocation (15 %)**

Les sarcomes dits « à translocation » représentent un sous-groupe de sarcome avec une altération caractérisée par un échange de matériel chromosomique (15). Nous décrivons plus spécifiquement ces altérations génétiques et ce sous-groupe de sarcomes plus bas.

Les sarcomes à génétique complexe représentent plus de la moitié des sarcomes et sont porteurs, comme leur nom l'indique, d'anomalies génétiques complexes avec des gains et des pertes géniques multiples (16). Il s'agit principalement des léiomyosarcomes, des

myxofibrosarcomes, des liposarcomes pléomorphes, des rhabdomyosarcomes pléomorphes et des sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS). Les gènes suppresseurs de tumeur *RBI*, *PTEN* ainsi que ceux impliqués dans le voie p53 sont fréquemment perdus, et une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR est souvent retrouvée. L'évolution des technologies d'études génomiques et transcriptomique à grande échelle a permis l'élaboration d'une signature moléculaire pronostique dans les sarcomes à génomique complexes, appelée CINSARC pour « complexity index in sarcomas ». Cette signature composée de 67 gènes est associée de manière significative à la complexité génomique des tumeurs et à leur évolution métastatique, et apparaît plus prédictive du devenir des patients que ne l'est le grade FNCLCC (17,18).

A l'image de l'hétérogénéité moléculaire de ces tumeurs, les processus menant au diagnostic de sarcome sont également très variables. Les points d'appel cliniques peuvent être multiples : survenue d'une tuméfaction, douleurs, syndrome hémorragique, fracture pathologique, altération de l'état général, etc... La découverte peut également être fortuite (incidentalome). De manière systématique, sont réalisés une imagerie de la tumeur primitive (IRM et/ou TDM) ainsi qu'un bilan d'extension : TDM thoraco-abdomino-pelvien et/ou TEP-TDM. La prise en charge des sarcomes doit suivre des règles très précises édictées et mises à jour régulièrement par plusieurs sociétés savantes dont le GSF (Groupe Sarcome Français) et l'ESMO (European School of Medical Oncology) (19–21). Il existe notamment 4 règles primordiales :

- Les décisions doivent être discutées systématiquement en **RCP** (réunions de concertation pluridisciplinaire) de référence (RCP « NetSarc ») à chaque étape de la prise en charge médicale (22)
- Une **biopsie** à visée diagnostique doit être réalisée systématiquement avant tout geste chirurgical. Le trajet de la biopsie doit être décidé en amont, entre le radiologue

interventionnel qui réalisera la biopsie et le chirurgien qui opérera le patient (si l'indication d'exérèse tumorale est retenue par la suite), idéalement au sein d'une RCP Netsarc.

- L'analyse histologique doit bénéficier systématiquement d'une **relecture anatomopathologique** (23) en centre expert auprès d'un médecin pathologiste du RREPS (Réseau de Référence en Pathologie des Sarcomes) avec « grading » de la tumeur selon la classification FNCLCC (24) et recherche spécifique d'altérations génétiques.
- Le patient doit pouvoir bénéficier d'une prise en charge médicale auprès d'un **centre de référence NetSarc** du fait de la rareté et de la complexité de la pathologie (25).

En cas de maladie localisée, la chirurgie est la pierre angulaire du traitement. Elle doit être réalisée après RCP et par un chirurgien expert au sein d'un centre Netsarc (25). En fonction de certains critères (taille, grade FNCLCC, sous-type histologique, etc...), se discute une radiothérapie (qui peut être réalisée en adjuvant ou néoadjuvant) et/ou une chimiothérapie (en néoadjuvant). En cas de maladie avancée/métastatique, le pronostic est sombre, avec une médiane de survie globale ne dépassant pas les deux ans (26,27), et il faut privilégier les inclusions dans des essais thérapeutiques.

Réarrangement chromosomiques et sarcomes

Translocations chromosomiques

Méthodes de détection

Avant 1970, les techniques d'étude microscopique des chromosomes étaient fondées sur le **caryotype**, représentant donc la première technique de biologie permettant de dépister des anomalies chromosomiques. C'est ainsi qu'a été découvert le « chromosome de Philadelphie » caractéristique de la leucémie myéloïde chronique. Plus tard, de nouvelles techniques de cytogénétique moléculaire reposant sur le principe de l'hybridation de la molécule d'ADN avec une séquence complémentaire variable en fonction de la technique utilisée et la pathologie étudiée, ont supplanté le caryotype. Il s'agit de la **FISH** ou Hybridation in situ Fluorescente (toutes premières techniques en 1969) ou la **CGH** ou Hybridation Génomique Comparative (développée dans les années 90). Ainsi, de nombreux nouveaux réarrangements chromosomiques ont été découverts. Actuellement, même si la FISH continue à être utilisée en routine, les nouvelles techniques de séquençage à haut débit ou « next-generation sequencing » (**NGS**) sont de plus en plus utilisées, permettant une analyse moléculaire exhaustive, non seulement des points de cassure des translocations mais aussi la recherche de mutations ponctuelles. En fonction de l'approche choisie, les applications sont variables : le séquençage du génome entier (WGS, Whole Genome Sequencing), de l'exome entier (WES, Whole Exome Sequencing), de plusieurs gènes ciblés, du transcriptome (RNA sequencing ou RNAseq), etc...

Cette dernière technologie (RNAseq) n'est pas encore un examen diagnostique de routine même si elle tend de plus en plus à le devenir et prend progressivement une place majeure dans la prise en charge des cancers. C'est l'examen de choix pour détecter les gènes de fusion. En outre, cette technique permet d'apprécier les profils d'expression des gènes et ainsi regrouper ou différencier des tumeurs entre elles.

Mécanismes

La translocation est une altération génétique caractérisée par l'échange réciproque de matériel chromosomique entre des chromosomes non homologues, c'est-à-dire n'appartenant pas à la même paire. Il s'agit donc de la juxtaposition de deux gènes précédemment indépendants, initiée par une coupure des deux brins d'ADN sur les deux partenaires chromosomiques. Les extrémités libres ainsi générées peuvent se recoller soit pour reconstituer la configuration initiale (certainement le cas le plus fréquent), soit entre elles conduisant alors à la translocation. Ainsi, nous détectons une région chromosomique anormale et lorsque ce réarrangement chromosomique concerne des gènes, il induit alors la création d'un gène hybride, conduisant à la traduction d'une protéine dérégulée et/ou chimérique. Les gènes de fusions représentent le type le plus courant d'anomalies chromosomiques structurelles. Il est à noter qu'ils ne sont pas retrouvés exclusivement dans les cellules tumorales. Néanmoins, les translocations sont particulièrement fréquentes dans les cellules tumorales, avec actuellement plus de 10 000 gènes de fusions connues et répertoriés dans plusieurs bases de données telles que la base COSMIC (28). Dans la plupart des cancers, un taux élevé de réarrangements chromosomiques est retrouvé, tels que des modifications du nombre de chromosomes (aneuploïdie), des délétions, des inversions, ou des translocations (29). Mais il est essentiel de savoir si ces réarrangements chromosomiques correspondent à des anomalies « drivers », c'est-à-dire responsables à elles

seules de la survie anormale d'une cellule (on parle d'« addiction oncogénique ») et impliquées de manière précoce dans la carcinogenèse ou alors des anomalies « passagers », c'est-à-dire se produisant au hasard, en raison de l'instabilité génétique des cellules tumorales, sans apporter d'avantage significatif et sans contribuer aux mécanismes de carcinogenèse (30). Il y a beaucoup plus de translocations « passagers » que « drivers ». En général, ces réarrangements chromosomiques « passagers » se produisent sur des régions non codantes et la survie cellulaire est dépendante d'autres anomalies génétiques telles que des mutations de *P53*. Des méthodes statistiques existent pour identifier les fusions « drivers », en utilisant des critères tels que la fréquence, la récurrence, les effets prédits (31).

La fréquence des translocations récurrentes varie en fonction du type spécifique de cancer (Figure 3). Dans l'ensemble, on estime actuellement qu'environ 20% des cancers sont principalement provoqués par une translocation. Les translocations « drivers » concernent tous les types de tumeurs, des tumeurs bénignes (exemple du myolipome avec fusion impliquant le gène *HMGA2* (32)) aux tumeurs malignes. Concernant les tumeurs malignes, les hémopathies malignes sont les sous-types où l'on retrouve le plus de translocations, suivis des tumeurs mésenchymateuses (sarcomes) et des tumeurs épithéliales (33). En effet, à la différence des autres types de tumeurs solides, les altérations génétiques prédominantes dans les sarcomes sont les variations du nombre de copies d'un gène (CNV) et les translocations chromosomiques (Figure 4) (34).

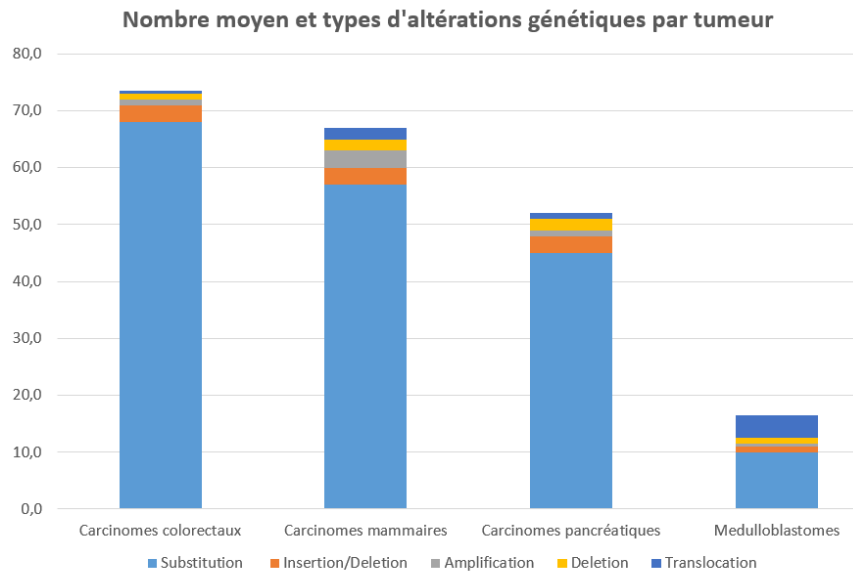


Figure 3. Nombre moyen et types d'altérations génétiques par tumeur pour les cancers colorectaux, mammaires, pancréatiques et les médulloblastomes (29).

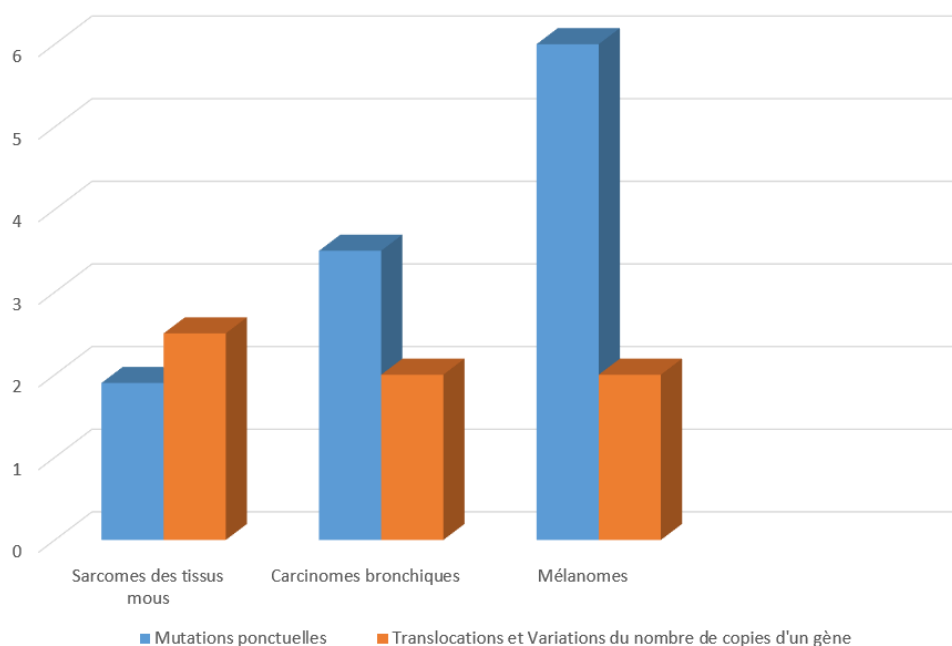


Figure 4. Fréquence moyenne par patient des mutations ponctuelles et translocation/CNV par type de cancer : les sarcomes des tissus mous ont la plus faible quantité de mutations ponctuelles tout en ayant la proportion relative la plus élevée de translocations/CNV (34).

L'ARN chimérique correspond le plus souvent au produit d'un réarrangement chromosomique au niveau de l'ADN. Ces réarrangements structuraux peuvent être des translocations, des inversions, des suppressions, des insertions ou des duplications. Ils forment un gène de fusion traduit en un transcrit de fusion et une protéine chimérique ou recombinante. Les transcrits de fusion peuvent également être produits par épissage alternatif, en raison d'un épissage de l'ARNm précurseur en différentes isoformes. Il en résulte des fusions génétiques dites « induites par la transcription » (TIGF). Lorsqu'il s'agit de gènes voisins situés sur le même brin d'ADN, on parle de « cis-TIGF » et s'il s'agit de gènes éloignés les uns des autres ou sur des chromosomes différents, on parle de « trans-TIGF ». Par exemple, dans le carcinome de la prostate, plusieurs TIGF ont été décrits (35).

Il existe 2 types de réarrangements structuraux chromosomiques: équilibrés et déséquilibrés (Figure 5). Les réarrangements équilibrés comprennent des translocations (transfert de segments chromosomiques entre chromosomes), des insertions (segment chromosomique dans une nouvelle position interstitielle dans le même chromosome ou un autre) et des inversions (rotation à 180° d'un segment chromosomique). Les réarrangements chromosomiques déséquilibrés correspondent à une délétion d'un segment chromosomique interstitiel. Il est à noter que les réarrangements chromosomiques équilibrés peuvent également être déséquilibrés au niveau des nucléotides.

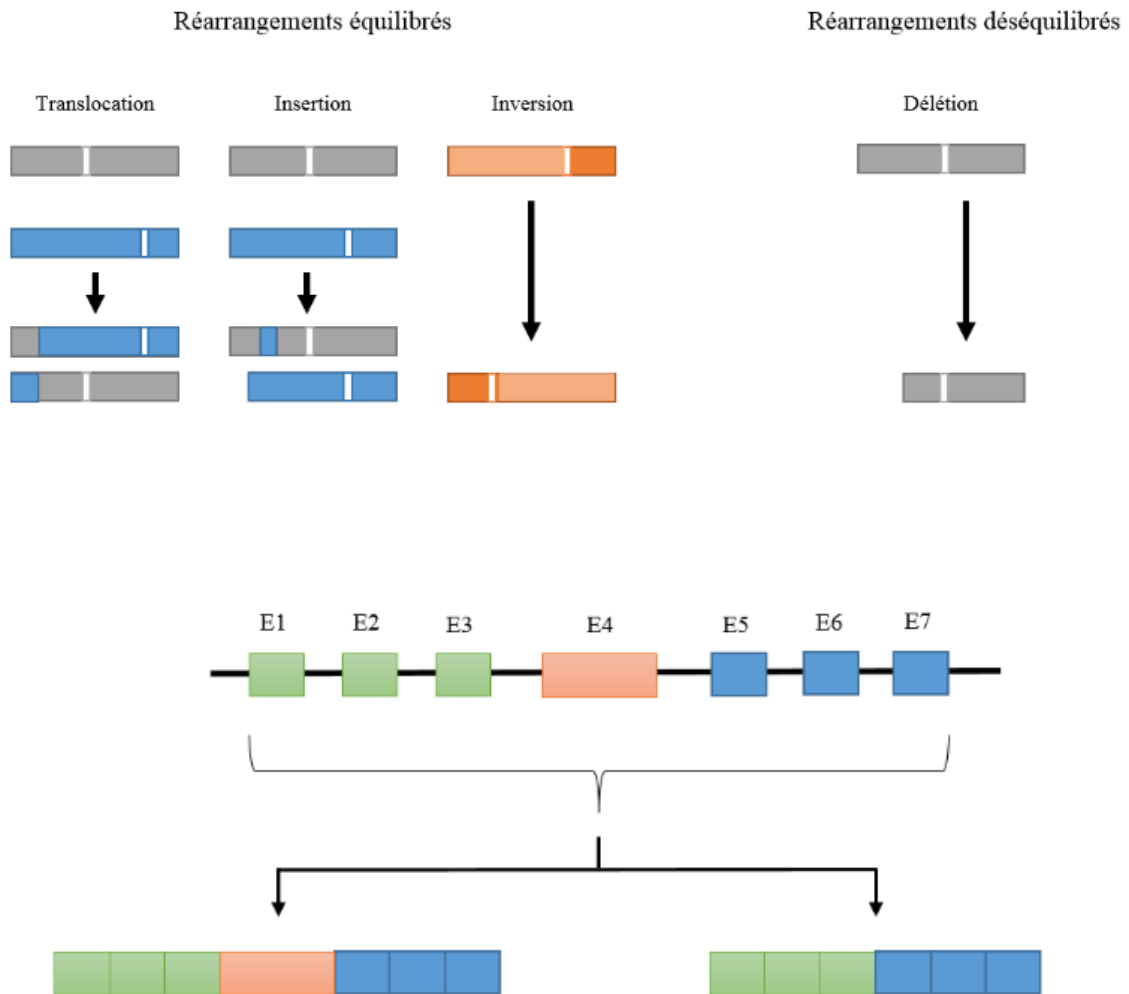


Figure 5. Schéma des différents types de réarrangements structuraux chromosomiques. Les translocations réciproques donnent naissance à 2 chromosomes dérivés, dont chacun peut héberger la fusion du gène pathogène. Les ARN chimériques peuvent être générés à la fois au niveau de l'ADN (par réarrangements chromosomiques) et au niveau de l'ARN (par épissage cis ou trans) (33).

Les translocations récurrentes sont généralement considérées comme des événements spontanés et peu fréquents mais fortement sélectionnés au niveau cellulaire via leurs contributions à l'oncogenèse. La formation de translocations chromosomiques réciproques dans les tumeurs va se faire pendant la mitose (réplication de l'ADN). Deux cassures doubles brin se produisent au niveau de deux chromosomes non homologues. Ces cassures vont échapper à la réparation normale. Puis les quatre extrémités cassées vont former des réarrangements chromosomiques par un mécanisme appelé « jonction d'extrémités non homologues » (en anglais *Non-Homologous End-Joining* ou NHEJ), mécanisme sujet aux erreurs qui n'utilise aucune homologie de séquence d'ADN pour réparer les cassures double brins (Figure 6) (36).

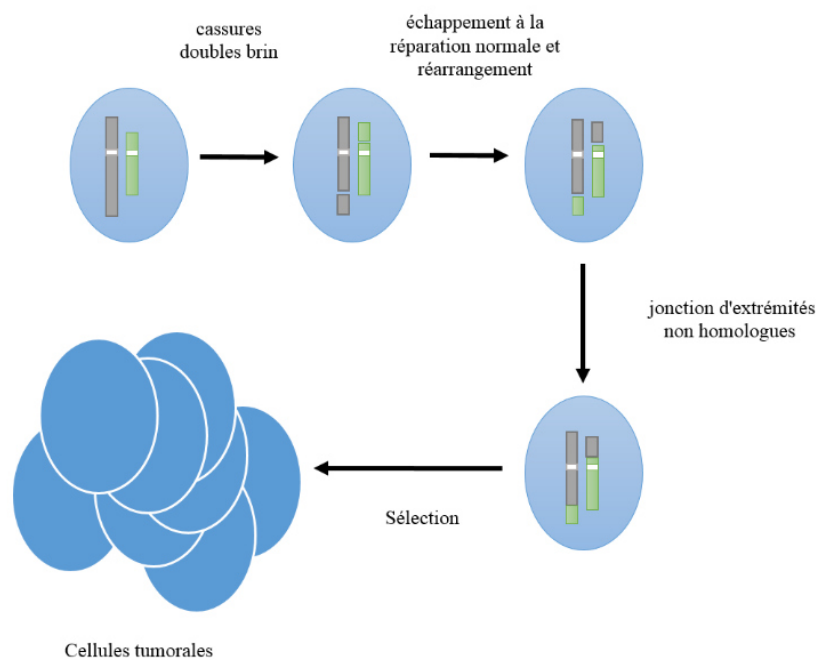


Figure 6. Schéma des différentes étapes depuis les cassures double brins jusqu'à la formation des translocations chromosomiques réciproques et enfin la forte sélection au niveau cellulaire via leurs contribution à l'oncogenèse (37).

Plus récemment, les techniques de séquençage haut débit du génome ont révélés l'existence de remaniements chromosomiques d'une complexité encore inconnue, dénommés chromoanagenesis. Les événements à l'origine de réarrangements complexes sont appelés chromothripsis (38), chromoanasythesis (39) et chromoplexie (40).

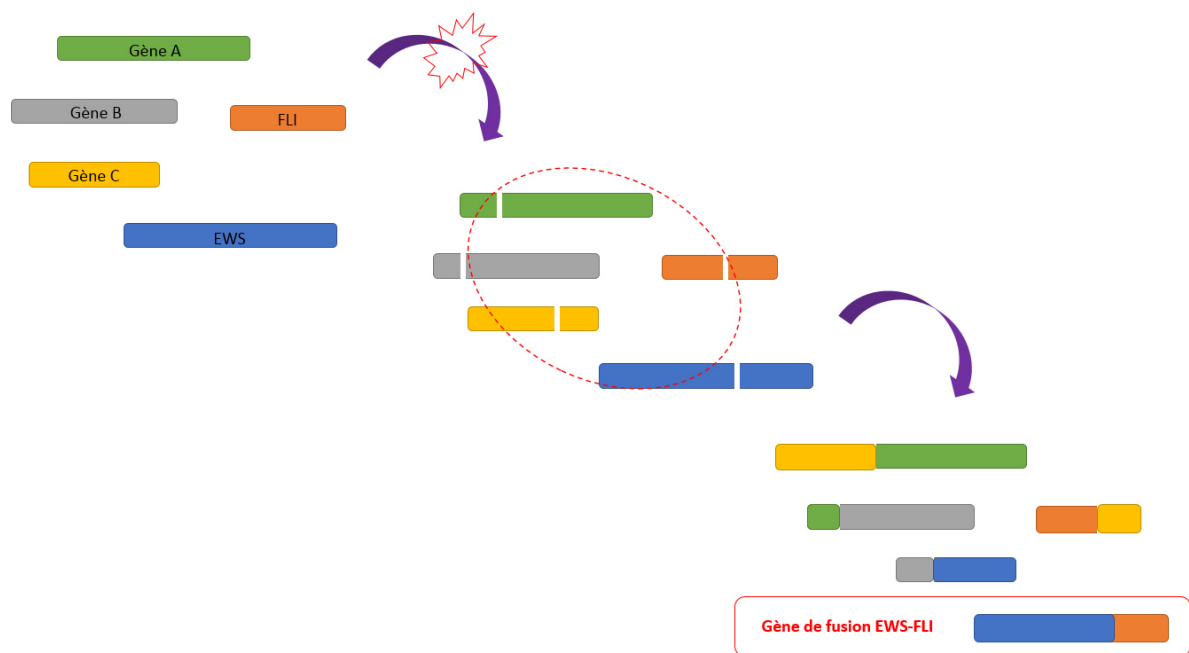


Figure 7. exemple d'un cas de sarcome d'Ewing où le gène de fusion oncogénique EWS-FLI émerge suite à un remaniements chromosomiques complexe appelé chromoplexie (41).

Le point de cassure et la position de la translocation sont non aléatoires et récurrent, conservant la compatibilité des cadres de lecture et vont dépendre de plusieurs facteurs :

- Proximité spatiale des chromosomes dans le noyau
- Caractéristiques de la séquence d'ADN (répétitions, sites fragiles et sites de mauvaise reconnaissance des endonucléases)
- Facteurs intrinsèques (Métabolisme oxydatif, Stress de réplication)
- Facteurs extrinsèques (Rayonnement ionisant, Chimiothérapies)

Ainsi, la position chromosomique de 2 oncogènes relativement équivalents influence la capacité à contribuer aux translocations oncogéniques, avec pour exemple les oncogènes c-Myc et n-Myc (42). L'environnement chromosomique pourrait influencer la fréquence des cassures doubles brin autour de l'oncogène, la proximité spatiale avec le partenaire de translocation et modifier la régulation transcriptionnelle ou la réparation de l'ADN.

Gènes partenaires de fusion

Dans la majorité des cas, les partenaires de fusions sont des facteurs de transcription (FT). Ils sont généralement situés sur l'extrémité C-terminale, où ils conservent leurs domaines de liaison à l'ADN dans la protéine chimérique. On sait que certains FT sont spécifiquement associés à certains cancers. L'hypothèse principale est que le FT pourrait être impliqué dans certains types de cancers lorsque les gènes cibles du FT sont reliés aux cellules du tissu d'origine. On peut prendre l'exemple du rhabdomyosarcome, cancer qui présente plusieurs types de fusions impliquant les gènes *VGLL2*, *TEAD1* et *SRF*, correspondent tout trois à des FT agissant comme activateurs transcriptionnels de gènes musculaires.

Les récepteurs de tyrosine kinases sont des partenaires de translocation toujours situés sur l'extrémité C-terminal. Le résultat au niveau protéique correspond à l'activation constitutive du domaine tyrosine kinase. Il existe une grande variété de partenaires à l'extrémité N-terminale, dont le rôle principal est d'apporter un domaine d'homodimérisation.

Les facteurs de croissance sont des partenaires de fusion plutôt localisés en partie C-terminal. La contribution du partenaire N-terminale est limitée à fournir une transcription améliorée.

Enfin, les régulateurs chromatinien peuvent être impliqués dans les gènes de fusion, avec des effets plus globaux que pour les fusions impliquant des FT.

Tableau 1. Liste non exhaustive des gènes impliqués dans des fusions oncogéniques

Facteurs de transcription		Récepteurs à tyrosine kinase		Facteurs de croissance		Régulateurs chromatinien	
N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal
ACTB	GLI1	EML4	ALK	COL1A1	PDGFB	BCOR	CCNB3
CIC	DUX4	TFG	ROS1	COL6A3	CSF1	MEAF6	PHF1
EWSR1	FLI	ETV6	NTRK3			SS18	SSX
VGLL2	NCOA2	FN1	FGFR1				
ASPCR1	TFE3						
EBF1	RSAP52						
NAB2	STAT6						
WWTR1	CAMTA1						

Conséquences en oncogénèse

Les nouvelles techniques de séquençage nous font découvrir beaucoup de nouveaux gènes de fusion mais dont les conséquences sur la carcinogénèse sont incertaines. Les arguments en faveur d'une anomalie « drivers » sont:

- Une évaluation dans des modèles expérimentaux (lignées cellulaires) montrant un gain en survie, prolifération, etc...
- La fréquence et la récurrence de l'anomalie
- Son association à relativement peu d'autres mutations
- Le fait qu'elle soit limitée à un ou quelques sous-types morphologiques.

Les translocations peuvent avoir plusieurs conséquences impliquées dans la carcinogénèse:

- La création d'un gène chimérique (dont l'expression peut être perturbée) ainsi que d'une protéine hybride (Figure 8). Les types de gènes impliqués dans les fusions sont les FT (augmentation ou répression de leur activité transcriptionnelle), les protéines kinases (activation constitutive de la kinase), les nucléoporines (impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique des protéines), les Rspodins (impliqués dans la signalisation WNT) et les septines (rôle important dans la mitose). Par exemple, l'anomalie driver du sarcome d'Ewing une protéine chimérique générée par une translocation EWS-FLI caractéristique de la tumeur. Des études ont identifié des gènes cibles de la protéine EWS-FLI, tels que GLI1 ou FOXO1 et leur rôle dans l'oncogénèse (43).
- La modification de l'expression d'un gène, souvent expliqué par une fusion d'un promoteur « fort » à un oncogène (Figure 9). Dans le cas des dermatofibrosarcomes de

Darier et Ferrand, caractérisés par la fusion *COL1A1-PDGFB*, on observe une surexpression du partenaire C-Terminal (*PDGFB*) par échange de promoteurs avec *COL1A1* (Promoter « swapping ») (44).

- La perte d'une partie de matériel chromosomique entraînant la production d'une protéine tronquée (Figure 10). Les types de gènes impliqués sont souvent des gènes suppresseurs de tumeurs.

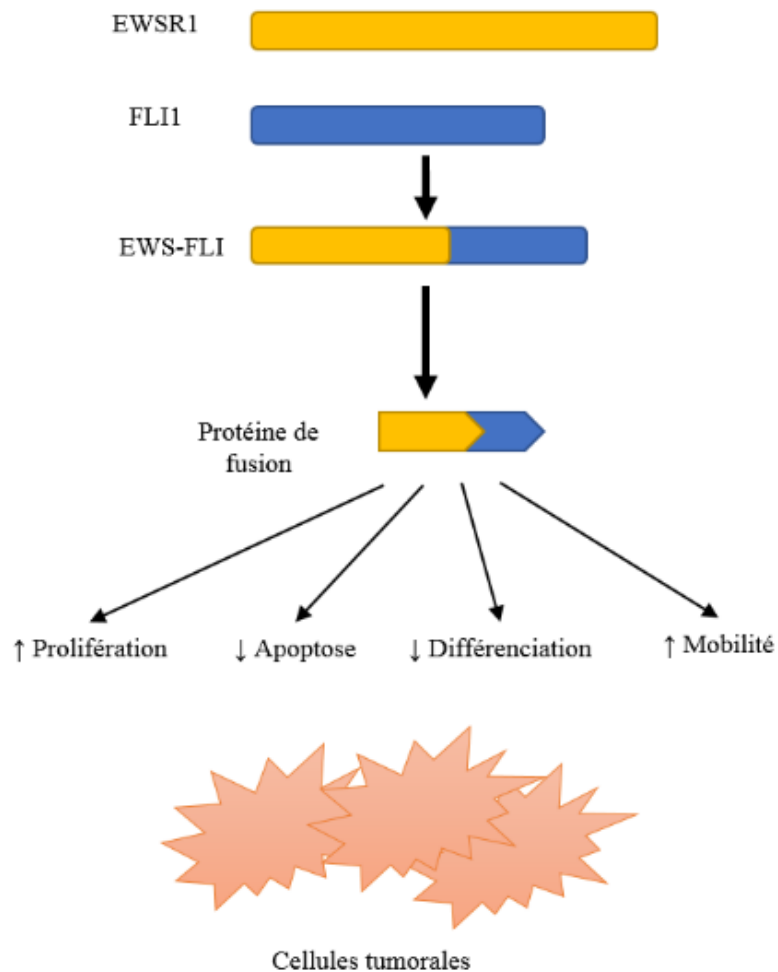


Figure 8. Dans le sarcome d'Ewing, la fusion EWS-FLI induit la création d'un gène chimérique et d'une protéine hybride qui va agir comme FT sur des oncogènes et favoriser la survie et la prolifération cellulaire.

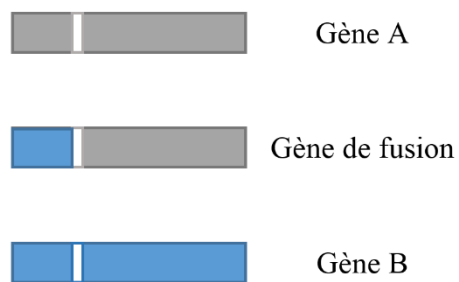


Figure 9. L'expression de l'oncogène B est modifiée par la fusion du promoteur « fort » du gène A

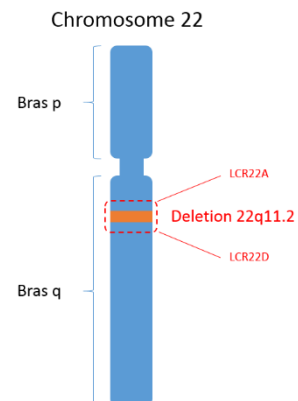


Figure 10. Le principal mécanisme d'inactivation de SMARCB1 dans les sarcomes épithélioïdes consiste en une délétion bi-allélique 22q11 correspondant à la perte d'un petit fragment du chromosome 22 englobant le locus du gène suppresseur de tumeur SMARCB1 (45).

Sarcomes à translocation

Ces translocations spécifiques génèrent des gènes de fusion, codant pour des modulateurs de transcription ou des protéines qui agissent comme des facteurs de croissance et sont directement responsable du développement tumoral. Plusieurs mécanismes sont retrouvés dans les sarcomes:

- *EWSR1* et *FLI1* dans les sarcomes d'Ewing : combinaison d'un promoteur fort avec un domaine spécifique d'activation transcriptionnelle
- *COL1A* et *PDGFB* dans les dermatofibrosarcomes de Darier et Ferrand : formation d'un facteur de croissance autocrine
- *ETV6* et *NTRK3* dans les fibrosarcomes infantiles: activation d'un récepteur à tyrosine kinase indépendamment de son ligand.

Les sarcomes à translocation surviennent le plus fréquemment chez des sujets jeunes, souvent sous forme de tumeur cliniquement agressive. L'aspect morphologique est monomorphe, constitué de cellules fusiformes ou rondes. Les translocations peuvent être détectées par FISH, RT-PCR (Reverse Transcript Polymerase Chain Reaction) et RNAseq (séquençage de l'ARN). Ces anomalies génétiques représentent un outil diagnostique et pronostique majeur utilisé aujourd'hui en routine (exemple des translocations *PAX3* ou *PAX7* dans les rhabdomyosarcomes).

Une liste non exhaustive des sarcomes à translocations est décrite dans le tableau 2.

Tableau 3. Liste non exhaustive de sarcomes à translocation, avec les translocations chromosomiques et les gènes de fusion correspondant.

Sous-type histologique	Translocation chromosomique	Gène de fusion
Sarcome d'Ewing	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(q22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) t(16;21)(p11;q22)	EWSR1-FLI1 EWSR1-ERG EWSR1-ETV1 EWSR1-ETV4 EWSR1-FEV FUS-ERG
Tumeur desmoplastique à petites cellules rondes	t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3-FOXO1 PAX7-FOXO1
Sarcome alvéolaire des parties molles	t(X;17)(p11;q25)	ASPL-TFE3
Synoviosarcome	t(X;18)(p11;q11) t(X;18)(p11;q11) t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX1 SS18-SSX2 SS18-SSX4
Liposarcome myxoïde	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	FUS-DDIT3 EWSR1-DDIT3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	t(1;2)(q21;p23) t(2;19)(p23;p13) t(2;17)(p23;q23)	TMP3-ALK TMP4-ALK CLTC-ALK
Sarcome à cellules claires	t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1
Fibrosarcome infantile	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3

Outre le rôle diagnostique, la découverte de ces fusions a permis une révolution dans la prise en charge thérapeutique de certains sarcomes. Nous pouvons prendre l'exemple du fibrosarcome infantile, tumeur maligne rare qui survient habituellement au cours de la première année de vie, caractérisée par un transcrit de fusion *ETV6-NTRK3*. Comme la plupart des sarcomes, le traitement de choix reste l'exérèse chirurgicale large. Cependant, l'exérèse

chirurgicale complète est parfois impossible ou mutilante. Or, nous disposons depuis peu (autorisation européenne de mise sur le marché en septembre 2019) d'un médicament, le larotrectinib (Vitrakvi®) correspondant à un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant NTRK et bloquant l'action des protéines de fusion TRK. L'efficacité de ce traitement est majeure, avec des taux de réponses aux environs de 80% permettant ainsi d'éviter des chirurgies mutilantes (Figure 8). La mise en évidence de ces réarrangement chromosomiques apparaît donc comme indispensable, tant sur le plan diagnostique que sur le plan thérapeutique.



Figure 10. Fille de 2 ans atteinte d'un fibrosarcome infantile en progression sous chimiothérapie (vincristine actinomycine cyclophosphamide). En alternative à l'amputation, un essai thérapeutique avec le LAROTRECTINIB a été proposé, ayant permis une excellent réponse tumorale une chirurgie conservatrice avec sir la pièce opératoire une réponse complète pathologique.

Les sarcomes du stroma endométrial

Les sarcomes du stroma endométrial (SSE) sont des tumeurs mésenchymateuses gynécologiques très rares, représentant environ 0.2% de toutes les tumeurs du tractus génital, 2% de tous les sarcomes et environ 10% des sarcomes utérins (les 90% restant étant essentiellement représentés par les léiomyosarcomes et les sarcomes utérins indifférenciés) (45). L'incidence annuelle des SSE est de 1 à 2 par million de femmes. En comparaison des autres tumeurs malignes de l'utérus, les SSE affectent les femmes plus jeunes avec un âge moyen au diagnostic entre 42 et 58 ans. Ces tumeurs hétérogènes sur le plan morphologique, moléculaire, clinique et pronostique appartiennent au groupe des « **sarcomes à translocation** ». La dernière classification de l'OMS (46) distingue les SSE de bas grade (SSE-BG) des SSE de haut grade (SSE-HG).

Les SSE de bas grade

Epidémiologie et clinique

Les SSE de bas grade représentent moins de 1% des tumeurs utérines malignes mais sont le second type le plus fréquent de tumeur maligne mésenchymateuses (46). Ils surviennent généralement en période périménopausique (47) mais quelques cas ont été décrits chez l'adolescente ou la femme jeune (48). Le diagnostic se fait le plus souvent dans un contexte de métrorragies ou de douleurs abdominales.

Biopathologie

Le corps utérin est la localisation la plus fréquente, mais la tumeur peut prendre naissance dans d'autres localisations comme l'ovaire (49). D'un point de vue macroscopique, il s'agit de polypes intracavitaires ou de tumeurs intramurales mal limitées. Le myomètre est envahi, avec un aspect de « vermiottes ». Plus rarement, la tumeur peut apparaître bien limitée. A la coupe la tumeur est charnue, jaunâtre, parfois siège de remaniements hémorragiques ou nécrotiques. D'un point de vue microscopique, les cellules tumorales ressemblent à celles du stroma endométrial en phase proliférative, s'agencant autour de vaisseaux spiralés. Elles forment des plages de cellules de petite taille monomorphes, avec peu de cytoplasme, dotées de noyaux ovoïdes ou fusiformes aux contours réguliers. Les atypies cytologiques sont rares. Il existe une infiltration typiquement en « doigt de gant » au sein du myomètre, ainsi qu'une fréquente invasion lymphovasculaire. En cas de tumeur macroscopiquement bien limitée, l'échantillonnage est essentiel afin de mettre en évidence des secteurs d'infiltration. L'activité mitotique est généralement faible (<5 mitoses pour 10 HPF), mais un compte plus élevé n'exclut pas le diagnostic. Une hyalinisation du stroma est fréquente (50). Il existe des variantes morphologiques pouvant représenter un challenge diagnostique. En effet on peut observer une différenciation divergente à type de cordons sexuels (environ 25% des cas) (51), musculaire lisse (jusqu'à 45% des cas) (51), rhabdoïde (52) ainsi que des variantes fibroblastiques ou myxoïdes. Plus rarement on peut retrouver des glandes endométrioïdes (53).

En IHC, les cellules tumorales expriment typiquement les récepteurs hormonaux (RE, RP), ainsi que le CD10 de façon diffuse et intense. Cependant, le CD10 n'est pas un marqueur spécifique : il peut en effet être exprimé par certaines tumeurs musculaires lisses comme les léiomyosarcomes ou les léiomyomes cellulaires (jusqu'à 50% pour ces derniers) (48). A contrario, tous les SSE de bas grade ne sont pas CD10+, et l'expression nucléaire de la bêta-caténine peut aider au diagnostic différentiel avec une tumeur musculaire lisse, qui n'exprimera

pas la β -caténine (54). En effet, les tumeurs musculaires lisses représentent le diagnostic différentiel principal (55). L'AML et la desmine peuvent être focalement positives, mais la h-caldesmon est négative sauf dans des zones de différenciation musculaire lisse. Les foyers de différenciation divergente à type de cordons sexuels peuvent exprimer la calrétinine, l'inhibine, le WT1 ou la Melan A (48).

La majorité des SSE de bas grade sont caractérisés par des translocations chromosomiques récurrentes. Le réarrangement chromosomique le plus fréquent correspond à la translocation spécifique entre les chromosomes 7 and 17 : t(7;17)(p15;q21) entre les gènes *JAZF1* et *SUZ12* identifiée en 2001 par Koontz (56). Elle est retrouvée dans près de la moitié des SSE de bas grade (57) et semble être spécifique, pouvant permettre d'aider au diagnostic différentiel avec d'autres tumeurs comme les léiomyomes, léiomyosarcomes ou UTROSC (55,57). La protéine SUZ12 appartient au complexe protéique PRC2 impliqué dans le remodelage de la chromatine (58) et la protéine de fusion JAZF1-SUZ12 pourrait déstabiliser ce complexe, entraînant une diminution de l'activité de l'histone méthyl transférase ainsi qu'une diminution de la triméthylation de H3K27, activant ainsi les gènes normalement réprimés par PRC2 tels que l'oncogène HOX9 (59).

Pronostic et prise en charge thérapeutique

Le facteur pronostique majeur de survie est le stade FIGO (Fédération Internationale Des Gynéco-Obstétriciens) au diagnostic (Tableau 1). Les SSE-BG sont des tumeurs indolentes (60), se présentant généralement à un stade FIGO I, chirurgicalement résécables. Elles ont alors un pronostic excellent, avec un néanmoins un risque de récurrence locale ou à distance, parfois très tardive. La survie à 5 ans dépasse les 90% pour les stades I et II, et baisse entre 40 et 50% pour les stades plus avancés (47,61).

Le traitement standard des SSE-BG est chirurgical, et consiste en une hystérectomie totale avec annexectomie bilatérale (19,61). Au diagnostic, environ 10% des patientes présentent une atteinte ganglionnaire (62) mais le curage ganglionnaire systématique ne semble pas améliorer la survie et n'est donc pas indiqué. Un traitement adjuvant n'est également pas indiqué. En cas de récurrence opérable, une nouvelle chirurgie peut être proposée. En cas de maladie avancée/métastatique, l'hormonothérapie par anti-aromatase est le traitement de référence (63,64).

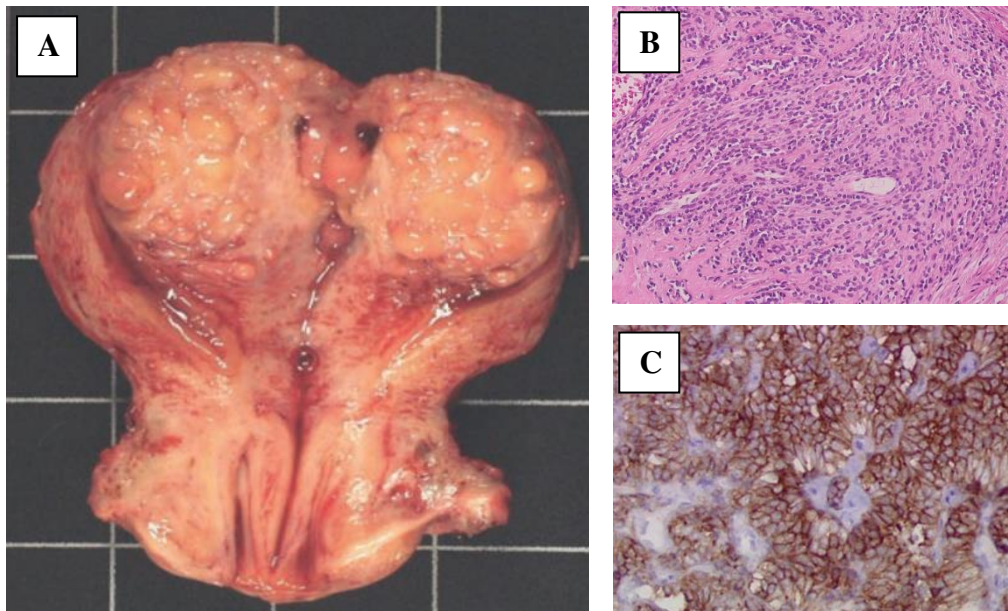


Figure 1. Exemple de SSE-BG A. Etude macroscopique B. coloration HES C. IHC CD10

Tableau 1. Classification FIGO 2009 des sarcomes du stroma endométrial

Classification FIGO 2009 des sarcomes du stroma endométrial	
Stades	Définition
I	<i>Tumeur limitée au corps utérin</i>
IA	≤ 50 mm
IB	> 50 mm
II	<i>Tumeur étendue eu pelvis</i>
IIA	Atteinte annexielle
IIB	Extension extra-utérine
III	<i>Tumeur étendue à l'abdomen</i>
IIIA	Extension abdominale sur 1 site
IIIB	Extension abdominale sur > 1 site
IIIC	Métastases ganglionnaires pelviennes et/ou lombo-aortiques
IV	<i>Métastases à distance</i>
IVA	Extension à la vessie et/ou au rectum
IVB	Métastases à distances y compris ganglions extra-abdominaux et inguinaux

Les SSE de haut grade

Epidémiologie et clinique

L'existence des SSE de haut grade a longtemps été débattue et l'entité fut notamment exclue de la classification OMS 2003, qui reconnaissait uniquement les SSE-BG et les sarcomes utérins indifférenciés. Cependant de nouvelles études ont mis en évidence des SSE présentant une activité mitotique augmentée ainsi que des critères histologiques de haut grade, sans pléomorphisme nucléaire significatif, de sorte qu'ils ne pouvaient être classés ni parmi les SSE-

BG ni parmi les Sarcomes utérins indifférenciés (65). Le diagnostic se fait le plus souvent dans un contexte de métrorragies post-ménopausiques ou de douleurs abdominales. L'utérus est parfois volumineux. L'examen clinique peut retrouver une masse pelvienne. Le stade initial est fréquemment avancé.

Biopathologie

D'un point de vue macroscopique, l'aspect est globalement semblable à celui des SSE-BG, avec néanmoins des remaniements hémorragiques et nécrotiques plus fréquents (48). D'un point de vue microscopique, ces tumeurs ont une architecture diffuse ou en nids, infiltrant le myomètre, et présentent une invasion vasculaire. Elles se composent d'un contingent de haut grade, formé de cellules rondes relativement monomorphes, parfois épithélioïdes. Elles sont dotées de noyaux irréguliers et augmentés de volume, au sein d'un réseau capillaire riche arborescent. L'index mitotique est plus élevé que dans les SSE-BG (66,67). Dans environ la moitié des cas, il existe un contingent de cellules fusiformes de bas grade, mimant un SSE-BG, au sein d'un stroma fréquemment fibreux ou myxoïde (66). Les 2 composants sont généralement étroitement mélangés, résultant en un aspect biphasique à faible grossissement.

Sur le plan immunohistochimique, le phénotype varie selon le contingent. Dans le contingent de haut grade les cellules sont ER-, PR-, CD10-, cycline D1+++ alors que dans le contingent de bas grade, l'immunophénotype est semblable à celui des SSE-BG (ER+, PR+, CD10+, cycline D1 focalement et faiblement positive). La cycline D1 a donc été suggérée comme marqueur diagnostique de cette entité, à la fois très sensible et très spécifique, pouvant également aider au diagnostic différentiel avec d'autres tumeurs mésenchymateuses utérines (68). Ce marquage, peu habituel parmi les sarcomes utérins, est un argument fort pour le diagnostic en association avec une négativité du CD10 (50). Cependant la cycline D1 ne permet pas le

diagnostic différentiel avec les carcinomes utérins indifférenciés, à la morphologie parfois proche, et qui sont très fréquemment cycline D1+, CD10- (52). Tout comme dans les SSE-BG, on peut observer une expression nucléaire de la β -caténine, sans qu'il y ait de mutation du gène. (54,65). Le marqueur BCOR semble être également un marqueur des SSE-HG avec une bonne spécificité (69).

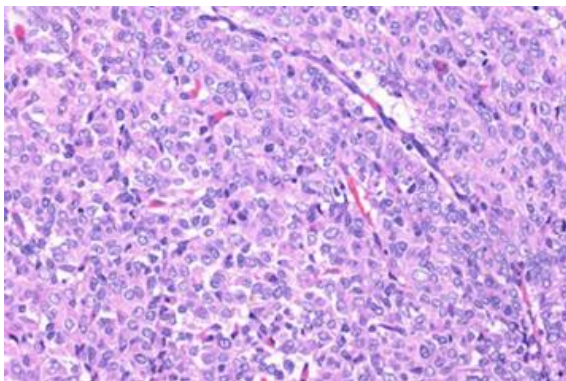


Figure 2. Exemple de SSE-HG (coloration HES)

Les SSE-HG sont également caractérisés par des translocations chromosomiques récurrentes, mutuellement exclusifs avec ceux observés dans les SSE de bas grade. Le réarrangement le plus fréquent correspond à une translocation chromosomique spécifique impliquant les chromosomes 10 et 17 (t(10;17)(q22;p13)), correspondant au niveau moléculaire à un gène de fusion entre *YWHAE* et *NUTM2* (66). Dans la classification OMS 2014, les tumeurs portant cette fusion sont actuellement les seules à pouvoir être classées en SSE-HG.

Pronostic en prise en charge thérapeutique

Les SSE-HG sont cliniquement plus agressifs que les SSE-BG (66), avec un stade FIGO plus élevé au diagnostic, et un plus fort taux de récurrence et de mortalité (67,70). Le traitement

standard des formes localisées consiste en une hystérectomie totale avec annexectomie bilatérale. Des données rétrospectives suggèrent qu'un traitement adjuvant par chimiothérapie et/ou radiothérapie pourrait améliorer la survie globale (71,72). En cas de maladie avancée/métastatique, la négativité des récepteurs hormonaux (RE, RP) suggère que l'hormonothérapie serait de moindre efficacité. Un traitement systémique à base d'anthracyclines est donc le 1^{er} choix (19).

Problématiques, hypothèses initiales et objectifs

Problématiques

Le diagnostic différentiel entre SSE-BG et SSE-HG est primordial en raison des implications pronostiques et thérapeutiques. En effet, comme on a pu le voir précédemment, le pronostic des SSE-BG est nettement meilleur que celui des SSE-HG, quel que soit le stade de la maladie (62,73). Au stade localisé, le traitement du SSE-BG sera strictement chirurgical alors qu'en cas de SSE-HG, se discutera un traitement adjuvant par chimiothérapie (un essai clinique est d'ailleurs actuellement ouvert en France dans cette indication, *NCT01979393*) et/ou radiothérapie (19,63,71,74). Les modalités de surveillance des patientes vont également dépendre du grade (notamment la fréquence des visites de suivi et des examens complémentaires). Enfin, en cas de maladie avancée, le traitement sera radicalement différent, avec d'un côté une hormonothérapie par anti-aromatase pour les SSE-BG, et de l'autre côté une chimiothérapie voire polychimiothérapie intraveineuse à base d'anthracyclines pour les SSE-HG (20,75,76).

Or, cette distinction entre SSE-BG et SSE-HG peut s'avérer délicate sur les données morphologiques et IHC (77,78). La biologie moléculaire peut alors être d'une grande aide. Néanmoins, près de 50% des SSE ne présentent pas de fusion caractéristique *JAZF1-SUZ12* ou *YWHAE-NUTM2* (57,79). D'autres gènes de fusions, plus rares et mutuellement exclusifs des précédents, ont déjà été décrits et il est probable qu'il en existe d'autres.

Concernant les SSE-BG, les fusions *JAZF1-PHF1*, *EPC1-PHF1*, *MEAF6-PHF1*, *BRD8-PHF1* et *MBTD1-CXorf67* ont précédemment été rapportées (80–85). En parallèle, des fusions impliquant le gène *BCOR* ont été rapportées dans des SSE-HG. Ainsi, en 2013, Panagopoulos et al identifient la fusion entre *BCOR* sur le chromosome Xp11 et *ZC3H7B* en 22q13 (t(X;22)(p11q13)) (86). Ces tumeurs, morphologiquement de haut grade, ont un comportement clinique agressif. Plus récemment, d'autres réarrangements impliquant *BCOR* ont été décrits dans des SSE-HG, notamment des duplications en tandem (*BCOR-ITD*) (87,88). De manière intéressante, parmi l'ensemble de ces translocations « alternatives », nous retrouvons systématiquement des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine, notamment des gènes du groupe Polycomb (PcG). Les protéines du PcG sont des facteurs chromatinien qui agissent au niveau de leurs gènes cibles sous forme de larges complexes multimériques appelés Polycomb Repressive Complex (PRC). Ces complexes agissent sur la transcription de leurs gènes cibles en se fixant sur l'ADN au niveau de séquences régulatrices appelées PcG response elements (PRE) (89). Ainsi, SUZ12 appartient à PRC2, PHF1 est impliqué dans le recrutement de PRC2 à la chromatine (90), MBTD1 est impliquée dans PRC1 et BCOR appartient à PRC1.1 (complexe alternatif de PRC1) (91).

Enfin, le lien entre gène de fusion et grade ne semble pas si clair puisque la translocation *YWHAЕ-NUTM2* a déjà été décrite dans un SSE-BG (92). Il s'agissait d'un SSE strictement intra-endométrial et présentant une morphologie purement de bas grade bas, sans aucun secteur de haut grade après analyse de l'intégralité de la pièce opératoire. Cette tumeur exprimait diffusément la cycline D1. La patiente ne présentait pas de récurrence à 14 mois de suivi. Par ailleurs, des cas de SSE de haut grade avec fusion *JAZF1* ou *PHF1* ont également été décrits (93).

Hypothèses initiales et objectifs

Au début de ce travail de thèse, les analyses de séquençage ARN (RNAseq) n'étaient pas réalisées en routine, et c'est encore le cas actuellement dans la plupart des centres de prise en charge des cancers. Ainsi, lorsqu'un diagnostic de SSE est émis par un médecin pathologiste expert, une recherche de translocation est faite par technique FISH : *JAZF1* et/ou *YWHAE*. Cependant, on sait que cette technique FISH présente des limites, notamment parce qu'elle ne permet pas de connaître le partenaire de la fusion. De plus, on sait que ces réarrangements ne sont pas présents systématiquement et ces dernières années, la littérature a mis en évidence l'existence de nombreux transcrits « alternatifs ». Ainsi, nous avons supposé que le RNAseq serait une technique pertinente pour découvrir de nouvelles anomalies génétiques « drivers » dans les SSE mais également pour optimiser la précision diagnostique et la classification des tumeurs.

Par ailleurs, l'impact clinique et thérapeutique de ces transcrits de fusions n'est pas complètement élucidé. Concernant les SSE, le type de transcrit retrouvé est-il directement corrélé au grade de la tumeur (SSE-HG versus SSE-BG)? Constitue-il à lui seul un facteur pronostic indépendant et/ou un facteur prédictif de réponse au traitement? Enfin, les mécanismes du développement tumoral en lien avec les différents transcrits de fusion demeurent encore très obscurs. Aussi, la compréhension des mécanismes moléculaires induits par les différents types de translocations permettrait de mieux comprendre le développement de ces tumeurs et de proposer des traitements plus ciblés.

L'objectif de ce travail était double:

- Dans un premier temps, nous souhaitions réaliser une description exhaustive du paysage moléculaire de SSE, en utilisant la technique de RNAseq sur des tumeurs pour lesquelles la recherche des transcrits classiques *JAZF1-SUZ12* et/ou *YWHAE-NUTM2* était négative en FISH.
- Dans un second temps, nous souhaitions réaliser des analyses fonctionnelles des fusions oncogéniques retrouvées dans les SSE, en utilisant une technique de clonage et transfection sur des lignées cellulaires, pour mieux comprendre les mécanismes de carcinogenèse induit par ces fusions.

Travaux de recherche

Introduction

Pour rappel, les SSE sont des sarcomes dits « à translocation », avec 2 translocations canoniques : i. *JAZF1-SUZ12*, retrouvée dans les SSE de bas grade ii. *YWHAE-NUTM2*, retrouvée dans les SSE de haut grade. Néanmoins, ces translocations ne sont pas présentes dans près de la moitié des SSE et d'autres réarrangements chromosomiques ont précédemment été mis en évidence.

En partant de ce constat, nous avons décidé de réaliser une étude rétrospective portant sur l'ensemble des tumeurs du département de biopathologie du Centre Léon Bérard (CLB) ayant bénéficiée d'une technique FISH à la recherche d'un réarrangement de *JAZF1* et/ou *YWAHE* et dont les résultats étaient négatifs (absence de réarrangement). Ainsi, nous avons identifié 100 cas. Puis nous avons analysé les dossiers cliniques et parmi ces 100 cas, 43 avaient été diagnostiqués « tumeurs stromales de l'endomètre » après relecture par un pathologiste expert du CLB.

Ceci a constitué notre série rétrospective, pour laquelle nous avons récupéré du matériel tumorale (bloc FFPE) afin de réaliser une technique de RNAseq à la recherche de nouvelles anomalies génétiques.

Nous présentons les résultats ci-dessous sous la forme d'un article accepté pour publication cette année dans la revue *Cancers*.

Article 1

The molecular landscape of endometrial stromal sarcomas uncovers three nosological entities with distinct natural history.

Mehdi Brahmi, Tatiana Franceschi, Isabelle Treilleux, Daniel Pissaloux, Isabelle Ray-Coquard, Armelle Dufresne, Helene Vanacker, Melodie Carbonnaux, Pierre Meeus, Marie-Pierre Sunyach, Amine Bouhamama, Marie Karanian, Alexandra Meurgey, Jean-Yves Blay, and Franck Tirode

Tel qu'accepté pour publication dans revue « Cancers » le 08 septembre 2020.



Molecular classification of endometrial stromal sarcomas using RNA sequencing defines nosological and prognostic subgroups with different natural history.

Mehdi Brahmi^{1,2,*}, Tatiana Franceschi¹, Isabelle Treilleux¹, Daniel Pissaloux^{1,2}, Isabelle Ray-Coquard^{1,2}, Armelle Dufresne¹, Helene Vanacker¹, Melodie Carbonnaux¹, Pierre Meeus¹, Marie-Pierre Sunyach¹, Amine Bouhamama¹, Marie Karanian^{1,2}, Alexandra Meurgey¹, Jean-Yves Blay^{1,2} and Franck Tirode^{1,2,*}

¹Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.

²Univ Lyon, Claude Bernard University Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard, 69008, Lyon, France

*Corresponding author: Dr. Mehdi Brahmi, mehdi.brahmi@lyon.unicancer.fr;

Accepted on 08 September 2020

Abstract: A series of 42 patients tumors diagnosed as endometrial stromal sarcomas (ESS) based on the morphology but negative for *JAZF1* and/or *YWHAE* rearrangement in FISH was analyzed by RNA-sequencing. A chromosomal rearrangement was identified in 31 (74%) of the cases and a missense mutation in known oncogenes / tumor suppressor genes in 11 (26%). Cluster analyses on the expression profiles from this series together with a control cohort composed of 5 samples of Low Grade ESS harboring a *JAZF1-SUZ12* fusion, 1 High Grade ESS harboring a *BCOR*-ITD, 2 uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors, 2 samples each of uterine leiomyoma and leiomyosarcomas and a series of *BCOR*-rearranged family of tumor (N=8), indicated that tumors could be gathered in three distinct subgroups: one mainly composed of *BCOR*-rearranged samples that contained 7 ESS samples; one mainly composed of *JAZF1*-fused ESS (N=15) and the last composed of various molecular subtypes (N=19). These three subgroups display different gene signatures, different *in silico* cell cycle scores, and very different clinical presentations, natural history and survival (Log-rank test, $P=0.004$). While *YWHAE-NUTM2* fusion genes may be present in both high and low grade ESS, the high-grade presenting with an additional *BCOR* or *BCORL1* gene mutations. RNAseq brings clinically relevant molecular classification, enabling to reclassify diseases and to guide therapeutic strategy.

Keywords: Endometrial stromal sarcomas; RNA-sequencing; Gene fusions; Prognostic; Uterine; Sarcoma; Expression profile

1. Introduction

Endometrial stromal sarcoma (ESS) is a rare disease accounting for less than 1% of all uterine tumors (45). It represents the second most common type of uterine mesenchymal neoplasm, after leiomyosarcoma. ESS gather a heterogeneous group of tumors with distinct clinical, histological, and genetic characteristics. According to the 2014 WHO (World Health Organization) Classification (94), ESS are divided in three categories: low-grade ESS (LG-ESS), high-grade ESS (HG-ESS) and undifferentiated uterine sarcoma (UUS).

In addition to morphological and immunohistochemical data, the integration of molecular methods enables a more precise diagnosis and nosological classification. It may be important for guiding clinical management in entities with different natural history. Current state of the art indicates that ESS are characterized by different types of recurrent genetic events, most commonly chromosomal translocations that frequently involve chromatin remodeling genes. The two most frequent gene fusions

are *JAZF1-SUZ12* (56), known to be associated with LG-ESS and favorable prognosis and *YWHAE-NUTM2* (66), known to be related to HG-ESS and high risk of rapid relapse and death. Adjuvant therapy is not recommended for *JAZF1*-fused LG-ESS and in case of advanced disease, aromatase-inhibitors (AI) is the standard treatment (63). Conversely, *YWHAE*-fused HG-ESS are considered as high risk tumors for which adjuvant chemotherapy and radiotherapy is often recommended and in case of advanced disease, they are considered to be insensitive to hormonal therapies and cytotoxic chemotherapy is considered appropriate (19,72).

Grading and molecular classification are therefore of importance to classify ESS and decide on a treatment. In current routine practice, *JAZF1-SUZ12* and *YWHAE-NUTM2* fusion genes are screened by fluorescence in situ hybridization (FISH) which has limitations: i) the most commonly used FISH test being a break-apart probe allows detection of only one of the rearranged genes and may induce false negatives; ii) about half of ESS does not harbor a fusion of *JAZF1* or *YWHAE*. Involvement of the *PHF1* gene in chromosomal rearrangements targeting band 6p21 has been found in LG-ESS with different partners from *JAZF1*, *EPC1*, *MEAF6* and *BRD8* (81–83), and some other recurrent rearrangements have been reported involving *BCOR* (86,95,96), *NCOA* (97,98) or *MBTD1* (85). Recently, the expression of *BCOR* using IHC was proposed as a criteria to classify HG-ESS carrying a *BCOR* rearrangement or a *YWHAE-NUTM2* fusion (69).

In order to improve ESS classification and provide guidance for disease management, we characterized the molecular alteration of LG- and HG-ESS lacking canonical translocations, investigating a retrospective series of “FISH-negative” ESS using RNA-sequencing. We hypothesize that not only RNA sequencing would help in a better risk stratification of ESS but would also provide a better description of their molecular landscape, by gathering their genetic abnormalities and specific expression profiles.

2. Results

2.1. Clinical and pathological features

This translational study was conducted on a retrospective series of 42 ESS negative for *JAZF1* rearrangement (N=22), for *YWHAE* rearrangement (N=11) or both (N=9) (Supplementary Figure 1). Patients and tumors characteristics are presented in Table 1 and Supplementary Table 1.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the investigational series of ESS.

N	42
Median Age (years); range	53; 26-82
Median size of the primary tumor (mm)	90
Pathological diagnosis (review)	
Low grade ESS	26
(Sex cords elements)	(4)
High grade ESS	7
Undifferentiated uterine sarcoma	8
No possibility of gradation*	1
FISH results	
<i>JAZF1</i> negative (<i>YWHAE</i> not performed)	22
<i>YWHAE</i> negative (<i>JAZF1</i> not performed)	11
Both <i>JAZF1</i> and <i>YWHAE</i> negative	9
Stage at diagnosis	
Localized	30
Metastatic	12

*One case initially diagnosed as “ESS with indefinite grade” because of unusual features for a low grade sarcoma (tumor necrosis, epithelioid cells, high cyclin D1 expression)

Using IHC, 62% (N=26) demonstrated a nuclear positivity of ER and/or PR and 76% (N=32) were positive for CD10. Overall, 26 (62%) were considered as LG-ESS using simple morphological classification including 4 (10%) with sex cord-like elements, 7 (16%) as HG-ESS, 8 (19%) as undifferentiated uterine sarcomas (UUS) and one (2%) could not be graded. Median age at diagnosis was 53 years (26 to 82 years). Thirty-nine (93%) were located in the uterus (two primary ESS of the ovary and one of the peritoneum). Twelve patients (29%) were metastatic at diagnosis (FIGO stage IV), 4 LG, 3 HG and 5 UUS. The median overall survival (mOS) of the whole cohort is 11.3 years. For FIGO stage IV disease, treatments received by patients (and duration) are detailed in the Supplementary Table 2.

2.2. Molecular classification using RNA-sequencing

All but one RNA-sequencing successfully passed the quality controls (98%, N=41). A chromosomal rearrangement was identified in 31 (74%) samples. The detected gene alterations are listed in the Supplementary Table 3. Briefly, an *YWHAE-NUTM2E* gene fusion was identified in 5 cases (12%), 10 samples (24%) carried a fusion involving a gene of the PHD family (*PHF1*, *PHF21A* or *KAT6B*), *BCOR*-rearrangements were observed in 5 (12%) samples, including 3 *BCOR* internal tandem duplications (*BCOR-ITD*), one *ZC3H7B-BCOR* fusion and a novel fusion, *CREBBP-BCOR* (supplementary Figure 2), and two (5%) samples carried a fusion involving genes of the *NCOA* family. In a single sample each, a *SYNGAP1-JAZF1* and a new gene fusion involving a chromatin remodeling gene (*RNF111-ARID2*) were identified. In 9 remaining samples, fusion genes could be identified but were either numerous, unrelated to chromatin remodeling process and of unknown function or described in other neoplasia than ESS. Among the latter, two cases (5%) harbored a fusion implicating *GLI1* relating them to the previously described “malignant epithelioid neoplasm with *GLI1* gene rearrangements” and one case (2%) harbored a *LMNA-NTRK1* fusion corresponding to the previously described *NTRK*-fused uterine sarcomas (99). Finally, in 8 samples (19%) we could not detect any in-frame fusion gene. Of note, 5 (11%) cases harbored complex genomic profiles with numerous gene fusions and/or had mutations involving either *TP53*, *KRAS*, *NRAS* or *BRAF*, consistent with a diagnosis of UUS, and one case presented a deletion of *SMARCA4* (together with a *NRAS* mutation), consistent with a *SMARCA4*-Deficient Undifferentiated Uterine Sarcoma. Of note, anytime a rearrangement involving *PHF1*, *YWHAE* or *JAZF1* was revealed by the RNAseq, a FISH (*PHF1* or *YWHAE* or *JAZF1*) was performed in addition. The expression profiles of this series was matched to a control cohort of 20 recently diagnosed cases, including 5 samples of LG-ESS harboring a *JAZF1-SUZ12* fusion, 1 HG-ESS harboring a *BCOR-ITD*, 2 uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors (UTROSCT) and 2 samples each of uterine leiomyoma and leiomyosarcomas. Because of the similarity of their genetic alterations, we also included 8 samples of soft-tissues and bone sarcomas carrying a *BCOR*-rearrangement [2 paediatric undifferentiated round cell soft tissue sarcoma (*BCOR-ITD*), 2 paediatric undifferentiated round cell bone sarcomas (*BCOR-CCNB3*) and 1 paediatric brain tumor (*BCOR-ITD*)] or an *YWHAE-NUTM2* fusion (2 paediatric undifferentiated round cell bone sarcomas). Unsupervised consensus hierarchical clustering divided the samples in 3 subgroups (Figure 1 and supplementary Figure 3).

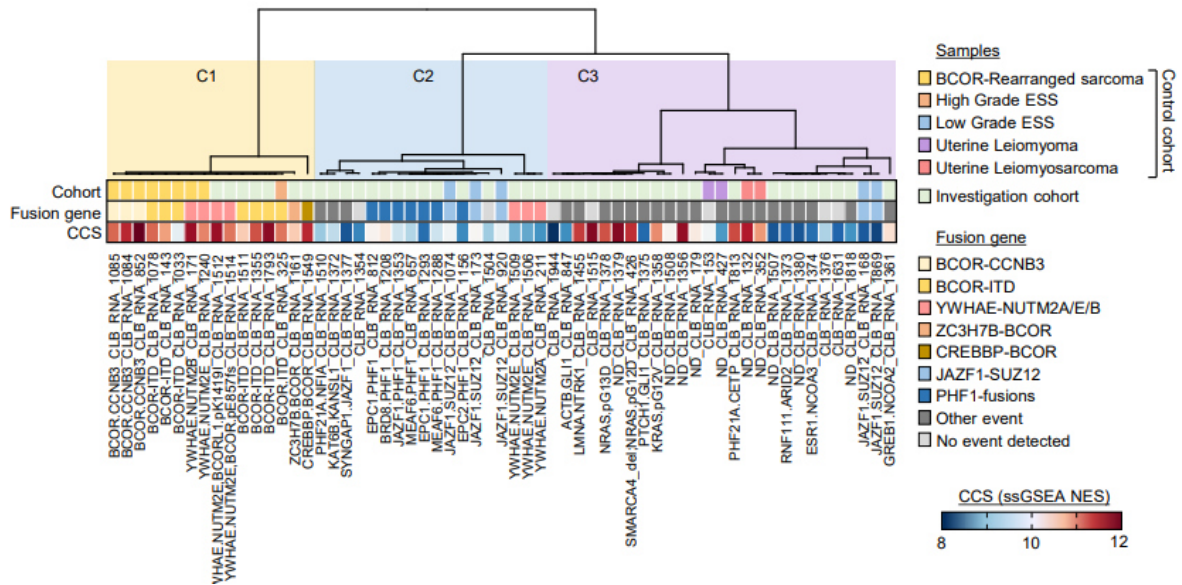


Figure 1. Consensus hierarchical unsupervised clustering of expression profiles extracted from FFPE tumor samples. Consensus for k=3 cluster is shown. Sample, tumor types and identified fusion genes are indicated. Single sample GSEA G2/M cell cycle score (CCS) for each samples is represented in a blue-red normalized scale.

Cluster C1 contained all the *BCOR*-rearranged sarcomas and 4 samples carrying an *YWHAE-NUTM2* fusion (2 ESS and 2 from the control cohort). Cluster C2 was composed of most *JAZF1*-fused and all *PHF1*-fused ESS from both the control and investigation cohorts, together with 3 *YWHAE-NUTM2* positive ESS samples. Cluster C3 grouped various molecular subtypes, including the *NCOA*-fused ESS, close to the cases of uterine leiomyosarcomas from the control cohort, and contained all the samples consistent with UUS.

Evaluation of a cell cycle score (CCS), based on single sample GeneSet Enrichment Analyses (ssGSEA) on the hallmark G2/M MsigDB geneset, showed that C1 samples had a high CCS, C2 samples had a rather low CCS and C3 cluster was mixed. These clustering data were significantly correlated to survival (Figure 2; Log-rank test, $P=0.004$).

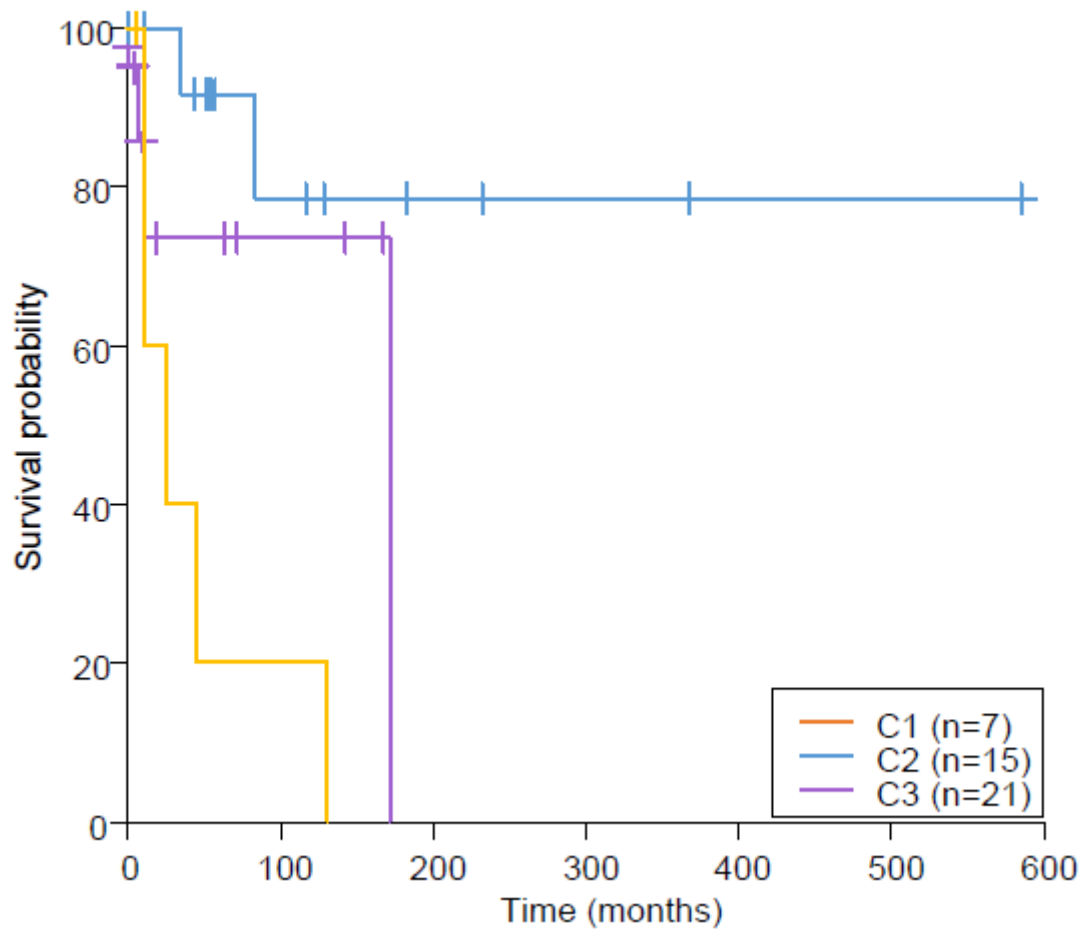


Figure 2. Kaplan-Meier survival analysis of the retrospective series of primary diagnosed ESS stratified by the clusters (Logrank, $P = 0.004$; Wilcoxon); x-axis, time in months. The three subgroups display different gene signatures, different in silico cell cycle score that significantly correlated with different overall survivals.

Indeed, ESS from the C1 group (High grade; HG) showed a more aggressive clinical behavior (mOS reached at 18 months) while ESS from the C2 group (Low grade; LG) were much more clinically indolent (mOS not reached) and C3 (Intermediate grade; IG) showed clinically intermediate behaviors (mOS not reached). Amongst 12 cases that had synchronous metastasis, 3 clustered in the C1/HG group (43%, $N=3/7$) and 8 clustered in the C3/IG group (38%, $N=8/21$) but only one clustered in the C2/LG group (7%, $N=1/15$), C2 tumors being less frequently metastatic at diagnosis (Fisher's exact test, $P=0.03$).

Finally, the proportion of ER and/or PR positive cases according to the cluster analysis was 2/7 (29%) in C1/HG, 14/14 (100%) in C2/LG and 12/21 (57%) in C3/IG (Fisher's exact test, $P=9.10 \times 10^{-4}$).

Overall, as shown in supplementary figure 4, the alteration detection coupled to expression profile clustering enabled reclassifying 12 cases (29%). Seven cases diagnosed as LG-ESS were reclassified either as HG-ESS with *BCOR* rearrangement ($N=2$), malignant epithelioid neoplasm with *GLI1* rearrangement ($N=2$), *NCOA* fusion-positive uterine tumors ($N=2$) or uterine leiomyoma ($N=1$). Two cases diagnosed as HG-ESS were reclassified as UUS and three cases diagnosed as UUS were reclassified either as HG-ESS ($N=1$), *NTRK* fusion-positive uterine sarcomas ($N=1$) and *SMARCA4*-deficient uterine sarcoma ($N=1$). Finally, one case diagnosed as ESS without possibility of gradation was classified as LG-ESS.

2.3. Differentially expressed genes and pathways

Supervised analyses highlighted genes specifically expressed in the defined clusters (Supplementary Figure 5A-E and Supplementary Table 4). We identified a significant difference regarding genes involved in the cell cycle/proliferation pathways, morphogenesis/development, translation and spliceosome (upregulated in the C1 as compared to the C2 and C3), and genes involved in immunity (downregulated in the C1 as compared to the C2 and C3). Comparing C2 and C3, we also identified significant differences regarding genes involved in cell cycle, inflammation and immunity (down-regulated in C2 as compared to C3) and regarding genes involved in neuron/synapse and translation (up-regulated in C2 as compared to C3).

We noticed that *WT1* gene is often absent or with low expression levels in the C1 tumors as compared as the C2/3 tumors (Supplementary Figure 4E), and the level of expression of *ESR1* was also significantly higher in the C2/3 than in the C1.

2.4. *YWAHE-NUTM2B* fusion are not uncommon in LG-ESS

Interestingly, the 5 cases harboring the *YWAHE-NUTM2B* fusion were divided by the clustering: two cases clustered as expected in the C1 group (HG) whereas three cases clustered in the C2 group (LG), with pure low-grade morphological features (Supplementary Figure 6). To rule out the fusion gene being expressed by a small number of high-grade cells within low-grade cells, we first looked at the normalized number of reads covering the fusion point without finding differences between the HG and LG samples (around one supporting read per million of mapped reads in both groups). Second, we found at least 80% of the cells having the *YWAHE* rearrangement in FISH analyses. However, the analysis of the 2 HG showed two nucleotide variation events identified: one mutation in *BCOR* (CLB_RNA_1514: NM_017745: exon4:c.2570_2571del:p.E857fs; AAR=0.28, validated by Sanger Sequencing) (Supplementary Figure 7) and one in *BCORL1* (CLB_RNA_1512: NM_021946: exon7:c.A4256T:p.K1419I; AAR=0.67).

The analysis of the differentially expressed genes / pathways between the two groups *YWAHE-NUTM2B*-positive cases (Supplementary Figure 8 and supplementary Table 5) identified upregulated genes involved in cell cycle/proliferation pathways and mitochondria in the HG cases, while genes involved in immune response, inflammation, angiogenesis and extracellular matrix were found downregulated in the HG cases. All LG *YWAHE-NUTM2B*-positive cases express high levels of *ESR1* while it was not expressed in the HG cases (Supplementary Figure 8C), a result that was further confirmed by IHC.

We then look specifically to the medical records of those 5 patients. All 3 patients in the C2 group are alive without disease (21, 12 and 7 years after the diagnosis). Conversely both patients of the C1 group died of the disease 10 months after the diagnosis for the patient with initial stage 4, and 12 years after diagnosis (for the second patient who had a late relapse at 10 years).

2.5. *BCOR* rearrangements are associated with a poor outcome

Unlike *YWAHE-NUTM2* positive cases, all the *BCOR*-rearranged tumors clustered in the C1 group. Among the 5 cases of our series, we had clinical data for 3 patients who had all died of the disease, respectively 10 months, 2 years and 3 years after the diagnosis.

2.6. Immune landscape

The 41 ESS samples were classified according to immune infiltrate: four main different groups were identified by clustering analysis (Figure 3).

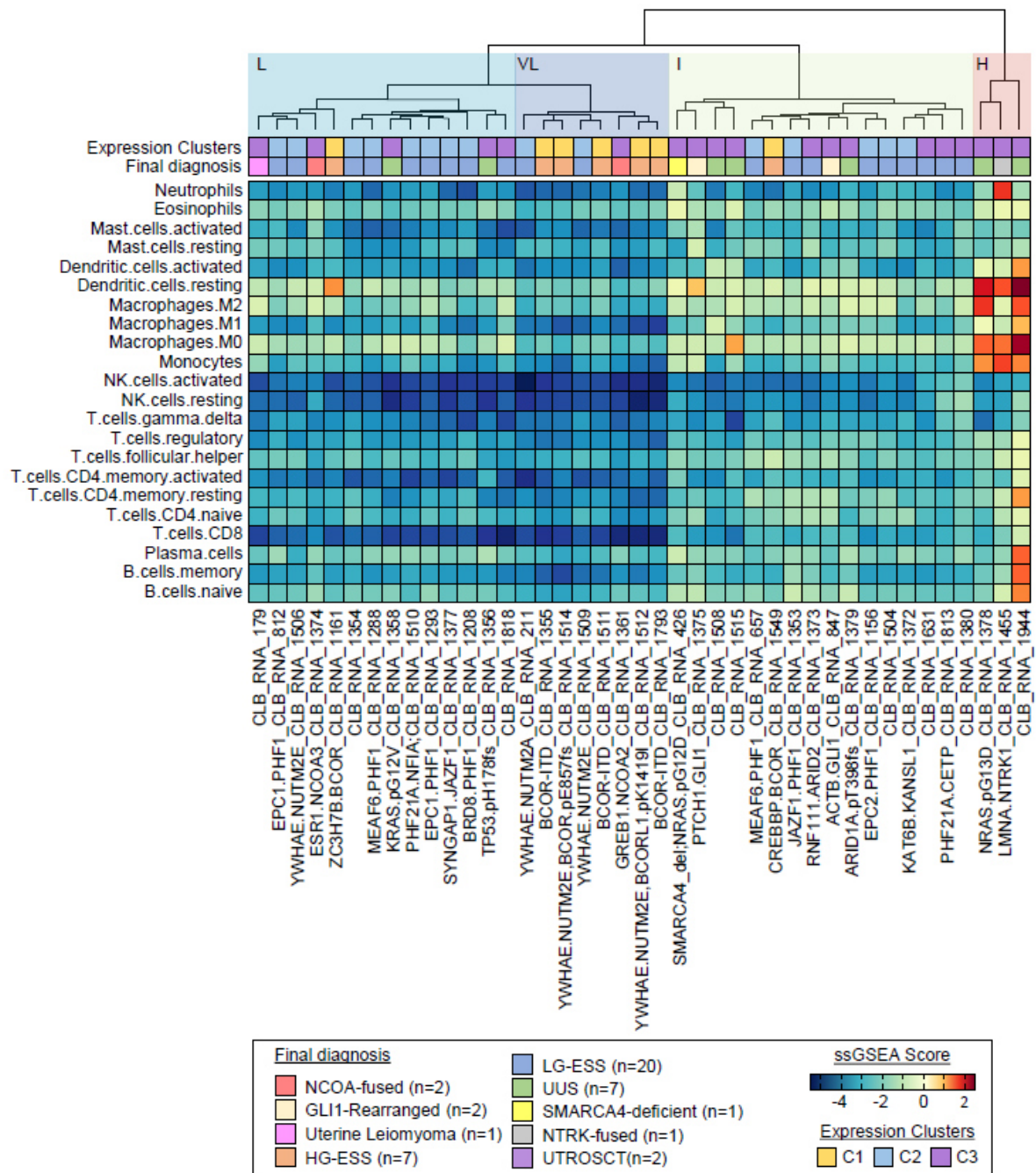


Figure 3. Hierarchical unsupervised clustering of the investigation cohort (n=43) upon immune infiltrate population profiles. Clustering analyses generated one group with high (H) immune infiltrate and one group with low immune infiltrate subdivided in 3 slightly different subtypes: very low (VL), low (L) and intermediate (I). Clusters from Figure 1 and final diagnosis are also reported.

Importantly, a small subset of tumors (composed of a case of UUS that harbored a *NRAS* G13D mutation, a case of uterine sarcoma with *LMNA-NTRK1* fusion and a case of UUS without relevant genomic alteration) stands out consistently from the other tumors. Those three tumors were highly infiltrated mostly by macrophage immune cell types (Subgroup H; High immune infiltrate). The other 38 tumors had limited or no immune cell infiltrates. Nevertheless, three slightly different subgroups could be distinguished among those tumors: VL (Very Low immune infiltrate), L (Low immune infiltrate) and I (intermediate). The VL subgroup (N=8; including 4 *YWHAE-NUTM2* fusion, three

BCOR-ITD and the *GREB1-NCOA2* positive tumors) is characterized by a very low immune infiltrate for all cell types, while the L subgroup (N=14; including most *PHF1*-fused tumors) harbor higher densities of macrophages and the I subgroup I (N=16; including 3 UUS and the two *GLI1*-rearranged neoplasm) is characterized by a higher densities of CD4+ T cells and macrophages.

3. Discussion

In the present work, we analyzed ESS lacking the canonical fusion genes and describe a novel classification of these rare sarcomas which provides guidance to predict their prognosis and to guide treatments. ESS include indeed a variety of different disease types with different genomic alterations and natural history. RNA-sequencing identified cytogenetically negative ESS and enabled to distinguish 3 biologically homogeneous risk groups by combining fusion gene discovery and expression profiling. The HG group is composed of ESS harboring a *BCOR* rearrangement while the LG group is composed of ESS that harbor a fusion of a *PRC2* zinc finger protein (e.g. *JAZF1*, *PHF1*). In addition, a third group considered as the IG group, close to the LMS of the control cohort, was composed of various molecular subtypes including *NTRK* fusion, *SMARCA4* loss, *NCOA* fusion and other genetic abnormalities such as *NRAS/KRAS* mutations. Importantly, we showed that *YWHAE-NUTM2* tumors are split in the HG and LG group.

Currently, the natural history prognosis and standard treatment of ESS depend on the histological grade of the tumor. According to the current WHO classification (100), *YWHAE*-fused ESS represent a clinically aggressive subtype of ESS classified as HG-ESS, distinct from the usual LG-ESS with *JAZF1* rearrangement and from UUS with no identifiable molecular aberration. In details, standard local treatment of LG-ESS is 'en bloc' total hysterectomy (including bilateral salpingo-oophorectomy) and in case of advanced disease, AI is usually preferred. In the case of HG-ESS and UUS, previous clinical studies have shown that adjuvant radiotherapy and adjuvant chemotherapy might improve overall survival (71), and in case of advanced disease, conventional systemic chemotherapy is recommended (19). Considering the molecular classification using RNA sequencing, the LG group has a very good prognosis and adjuvant therapy should not be considered while in case of advanced disease, AI should remain the standard. Conversely, the HG group has a very poor prognosis and as they grouped together with the *BCOR-CCNB3* positive samples (so called "Ewing-like" sarcomas) from the control cohort, describing a very-well defined cluster, the therapeutic strategy should be discussed, both in the adjuvant and the metastatic setting, with potentially a more intensive multiagent chemotherapy regimen. The IG group shows an intermediate behavior, the role of AI in advanced disease is much more uncertain than in the LG group and RNAseq is crucial as it could guide the treatment (eg *NTRK*-fused uterine sarcomas). Finally, RNAseq is essential for the *YWHAE-NUTM2* positive ESS, in order to split the tumors in HG/LG and guide the therapeutic strategy.

The results presented here show that molecular analysis is therefore important to assess the prognosis and guide the clinical management. Indeed, 50% of ESS do not harbor a *JAZF1* and *YWHAE* rearrangement by FISH, which represents an insufficient examination for the characterization of these cancers. Given the heterogeneity of these cancers and the frequent absence of canonical mutations, RNAseq represents an efficient diagnostic tool in routine to identify accurately the different subtypes of ESS with completely opposite natural history and prognosis. Importantly, RNAseq also enabled the reclassification of a quarter of the ESS, such as a tumor initially classified as LG-ESS and finally corresponding to a *ZC3H7B-BCOR* HG-ESS (CLB_RNA_1161) and a tumor initially classified as HG-ESS and finally harboring a *LMNA-NTRK* fusion (CLB_RNA_1455). The first patient presented with a stage IV FIGO disease at diagnosis. She had a 90 mm uterine tumor, microscopically composed of ovoid cells with a myxoid background, low mitotic count, no tumor necrosis and no vascular invasion, strongly positive for CD10 and Cyclin D1, weakly positive for hormone receptors. She received an AI as a first line treatment. Unfortunately, she progressed rapidly and died in less than 6 months. With the benefit of hindsight, those *ZC3H7B-BCOR* ESS are indeed known to be associated with abundant myxoid stroma and with aggressive clinical behavior. The second patient had a rapidly progressive disease after an anthracycline-based chemotherapy regimen and did not have time to enter an *NTRK*

inhibitor trial or routine treatment. Similarly, UUS reclassified as *SMARCA4*-Deficient uterine sarcoma (CLB_RNA_426), also called “malignant rhabdoid tumor of the uterus”, is a candidate to anti-PD1 in a clinical trial given the high response rates to immunotherapy in this entity (NCT03012620). In addition, a case initially diagnosed as LG-ESS was reclassified as leiomyoma (CLB_RNA_179). Microscopically, the tumor cells were strongly positive for Desmin, Cyclin D1 and WT1, moderately positive for ER/PR, weakly positive for SMA, negative for CD 10, and the expert pathologist concluded to “ESS with smooth muscle cells differentiation”. It is well known that, by histopathological examination and IHC, the distinction between ESS with smooth muscle cell differentiation and highly cellular leiomyomas is challenging (101,102). Anyway, RNAseq and clustering data helped us correct this diagnosis.

While Sumathi et al. (101) have previously showed that diffuse WT-1 positivity is characteristic of endometrial stromal neoplasms and may be of value in diagnosis, we noticed that WT1 gene is often absent or with low expression levels in the HG tumors as compared as the other (Supplementary Figure 4E), suggesting that WT-1 might be a prognosis factor in ESS. Of note, the level of expression of ESR1 was also significantly higher in the C2/3 than in the C1 cluster (HG), which is consistent with the known prognosis of ER in sarcomas (103). Importantly, *YWHAE-NUTM2* fusion gene does not seem to be specific of HG-ESS. Aisagbonhi et al. have previously described a case of ESS with a typical morphology of low-grade (without high-grade areas) and a *YWHAE* rearrangement (92). Here, we demonstrate that i) LG-ESS with *YWHAE-NUTM2* fusions are not uncommon; ii) they differ from their HG counterparts not only by the expression of genes involved in cell cycle/proliferation pathways, absence of mutation of BCOR pathway, but also by those involved in the immune response or the angiogenesis and iii) they may be identified by ER positivity in IHC. Investigation of a larger cohort may confirm these conclusions. Expression data also identified some potentially new therapeutic targets, such as NTRK3 and the histone-lysine N-methyltransferase enzyme, EZH2, which have a higher expression in C1 cluster samples. Inhibition of HDAC therefore provides a very interesting approach of treatment for this subtype of sarcoma. Preclinical studies have previously shown that ESS may be sensitive to HDAC inhibition and clinical data of the phase II trial of panobinostat in advanced sarcoma are consistent (104), even if only 3 ESS were enrolled in the study. Otherwise, a recent paper suggested that ESS with BCOR-rearrangement harbor *MDM2* amplifications (87). Among the 4 HG-ESS-BCOR of our series, only one (CLB_RNA_1549) carries a *MDM2-CDK4* amplification (Supplementary Figure 9).

Finally, while cases of HG group show a very low immune infiltrate for all tumor microenvironment cell types, some of the LG and IG group display moderate immune infiltrates with especially a significant presence of activated T cells (CD3+ CD8+) and regulatory T cells that might be of interest for immunotherapy approaches (105). Of note, a trial of Pembrolizumab in rare subtypes of sarcomas is ongoing but included only few ESS (NCT03012620).

By showing the molecular landscape of fusions genes in ESS, RNAseq analysis also helps understanding the biology and the mechanisms of tumorigenesis. The common altered genes identified in ESS are involved in chromatin remodeling, as SUZ12 belongs to the PRC2 complex while PHF1 promotes the recruitment of PRC2 to the chromatin. Polycomb Repressive Complexes (PRC) 1 and 2 are responsible for silencing the chromatin via histone methylation and ubiquitination. The *JAZF1-SUZ12* fusion disrupts the PRC2 complex, preventing its binding, and thus impairs the chromatin repression of oncogenes such as *HOXA9* (59). BCOR is part of the non-canonical PRC1.1 complex that binds to BCL6 and acts as a corepressor. The precise mechanisms underlying the different *BCOR*-rearrangements are still unknown but they possibly disrupt the PRC1.1 complex formation (91). The *SYNGAP1-JAZF1* fusion may be linked to *JAZF1-PHF1* fusion as both partners are adjacent genes and that a *PHF1-SYNGAP1* is a known readthrough. The *CREBBP-BCOR* fusion may be functionally related to the *CREBBP-BCORL1* recently described in two cases of ossifying fibromyxoid tumors (16), a tumor type that shares fusion genes similar to those of ESS (80). In 3 cases of “*JAZF1*-negative” ESS, we identified other genetic abnormalities involving genes related to chromatin remodeling. In one case (CLB_RNA_1818) we detected a single mutation in the Tet methyl cytosine dioxygenase 2 (*TET2*) gene. *TET2* increases the activity of HDAC2 (106) and mutations of this gene have previously been described in other neoplasms such as AML (Acute myeloid leukemia) with an unfavorable prognostic value (107).

In one case (CLB_RNA_1372), we detected a *KAT6B-KANSL1* fusion that was previously described in two cases of leiomyomas (108,109). *KAT6B* encodes a lysine acetyltransferase involved in histone tails modifications. A *RNF111-ARID2* fusion was identified in one patient (CLB_RNA_1373). *ARID2* is a subunit of the PBAF chromatin-remodeling complex and mutations of this gene have been described in various neoplasms (HCC, Melanoma). Altogether and amongst all tumors that we finally classified as ESS (see above), only 5 samples remained without having any detectable alteration of a chromatin remodeling gene.

As a limitation of our study, it is important to mention that our study cohort included only 5 cases of *YWHAE-NUTM2* positive ESS. In addition, without paired normal samples, we do not know whether the variations identified by RNAseq are somatic or even driver mutations. The few variations we reported here are not described in normal tissues and most are present in the COSMIC database (28). Even so, we cannot definitely rule out private or germline variations and it will require germline DNA to ascertain this point. Finally, our study did not include any validation cohort and future studies of larger cohorts of uterine stromal sarcomas are needed to confirm, and to expand on, our results, and are currently ongoing in our center.

4. Materials and Methods

All patients signed informed consent to participate to research according to the French laws. Of note, an Institutional Review Board (The Centre Léon Bérard Clinical Trial Review Committee) reviewed and agreed with the study protocol and the informed consent form. The histological diagnosis and grading was established by expert gynecologic pathologist according to the World Health Organization (WHO) Classification of Tumors (16). Detailed methods are presented in the Supplemental Material.

5. Conclusion

To our knowledge, our study represents the largest series of RNA-sequenced uterine stromal sarcomas. Altogether, ESS represent a heterogeneous group of tumors, in terms of clinical behavior, pathology, genetics and immune infiltrate. FISH negative uterine stromal sarcomas present new and recurrent molecular variants of ESS, some of which previously unreported. RNAseq also allowed the reclassification of a quarter of the tumors and helped in the identification of ESS with opposite natural history and prognosis, which is crucial for treatment decision. The functional similarities between the classical *JAZF1-SUZ12* and the alternative transcripts suggest they activate an analogous oncogenic pathway. We also show that while *BCOR*-rearrangements seem always related to HG and poor prognosis, the detection of *YWHAE-NUTM2B* fusion is not sufficient to consider tumors as HG. Finally, RNA-seq is powerful tool to enable nosological classification, identify target gene, predict natural history, and guide treatment for patient with uterine sarcomas.

Author contributions: MB: TF and IT designed the cohort study. MB, JYB and FT designed the experimental plans. MB, DP, and FT conducted the experiments. MB, TF, JYB and FT analyzed the data. MB, IRC, AD, HV, MC and JYB recruited subjects. MB, JYB and FT wrote the manuscript. All authors provided critical review of the manuscript.

Acknowledgments: This work was supported by NetSarc/RREPS/RESOS (INCA & DGOS) and LYRICAN (INCA-DGOS-INSERM 12563), Association DAM's, Ensemble contre Le GIST, Eurosarc (FP7-278742), Fondation ARC, Infosarcome, InterSARC (INCA), LabEx DEvweCAN (ANR-10-LABX-0061), Ligue de l'Ain contre le Cancer, Ligue contre le Cancer, EURACAN (EC 739521).

Conflicts of Interest statement: The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

1. Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvlaere A-V, Péoc'h M, Istier L, et al. Incidence of Sarcoma Histotypes and Molecular Subtypes in a Prospective Epidemiological Study with Central Pathology Review and Molecular Testing. PLOS ONE. 3 août 2011;6(8):e20294.

2. Correa H. Li–Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet.* juin 2016;5(2):84-8.
3. Patel SR. Radiation-induced sarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* août 2000;1(3):258-61.
4. Farzaliyev F, Hamacher R, Steinau Professor H-U, Bertram S, Podleska LE. Secondary angiosarcoma: A fatal complication of chronic lymphedema. *J Surg Oncol.* janv 2020;121(1):85-90.
5. Board WC of TE. Soft Tissue and Bone Tumours [Internet]. [cité 10 août 2020]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Soft-Tissue-And-Bone-Tumours-2020>
6. Corless CL. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Modern Pathology.* janv 2014;27(1):S1-16.
7. Tabone-Eglinger S, Subra F, El Sayadi H, Alberti L, Tabone E, Michot J-P, et al. KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 15 avr 2008;14(8):2285-94.
8. Timmergen MJM, Smits R, Grünhagen DJ, Verhoef C, Sleijfer S, Wiemer EAC. Activated Signaling Pathways and Targeted Therapies in Desmoid-Type Fibromatosis: A Literature Review. *Front Oncol* [Internet]. 2019 [cité 10 août 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00397/full>
9. Allen MD, Freund SMV, Zinzalla G, Bycroft M. The SWI/SNF Subunit INI1 Contains an N-Terminal Winged Helix DNA Binding Domain that Is a Target for Mutations in Schwannomatosis. *Structure.* 7 juill 2015;23(7):1344-9.
10. Gadd S, Sredni ST, Huang C-C, Perlman EJ, Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. Rhabdoid tumor: gene expression clues to pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lab Invest.* mai 2010;90(5):724-38.
11. Kohashi K, Yamamoto H, Yamada Y, Kinoshita I, Taguchi T, Iwamoto Y, et al. SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Status in SMARCB1/INI1-preserved Epithelioid Sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(3):312-8.
12. Arun D, Gutmann DH. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol.* avr 2004;17(2):101-5.
13. Italiano A, Bianchini L, Keslair F, Bonnafe S, Cardot-Leccia N, Coindre J-M, et al. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer.* 15 mai 2008;122(10):2233-41.
14. Udager AM, Ishikawa MK, Lucas DR, McHugh JB, Patel RM. MYC immunohistochemistry in angiosarcoma and atypical vascular lesions: practical considerations based on a single institutional experience. *Pathology.* déc 2016;48(7):697-704.
15. Nakano K, Takahashi S. Translocation-Related Sarcomas. *Int J Mol Sci* [Internet]. 28 nov 2018 [cité 10 août 2020];19(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320865/>

16. Guillou L, Aurias A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch.* févr 2010;456(2):201-17.
17. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med.* juill 2010;16(7):781-7.
18. Chibon F, Lesluyes T, Valentin T, Le Guellec S. CINSARC signature as a prognostic marker for clinical outcome in sarcomas and beyond. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(2):124-9.
19. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 01 2018;29(Suppl 4):iv51-67.
20. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 01 2018;29(Suppl 4):iv79-95.
21. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 01 2018;29(Suppl 4):iv267.
22. Derbel O, Heudel PE, Cropet C, Meeus P, Vaz G, Biron P, et al. Survival impact of centralization and clinical guidelines for soft tissue sarcoma (A prospective and exhaustive population-based cohort). *PLoS ONE.* 2017;12(2):e0158406.
23. Ray-Coquard I, Montesco MC, Coindre JM, Dei Tos AP, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. *Ann Oncol.* sept 2012;23(9):2442-9.
24. Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, Nguyen BB, Terrier P, Collin F, et al. Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol.* janv 1997;15(1):350-62.
25. Blay J-Y, Honoré C, Stoeckle E, Meeus P, Jafari M, Gouin F, et al. Surgery in reference centers improves survival of sarcoma patients: a nationwide study. *Ann Oncol.* 01 2019;30(7):1143-53.
26. Nagar SP, Mytelka DS, Candrilli SD, D'yachkova Y, Lorenzo M, Kasper B, et al. Treatment Patterns and Survival among Adult Patients with Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Retrospective Medical Record Review in the United Kingdom, Spain, Germany, and France. *Sarcoma* [Internet]. 24 mai 2018 [cité 23 août 2020];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5994280/>
27. Carbonnaux M, Brahmi M, Schiffler C, Meeus P, Sunyach M, Bouhamama A, et al. Very long-term survivors among patients with metastatic soft tissue sarcoma. *Cancer Med.* 27 mars 2019;8(4):1368-78.
28. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 8 janv 2019;47(D1):D941-7.

29. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 29 mars 2013;339(6127):1546-58.
30. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10(1):25-50.
31. Merid SK, Goranskaya D, Alexeyenko A. Distinguishing between driver and passenger mutations in individual cancer genomes by network enrichment analysis. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 19 sept 2014 [cité 10 août 2020];15(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262241/>
32. Fukushima M, Schaefer I-M, Fletcher CDM. Myolipoma of Soft Tissue: Clinicopathologic Analysis of 34 Cases. *Am J Surg Pathol*. févr 2017;41(2):153-60.
33. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer*. juin 2015;15(6):371-81.
34. Bui NQ, Przybyl J, Trabucco SE, Frampton G, Hastie T, van de Rijn M, et al. A clinico-genomic analysis of soft tissue sarcoma patients reveals CDKN2A deletion as a biomarker for poor prognosis. *Clinical Sarcoma Research*. 11 sept 2019;9(1):12.
35. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent Gene Fusions in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer*. juill 2008;8(7):497-511.
36. Bunting SF, Nussenzweig A. END-JOINING, TRANSLOCATIONS AND CANCER. *Nat Rev Cancer*. juill 2013;13(7):443-54.
37. Y Z, M G, Dg H, Ms B, C B, R C, et al. The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol*. 1 janv 2010;106:93-133.
38. Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell*. 14 mars 2013;152(6):1226-36.
39. Pellestor F, Gatinois V. Chromoanasythesis: another way for the formation of complex chromosomal abnormalities in human reproduction. *Hum Reprod*. 1 août 2018;33(8):1381-7.
40. Shen MM. Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. *Cancer Cell*. 13 mai 2013;23(5):567-9.
41. Anderson ND, de Borja R, Young MD, Fuligni F, Rosic A, Roberts ND, et al. Rearrangement bursts generate canonical gene fusions in bone and soft tissue tumors. *Science*. 31 2018;361(6405).
42. Gostissa M, Ranganath S, Bianco JM, Alt FW. Chromosomal location targets different MYC family gene members for oncogenic translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 févr 2009;106(7):2265-70.
43. Yang L, Hu H-M, Zielinska-Kwiatkowska A, Chansky HA. FOXO1 is a direct target of EWS-Flt1 oncogenic fusion protein in Ewing's sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 5 nov 2010;402(1):129-34.

44. Sirvent N, Maire G, Pedeutour F. Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors: from ring chromosomes to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. mai 2003;37(1):1-19.
45. Puliyaath G, Nair MK. Endometrial stromal sarcoma: A review of the literature. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2012;33(1):1-6.
46. RJ K, ML C, CS H, RH Y. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs [Internet]. [cité 20 août 2020]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Female-Reproductive-Organs-2014>
47. Chang KL, Crabtree GS, Lim-Tan SK, Kempson RL, Hendrickson MR. Primary uterine endometrial stromal neoplasms. A clinicopathologic study of 117 cases. *Am J Surg Pathol*. mai 1990;14(5):415-38.
48. Ali RH, Rouzbahman M. Endometrial stromal tumours revisited: an update based on the 2014 WHO classification. *J Clin Pathol*. mai 2015;68(5):325-32.
49. Xie W, Bi X, Cao D, Yang J, Shen K, You Y. Primary endometrioid stromal sarcomas of the ovary: a clinicopathological study of 14 cases with a review of the literature. *Oncotarget*. 28 juin 2017;8(38):63345-52.
50. Lee C-H, Nucci MR. Endometrial stromal sarcoma--the new genetic paradigm. *Histopathology*. juill 2015;67(1):1-19.
51. Dionigi A, Oliva E, Clement PB, Young RH. Endometrial stromal nodules and endometrial stromal tumors with limited infiltration: a clinicopathologic study of 50 cases. *Am J Surg Pathol*. mai 2002;26(5):567-81.
52. McCluggage WG, Date A, Bharucha H, Toner PG. Endometrial stromal sarcoma with sex cord-like areas and focal rhabdoid differentiation. *Histopathology*. oct 1996;29(4):369-74.
53. Clement PB, Scully RE. Endometrial stromal sarcomas of the uterus with extensive endometrioid glandular differentiation: a report of three cases that caused problems in differential diagnosis. *Int J Gynecol Pathol*. juill 1992;11(3):163-73.
54. Jung C-K, Jung J-H, Lee A, Lee Y-S, Choi Y-J, Yoon S-K, et al. Diagnostic use of nuclear β -catenin expression for the assessment of endometrial stromal tumors. *Modern Pathology*. juin 2008;21(6):756-63.
55. Chiang S, Oliva E. Cytogenetic and molecular aberrations in endometrial stromal tumors. *Hum Pathol*. mai 2011;42(5):609-17.
56. Koontz JI, Soreng AL, Nucci M, Kuo FC, Pauwels P, van Den Berghe H, et al. Frequent fusion of the JAZF1 and JAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 mai 2001;98(11):6348-53.
57. Hrzenjak A. JAZF1/SUZ12 gene fusion in endometrial stromal sarcomas. *Orphanet J Rare Dis*. 16 févr 2016;11:15.

58. Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander A null, et al. Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development*. sept 2001;128(17):3371-9.
59. Ma X, Wang J, Wang J, Ma CX, Gao X, Patriub V, et al. The JAZF1-SUZ12 fusion protein disrupts PRC2 complexes and impairs chromatin repression during human endometrial stromal tumorogenesis. *Oncotarget*. 17 janv 2017;8(3):4062-78.
60. Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol*. déc 2009;10(12):1188-98.
61. D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol*. janv 2010;116(1):131-9.
62. Seagle B-LL, Shilpi A, Buchanan S, Goodman C, Shahabi S. Low-grade and high-grade endometrial stromal sarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):254-62.
63. Amant F, Floquet A, Friedlander M, Kristensen G, Mahner S, Nam EJ, et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for endometrial stromal sarcoma. *Int J Gynecol Cancer*. nov 2014;24(9 Suppl 3):S67-72.
64. Dahhan T, Fons G, Buist MR, Ten Kate FJW, van der Velden J. The efficacy of hormonal treatment for residual or recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma. A retrospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. mai 2009;144(1):80-4.
65. Kurihara S, Oda Y, Ohishi Y, Iwasa A, Takahira T, Kaneki E, et al. Endometrial stromal sarcomas and related high-grade sarcomas: immunohistochemical and molecular genetic study of 31 cases. *Am J Surg Pathol*. août 2008;32(8):1228-38.
66. Lee C-H, Ou W-B, Mariño-Enriquez A, Zhu M, Mayeda M, Wang Y, et al. 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 janv 2012;109(3):929-34.
67. Sciallis AP, Bedroske PP, Schoolmeester JK, Sukov WR, Keeney GL, Hodge JC, et al. High-grade endometrial stromal sarcomas: a clinicopathologic study of a group of tumors with heterogenous morphologic and genetic features. *Am J Surg Pathol*. sept 2014;38(9):1161-72.
68. Lee C-H, Ali RH, Rouzbahman M, Marino-Enriquez A, Zhu M, Guo X, et al. Cyclin D1 as a diagnostic immunomarker for endometrial stromal sarcoma with YWHAE-FAM22 rearrangement. *Am J Surg Pathol*. oct 2012;36(10):1562-70.
69. Chiang S, Lee C-H, Stewart CJR, Oliva E, Hoang LN, Ali RH, et al. BCOR is a robust diagnostic immunohistochemical marker of genetically diverse high-grade endometrial stromal sarcoma, including tumors exhibiting variant morphology. *Mod Pathol*. 2017;30(9):1251-61.
70. Lee C-H, Mariño-Enriquez A, Ou W, Zhu M, Ali RH, Chiang S, et al. The clinicopathologic features of YWHAE-FAM22 endometrial stromal sarcomas: a histologically high-grade and clinically aggressive tumor. *Am J Surg Pathol*. mai 2012;36(5):641-53.
71. Pautier P, Nam EJ, Provencher DM, Hamilton AL, Mangili G, Siddiqui NA, et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for high-grade undifferentiated sarcomas of the uterus. *Int J Gynecol Cancer*. nov 2014;24(9 Suppl 3):S73-77.

72. Meurer M, Floquet A, Ray-Coquard I, Bertucci F, Auriche M, Cordoba A, et al. Localized high grade endometrial stromal sarcoma and localized undifferentiated uterine sarcoma: a retrospective series of the French Sarcoma Group. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(4):691-8.
73. Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Endometrial stromal sarcoma: a systematic review. *Obstet Gynecol*. sept 2013;122(3):676-83.
74. Beck TL, Singhal PK, Ehrenberg HM, Rose PG, Lele SB, Krivak TC, et al. Endometrial stromal sarcoma: analysis of recurrence following adjuvant treatment. *Gynecol Oncol*. avr 2012;125(1):141-4.
75. Hemming ML, Wagner AJ, Nucci MR, Chiang S, Wang L, Hensley ML, et al. YWHAЕ-rearranged high-grade endometrial stromal sarcoma: Two-center case series and response to chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2017;145(3):531-5.
76. Serkies K, Abacjew-Chmyłko A, Wieczorek-Rutkowska M, Pęksa R. Aromatase inhibitor therapy for endometrial stromal sarcoma - two-centre experience. *Ginek Pol*. 2018;89(11):607-10.
77. Yilmaz A, Rush DS, Soslow RA. Endometrial stromal sarcomas with unusual histologic features: a report of 24 primary and metastatic tumors emphasizing fibroblastic and smooth muscle differentiation. *Am J Surg Pathol*. sept 2002;26(9):1142-50.
78. Baker P, Oliva E. Endometrial stromal tumours of the uterus: a practical approach using conventional morphology and ancillary techniques. *J Clin Pathol*. mars 2007;60(3):235-43.
79. Hrzenjak A, Moinfar F, Tavassoli FA, Strohmeier B-, Kremser M-L, Zatloukal K, et al. JAZF1/JJAZ1 Gene Fusion in Endometrial Stromal Sarcomas. *J Mol Diagn*. août 2005;7(3):388-95.
80. Antonescu CR, Sung Y-S, Chen C-L, Zhang L, Chen H-W, Singer S, et al. Novel ZC3H7B-BCOR, MEAF6-PHF1, and EPC1-PHF1 fusions in ossifying fibromyxoid tumors--molecular characterization shows genetic overlap with endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. févr 2014;53(2):183-93.
81. Micci F, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Heim S. Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res*. 1 janv 2006;66(1):107-12.
82. Micci F, Brunetti M, Dal Cin P, Nucci MR, Gorunova L, Heim S, et al. Fusion of the genes BRD8 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(12):841-5.
83. Micci F, Gorunova L, Gatiús S, Matias-Guiu X, Davidson B, Heim S, et al. MEAF6/PHF1 is a recurrent gene fusion in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Lett*. 28 mai 2014;347(1):75-8.
84. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Gorunova L, Eibak AM, Bjerkehagen B, et al. Novel fusion of MYST/Es1-associated factor 6 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39354.
85. Dewaele B, Przybyl J, Quattrone A, Finalet Ferreira J, Vanspauwen V, Geerdens E, et al. Identification of a novel, recurrent MBTD1-CXorf67 fusion in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Cancer*. 1 mars 2014;134(5):1112-22.

86. Lewis N, Soslow RA, Delair DF, Park KJ, Murali R, Hollmann TJ, et al. ZC3H7B-BCOR high-grade endometrial stromal sarcomas: a report of 17 cases of a newly defined entity. *Mod Pathol*. 2018;31(4):674-84.
87. Kommoss FK, Chang KT, Stichel D, Banito A, Jones DT, Heilig CE, et al. Endometrial stromal sarcomas with BCOR-rearrangement harbor MDM2 amplifications. *The Journal of Pathology: Clinical Research* [Internet]. [cité 28 mai 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjp2.165>
88. Lin DI, Hemmerich A, Edgerly C, Duncan D, Severson EA, Huang RSP, et al. Genomic profiling of BCOR-rearranged uterine sarcomas reveals novel gene fusion partners, frequent CDK4 amplification and CDKN2A loss. *Gynecologic Oncology*. 1 mai 2020;157(2):357-66.
89. Bantignies F, Cavalli G. Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. *Curr Opin Cell Biol*. juin 2006;18(3):275-83.
90. Choi J, Bachmann AL, Tauscher K, Benda C, Fierz B, Müller J. DNA binding by PHF1 prolongs PRC2 residence time on chromatin and thereby promotes H3K27 methylation. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2017;24(12):1039-47.
91. Wang Z, Gearhart MD, Lee Y-W, Kumar I, Ramazanov B, Zhang Y, et al. A Non-canonical BCOR-PRC1.1 Complex Represses Differentiation Programs in Human ESCs. *Cell Stem Cell*. 1 févr 2018;22(2):235-251.e9.
92. Aisagbonhi O, Harrison B, Zhao L, Osgood R, Chebib I, Oliva E. YWHAE Rearrangement in a Purely Conventional Low-grade Endometrial Stromal Sarcoma that Transformed Over Time to High-grade Sarcoma: Importance of Molecular Testing. *Int J Gynecol Pathol*. sept 2018;37(5):441-7.
93. Zou Y, Turashvili G, Soslow RA, Park KJ, Croce S, McCluggage WG, et al. High-grade transformation of low-grade endometrial stromal sarcomas lacking YWHAE and BCOR genetic abnormalities. *Mod Pathol*. 21 avr 2020;
94. Jo V, D. M. Fletcher C. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. 1 févr 2014;46:95-104.
95. Mariño-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(3):335-41.
96. Allen AJ, Ali SM, Gowen K, Elvin JA, Pejovic T. A recurrent endometrial stromal sarcoma harbors the novel fusion JAZF1-BCORL1. *Gynecol Oncol Rep*. mai 2017;20:51-3.
97. Dickson BC, Childs TJ, Colgan TJ, Sung Y-S, Swanson D, Zhang L, et al. Uterine Tumor Resembling Ovarian Sex Cord Tumor: A Distinct Entity Characterized by Recurrent NCOA2/3 Gene Fusions. *Am J Surg Pathol*. févr 2019;43(2):178-86.
98. Brunetti M, Panagopoulos I, Gorunova L, Davidson B, Heim S, Micci F. RNA-sequencing identifies novel GREB1-NCOA2 fusion gene in a uterine sarcoma with the chromosomal translocation t(2;8)(p25;q13). *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(4):176-81.

99. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, et al. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* juin 2018;42(6):791-8.
100. Conklin CMJ, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification. *Adv Anat Pathol.* nov 2014;21(6):383-93.
101. Sumathi VP, Al-Hussaini M, Connolly LE, Fullerton L, McCluggage WG. Endometrial stromal neoplasms are immunoreactive with WT-1 antibody. *Int J Gynecol Pathol.* juill 2004;23(3):241-7.
102. Pujani M, Jairajpuri ZS, Rana S, Jetley S, Hassan MJ, Jain R. Cellular leiomyoma versus endometrial stromal tumor: A pathologists' dilemma. *J Midlife Health.* mars 2015;6(1):31-4.
103. Valkov A, Sorbye S, Kilvaer TK, Donnem T, Smeland E, Bremnes RM, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor are prognostic factors in soft tissue sarcomas. *International Journal of Oncology.* 1 avr 2011;38(4):1031-40.
104. Cassier PA, Lefranc A, Amela EY, Chevreau C, Bui BN, Lecesne A, et al. A phase II trial of panobinostat in patients with advanced pretreated soft tissue sarcoma. A study from the French Sarcoma Group. *Br J Cancer.* 20 août 2013;109(4):909-14.
105. Keung EZ, Burgess M, Salazar R, Parra Cuentas E, Rodrigues-Canales J, Bolejack V, et al. Correlative Analyses of the SARCO28 Trial Reveal an Association Between Sarcoma-Associated Immune Infiltrate and Response to Pembrolizumab. *Clin Cancer Res.* 3 janv 2020;
106. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature.* 17 sept 2015;525(7569):389-93.
107. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne C-H, Germing U, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol.* 20 avr 2012;30(12):1350-7.
108. Aj A, Nk D, T M, Kj F, J D, R M, et al. Leiomyoma with KAT6B-KANSL1 fusion: case report of a rapidly enlarging uterine mass in a postmenopausal woman. *Diagn Pathol.* 25 avr 2019;14(1):32-32.
109. Panagopoulos I, Gorunova L, Bjerkehagen B, Heim S. Novel KAT6B-KANSL1 fusion gene identified by RNA sequencing in retroperitoneal leiomyoma with t(10;17)(q22;q21). *PLoS ONE.* 2015;10(1):e0117010.
110. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA.* oct 1988;85(19):7084-8.
111. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol.* 24 août 2004;14(16):1436-50.
112. Meek SEM, Lane WS, Piwnica-Worms H. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem.* 30 juill 2004;279(31):32046-54.

113. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol.* juin 2006;16(3):162-72.
114. Young GM, Radhakrishnan VM, Centuori SM, Gomes CJ, Martinez JD. Comparative analysis of 14-3-3 isoform expression and epigenetic alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 30 oct 2015;15(1):826.
115. Liu T-A, Jan Y-J, Ko B-S, Liang S-M, Chen S-C, Wang J, et al. 14-3-3 ϵ Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE.* 6 mars 2013;8(3):e57968.
116. Yang Y-F, Lee Y-C, Wang Y-Y, Wang C-H, Hou M-F, Yuan S-SF. YWHAE promotes proliferation, metastasis, and chemoresistance in breast cancer cells. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* 2019;35(7):408-16.
117. French CA. NUT midline carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* nov 2010;203(1):16-20.
118. Kenny C, McDonagh N, Lazaro A, O'Meara E, Klinger R, O'Connor D, et al. Dysregulated mitogen-activated protein kinase signalling as an oncogenic basis for clear cell sarcoma of the kidney. *The Journal of Pathology.* 2018;244(3):334-45.
119. Guizard M, Karanian M, Dijoud F, Bouhamama A, Faure-Contier C, Hameury F, et al. Neonatal Soft Tissue Sarcoma with YWHAE-NUTM2B Fusion. *Case Rep Oncol.* août 2019;12(2):631-8.
120. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol.* 4 mars 2002;156(5):817-28.
121. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev.* 15 juill 2000;14(14):1810-23.
122. Wang Z, Gearhart MD, Lee Y-W, Kumar I, Ramazanov B, Zhang Y, et al. A non-canonical BCOR-PRC1.1 complex represses differentiation programs in human ESCs. *Cell Stem Cell.* 1 févr 2018;22(2):235-251.e9.
123. van den Boom V, Maat H, Geugien M, Rodríguez López A, Sotoca AM, Jaques J, et al. Non-canonical PRC1.1 Targets Active Genes Independent of H3K27me3 and Is Essential for Leukemogenesis. *Cell Reports.* 12 janv 2016;14(2):332-46.
124. Lanzuolo C, Orlando V. Memories from the polycomb group proteins. *Annu Rev Genet.* 2012;46:561-89.
125. Wong SJ, Gearhart MD, Taylor AB, Nanyes DR, Ha DJ, Robinson AK, et al. KDM2B recruitment of the Polycomb group complex, PRC1.1, requires cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure.* 4 oct 2016;24(10):1795-801.
126. Kenny C, Bausenwein S, Lazaro A, Furtwängler R, Gooskens SLM, van den Heuvel Eibrink M, et al. Mutually exclusive BCOR internal tandem duplications and YWHAE-NUTM2 fusions in clear cell sarcoma of kidney: not the full story. *J Pathol.* avr 2016;238(5):617-20.
127. Gooskens SLM, Furtwängler R, Vujanic GM, Dome JS, Graf N, van den Heuvel-Eibrink MM. Clear cell sarcoma of the kidney: a review. *Eur J Cancer.* sept 2012;48(14):2219-26.

128. 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.* 4 mars 2012;44(4):461-6.
129. Cupp JS, Miller MA, Montgomery KD, Nielsen TO, O'Connell JX, Huntsman D, et al. Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *Am J Surg Pathol.* juin 2007;31(6):970-6.
130. West RB, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, et al. A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 janv 2006;103(3):690-5.
131. Vougiouklakis T, Shen G, Feng X, Hoda ST, Jour G. Molecular Profiling of Atypical Tenosynovial Giant Cell Tumors Reveals Novel Non-CSF1 Fusions. *Cancers (Basel).* 31 déc 2019;12(1).



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials

Molecular Classification of Endometrial Stromal Sarcomas Using RNA Sequencing Defines Nosological and Prognostic Subgroups with Different Natural History

Mehdi Brahmi ^{1,2,*}, Tatiana Franceschi ¹, Isabelle Treilleux ¹, Daniel Pissaloux ^{1,2}, Isabelle Ray-Coquard ^{1,2}, Armelle Dufresne ¹, Helene Vanacker ¹, Melodie Carbonnaux ¹, Pierre Meeus ¹, Marie-

1. Supplementary Methods

1.1. Tumors Samples

This study was performed between September 2017 and December 2018 as a Centre Léon Bérard (Lyon, France) monocentric retrospective translational research program on tumor samples from an investigational cohort of 42 ESS patients. For clustering analyses, we used a control cohort composed of 5 samples of Low Grade ESS harboring a *JAZF1-SUZ12* fusion, 1 High Grade ESS harboring a *BCOR-ITD*, 2 uterine tumors resembling ovarian sex cord tumors and 2 samples each of uterine leiomyoma and leiomyosarcomas and a series of *BCOR*-rearranged family of tumor ($n = 8$). The inclusion criteria for the investigational cohort of this study were: histopathological diagnosis of ESS, *JAZF1* and/or *YWHAE* FISH negative, with sufficient available tumor material. All samples from the investigational and the control cohort were obtained from the pathology department and consisted of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) tissues samples at initial diagnosis or at recurrence (before any treatment), obtained by biopsy or surgical excision to establish the diagnosis of the disease. All patients signed informed consent to participate to research according to the French laws. Of note, an Institutional Review Board (The Centre Léon Bérard Clinical Trial Review Committee) reviewed and agreed with the study protocol and the informed consent form.

1.2. Clinical Review

Clinical follow-up was obtained from the medical records of patients available at our site or through corresponding clinicians. Follow-up was calculated starting from the date of the diagnosis.

1.3. Histopathological, FISH, RNA Sequencing and Gene Expression

All cases of the final series were reviewed by expert gynecological pathologists. FISH analyses were performed on FFPE tissue sections using commercial and custom bacterial artificial chromosome (BAC) probes.

RNA sequencing was performed with FFPE material in all cases. Total RNA was extracted from FFPE tissue section using Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific®, Courtaboeuf, France) following manufacturers' recommendations. DNA was removed using RNase-free DNase set (Qiagen®) followed by second Trizol extraction. Quantity and quality of total RNA were evaluated using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®) and Tape Station with Hs RNA Screen Tape (Agilent®) using a cutoff of DV200 (defined as the percentage of RNA fragments above 200 nucleotides) above 30%. All samples passed quality criteria. Libraries were prepared with 100 ng of total RNA using TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina®, San Diego, USA). Libraries were pooled by group of 14 samples at 4 nM with 1% PhiX. Sequencing was performed (75 cycles paired end) using a NextSeq 500/550 High Output V2 kit on Illumina NextSeq 500 platform (Illumina®, San Diego, CA). RNA-sequencing was successful in all but one case.

Sequencing data (average of 69 million reads per sample) were aligned with STAR on GRCh38 reference genome. Fusion transcripts were called with STAR-Fusion, FusionMap, EricScript, FusionCatcher and TopHat-fusion [16–19]. Fusion genes were further considered when found by at least 2 prediction tools and are listed in the supplementary table 3, except for 4 cases presenting a larger number of unknown fusion (indicated as "Multiple (>3) in frame, undescribed fusions detected" in the Table S3). Gene expression values were extracted using Kallisto v0.42.5 tool [20] with GENCODE release 23 genome annotation based on GRCh38 genome reference. Kallisto TPM expression values were transformed in log₂ (TPM + 2) and all samples were normalized together using the quantile method from the R limma package within R (version 3.1.1) environment. Sequencing quality control was performed on the expression profiles using a Principal Component Analysis (PCA), highlighting samples behaving differently from all the others (due to low number of reads, high number of

duplicates, low RNA quality or low sequencing quality). In detail, The RNAseq quality controls are based on the number of unique mapped reads (should be above 10 million, the average being 69 million) and on a PCA of the expression profiles, detecting samples that are outliers (with an FDR confidence below 10^{-3}) of the average distribution on the 3 first axes. For fusion calling, we used a threshold of 6 spanning + splitting reads for a fusion to be called by a tool. A fusion should be identified by at least 2 out of the 5 different tools to be further considered. A single sample (CLB_RNA_1563) was removed from the analyses, due to a low number of reads. Clustering was performed with the R package Cluster v2.0.3 using Pearson correlation distance and Ward's clustering method. Pathway analyses were done using GSEA [21] and Cytoscape. Small Nucleotide Variation and InDels analyses were performed using GATK HaplotypeCaller (v3.5-0) and Annovar (2018-04-16 version) [22,23]. Variations were then retained only if they were well-known mutations in oncogenes or tumor suppressor genes and/or present in the COSMIC database (v90) [24]. Concerning gene expression, we used LM22 signature matrix [25] and single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) [26].

2. Supplementary Figures

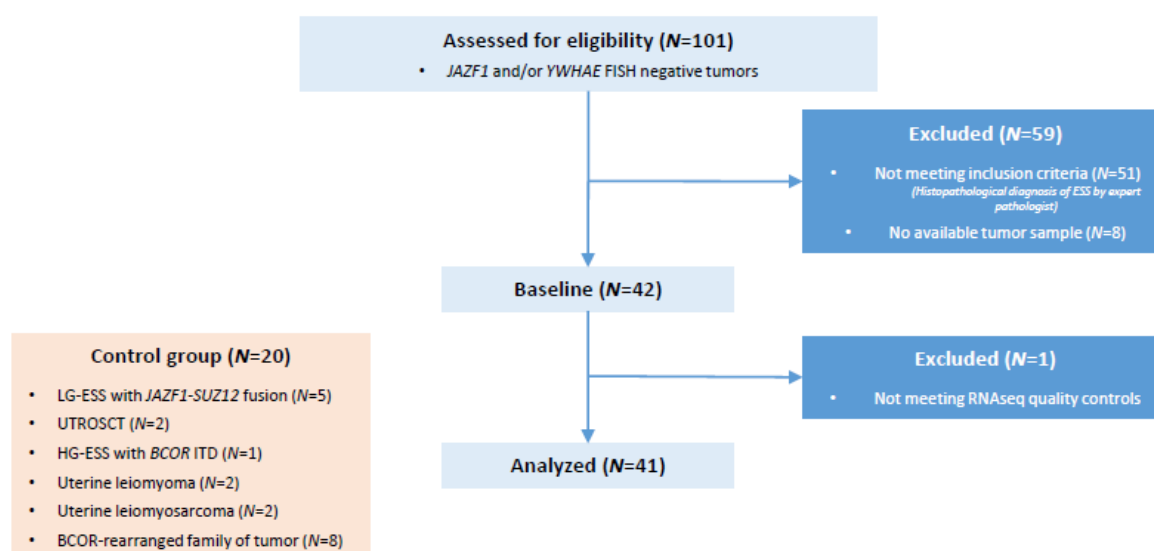


Figure S1. CONSORT diagram of investigational and control cohorts. Flow chart shows the number of tumors assessed for eligibility, screened by RNAseq and included in the final analysis.

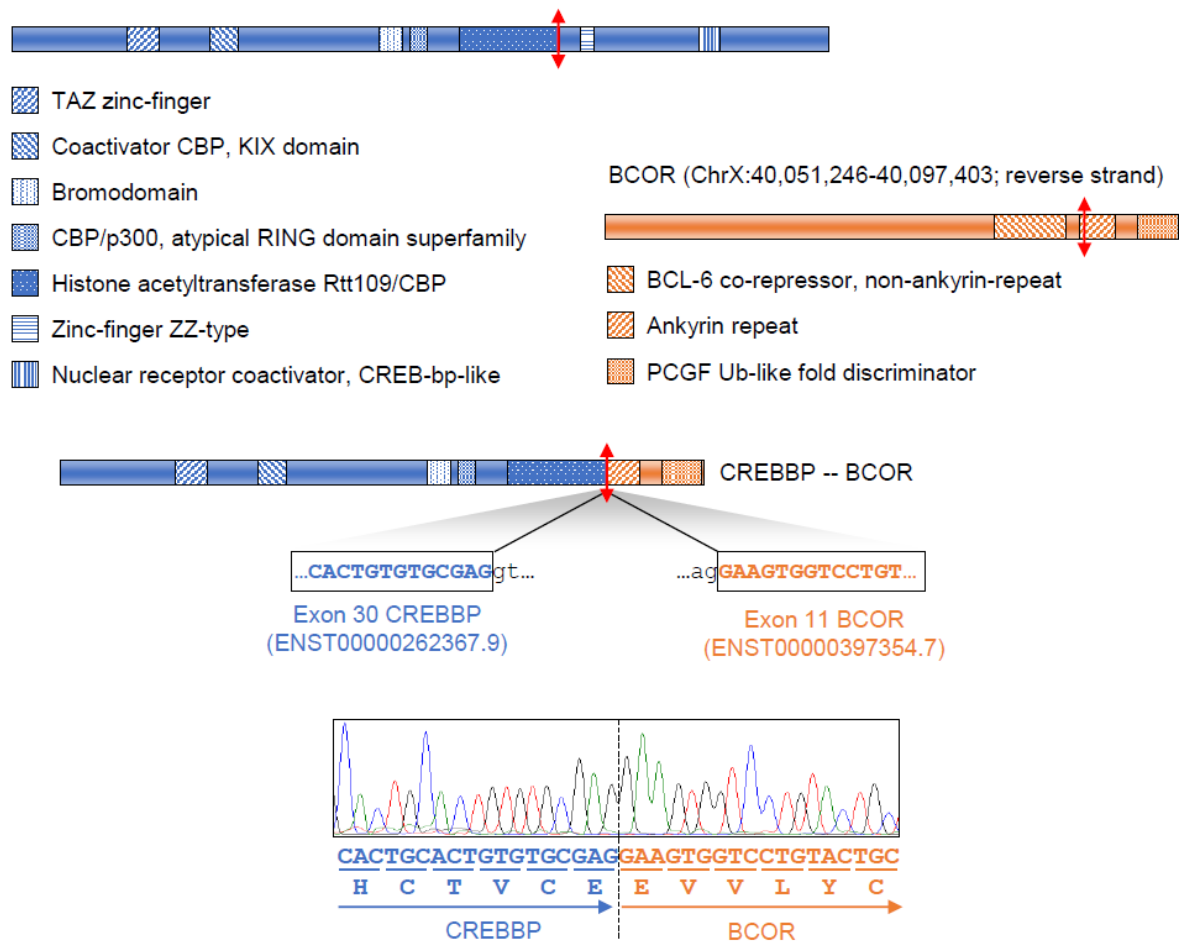


Figure S2. Schematic of the unpreviouslyreported fusion *CREBBP-BCOR*. Validations by Sanger sequencing and the deduced sequence are shown.

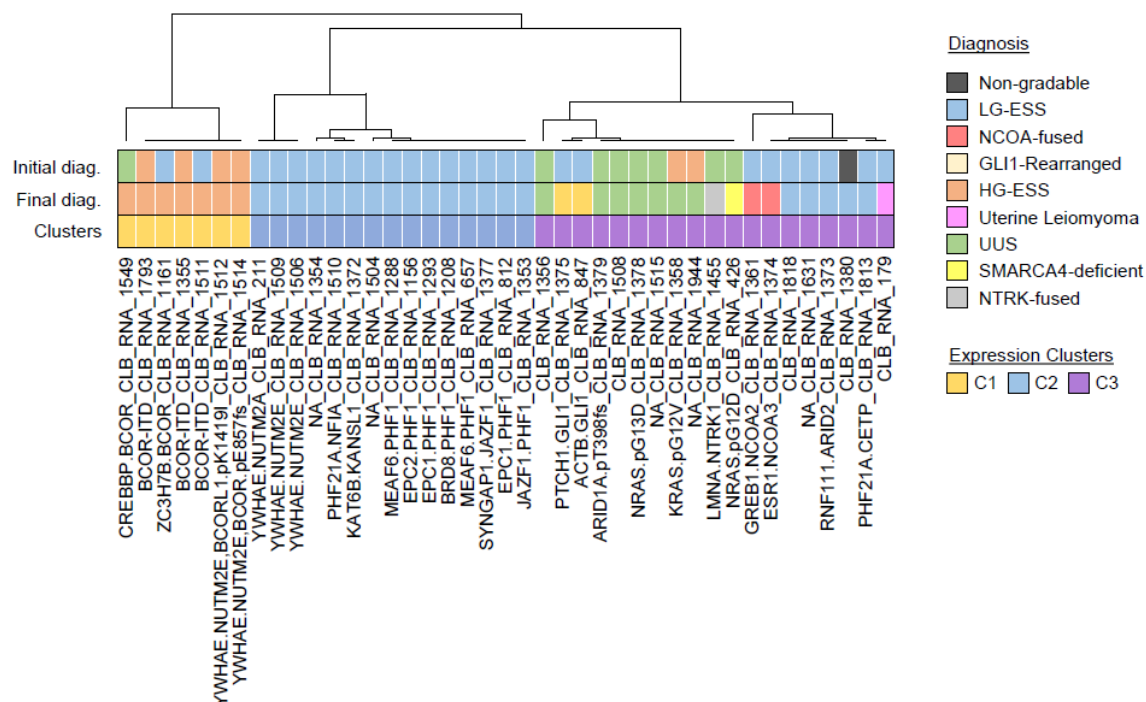


Figure S3. Consensus hierarchical unsupervised clustering of the investigation cohort only. Initial diagnosis, final diagnosis and cluster from Figure 1 are represented.

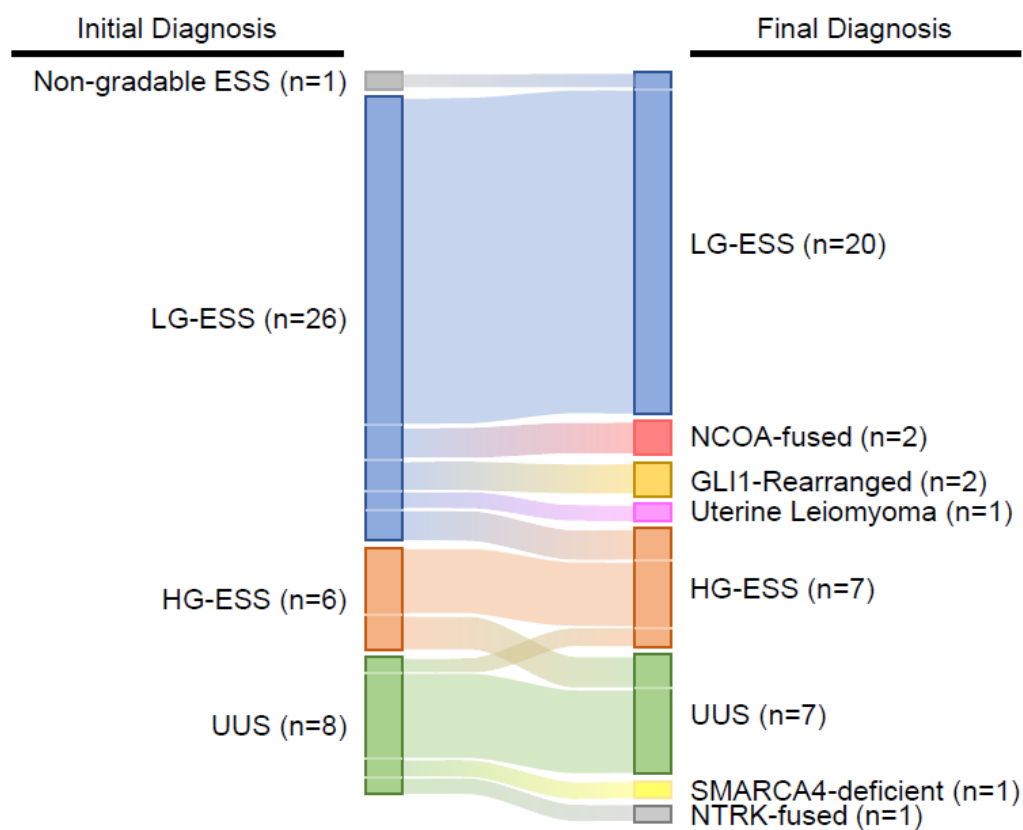


Figure S4. Tumor Reclassifications. Schematic of reclassification following molecular analyses and pathology review. A total of 12. samples(30%) werere classified.

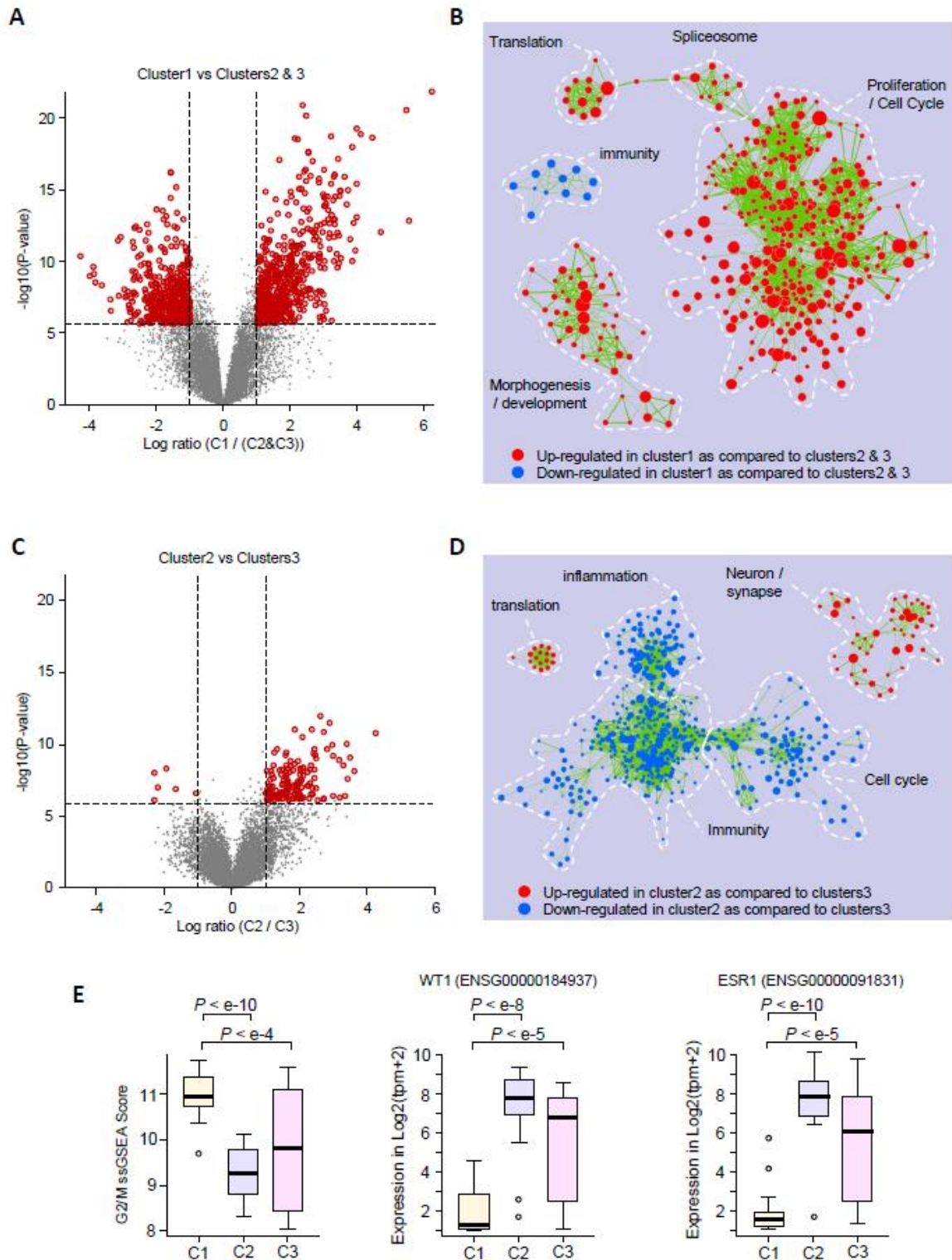


Figure S5. Supervised analyses between clusters from Figure 1. (A,C). volcano plots. Red dots indicate the significant deregulated genes (detailed in Table S2). (B,D). Cytoscape Enrichment Map generated from GSEA analyses. (E). box plots presenting the CCS (left panel) and the expression of WT1 (middle panel) and of ESR1 (right panel) in the 3 clusters.

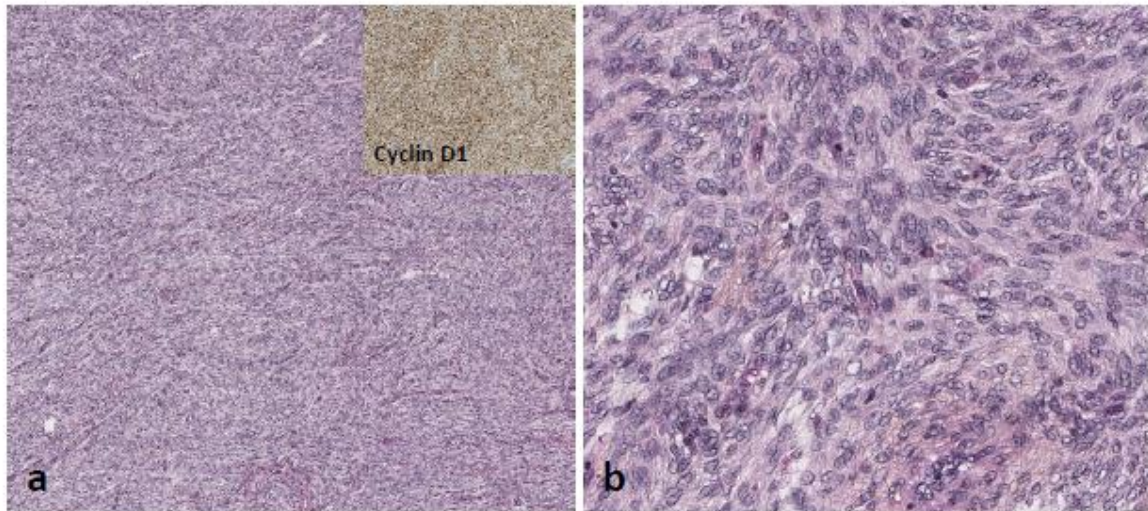


Figure S6. Photomicrograph shows sheets or fascicles of ovoid to spindle cells with low mitotic count and no tumor necrosis. **(a)** $\times 10$, hematoxylin and eosin; inset: Immunohistochemical stain for CD 10 shows strong nuclear positivity ($\times 10$) and **(b)** $\times 40$, hematoxylin and eosin.

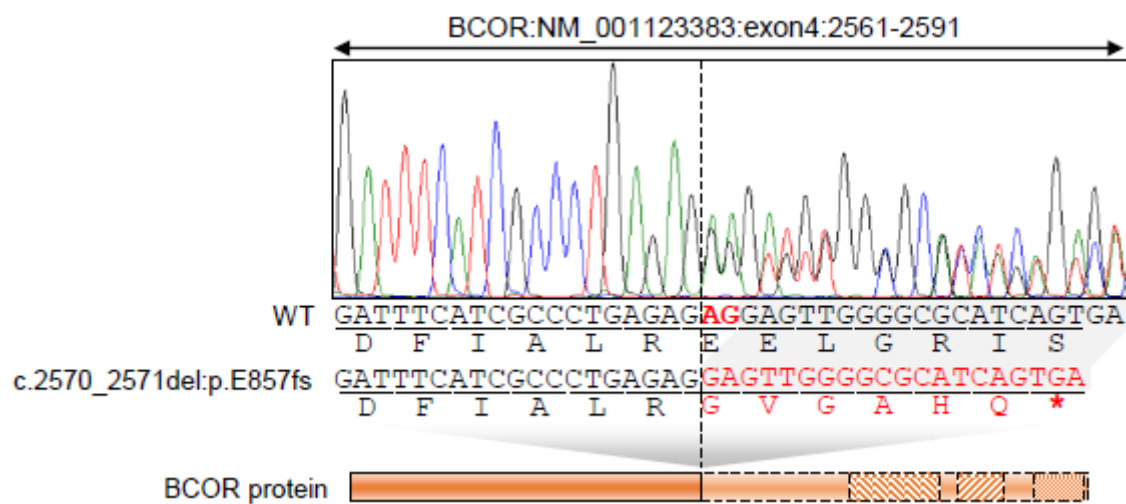


Figure S7. Schematic of the *BCOR* frameshift mutation in the CLB_RNA_1514 sample (HG YWHAE-NUTM2B). Validations by Sanger sequencing and the deduced sequences are shown.

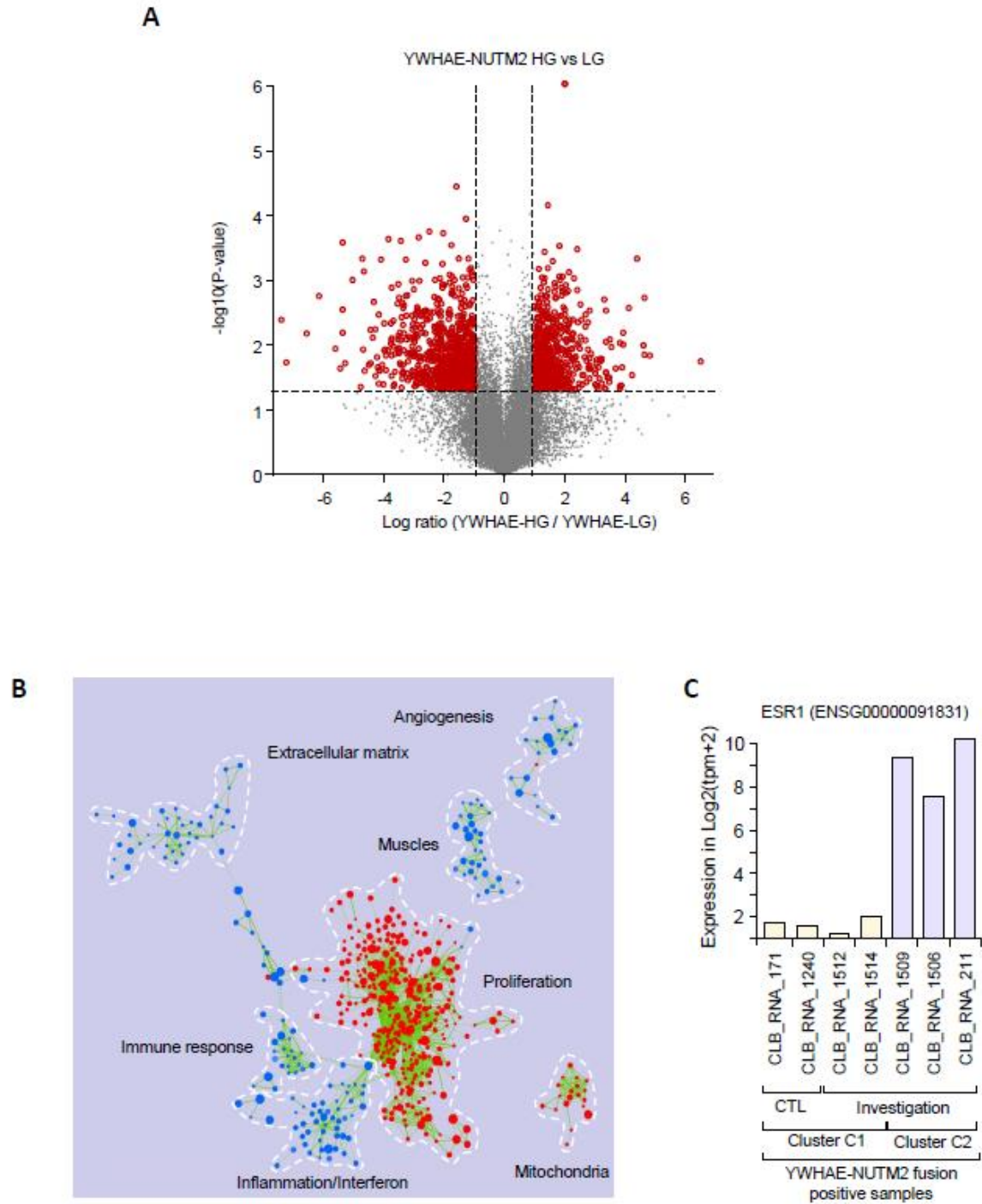


Figure S8. Supervised analyses between clusters 1 and 2 of the *YWHAE-NUTM2*-positive ESS samples. (A). volcano plot. Red dots indicate the significant deregulated genes (detailed in Table S2). (B). Cytoscape Enrichment Map generated from GSE Analyses. (C). Bar plot presenting the expression of *ESR1* in all the *YWHAE-NUTM2*-positive samples (including 2 from the control cohort, CTL).

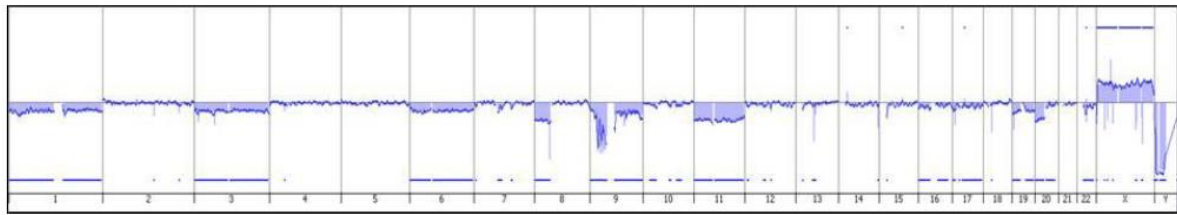


Figure S9. CGH array analysis of the CLB_RNA_1661 sample (HG ZC3H7B-BCOR). Results show a loss of all chromosomes 1, 3, 6, 9 and 11, a loss of chromosomes 8p and 20p, no amplification of MDM2 and CDK4, but a homozygous deletion of CDKN2A in 9p21.

References

1. Ge, H.; Liu, K.; Juan, T.; Fang, F.; Newman, M.; Hoeck, W. FusionMap: Detecting fusion genes from next-generation sequencing data at base-pair resolution. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1922–1928.
2. Lågstad, S.; Zhao, S.; Hoff, A.M.; Johannessen, B.; Lingjærde, O.C.; Skotheim, R.I. Chimeraviz: A tool for visualizing chimeric RNA. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2954–2956.
3. Nicorici, D.; Satalan, M.; Edgren, H.; Kangaspeska, S.; Murumagi, A.; Kallioniemi, O.; Virtanen S.; Kilkku O. FusionCatcher—A tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data. 2014 Available online: <http://europepmc.org/abstract/ppr/ppr35712>. (accessed on 2 May 2019)
4. Benelli, M.; Pescucci, C.; Marseglia, G.; Severgnini, M.; Torricelli, F.; Magi, A. Discovering chimeric transcripts in paired-end RNA-seq data by using EricScript. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3232–3232.
5. Bray, N.L.; Pimentel, H.; Melsted, P.; Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 525–527.
6. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.R.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. doi:10.1073/pnas.0506580102.
7. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernysky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303.
8. Wang, K.; Li, M.; Hakonarson, H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e164. doi:10.1093/nar/gkq603.
9. Tate, J.G.; Bamford, S.; Jubb, H.C.; Sondka, Z.; Beare, D.M.; Bindal, N.; Boutselaki, H.; Cole, C.G.; Creatore, C.; Dawson, E.; et al. COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 941–947. doi:10.1093/nar/gky1015.
10. Newman, A.M.; Liu, C.L.; Green, M.R.; Gentles, A.J.; Feng, W.; Xu, Y.; Hoang, C.D.; Diehn, M.; Alizadeh, A.A. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods.* **2015**, *12*, 453–457. doi:10.1038/nmeth.3337.
11. Barbie, D.A.; Tamayo, P.; Boehm, J.S.; Kim, S.Y.; Moody, S.E.; Dunn, I.F.; Schinzel, A.C.; Sandy, P.; Meylan, E.; Scholl, C.; et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS -driven cancers require TBK1. *Nature* **2009**, *462*, 108–112. doi: 10.1038/nature08460.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusions

En bref, l'analyse par RNAseq de cette cohorte nous apporte plusieurs conclusions. D'une part, les tumeurs stromales de l'endomètre représentent un groupe très hétérogène d'un point de vue clinique, anatomopathologique, moléculaire et immunitaire. De plus, en l'absence des fusions canoniques *JAZF1-SUZ12* et *YWHAE-NUTM2*, d'autres anomalies moléculaires sont retrouvées en RNAseq. Enfin, les résultats suggèrent que les SSE avec réarrangements de *BCOR* sont toujours de haut grade et donc de mauvais pronostic, à la différence des SSE avec fusion *YWHAE-NUTM2B* qui peuvent être présent dans les SSE de BG comme de HG.

De manière particulièrement intéressante, l'analyse en RNAseq des SSE-HG avec fusion *YWHAE-NUTM2* (ainsi que les sarcomes à cellules rondes des tissus mous avec fusion *YWHAE-NUTM2*) et des tumeurs avec réarrangement de *BCOR* (*BCOR-ITD*, *BCOR-CCNB3*, etc...) montre une homogénéité transcriptomique, suggérant des mécanismes d'oncogenèse similaires. De plus, dans notre série rétrospective, les 2 cas de SSE-HG avec fusion *YWHAE-NUTM2* présentaient respectivement une mutation de *BCOR* et *BCORL1*.

Ainsi, nous avons souhaité poursuivre ces travaux de recherche sous la forme d'analyses fonctionnelles ex-vivo, en nous intéressant plus particulièrement au gène de fusion *YWHAE-NUTM2* (avec comme « contrôle » le gène fusion *JAZF1-SUZ12*), et en émettant comme hypothèse que la fusion *YWHAE-NUTM2* à elle seule n'explique pas le haut grade de la tumeur mais qu'il existerait un rôle potentiel de *BCOR*.

Pour ce faire, nous avons établi des lignées stables de cellules mésenchymateuses transfectées par les gènes de fusion *YWHAE-NUTM2* et *JAZF1-SUZ12* pour nous servir de modèles, puisqu'aucune lignée cellulaire primaire de SSE n'existe à notre connaissance. Ces travaux sont toujours en cours au sein de notre laboratoire et les premiers résultats sont présentés ci-dessous.

Perspectives

Sarcomes du stroma endométrial

Introduction

Les résultats obtenus précédemment par les analyses transcriptomiques nous ont apportés beaucoup de réponses à nos questionnements sur les SSE, tout en apportant également de nouvelles interrogations, notamment sur les mécanismes oncogéniques.

C'est pour cela que nous avons décidé de poursuivre ces travaux de recherche sur les SSE et notamment le transcrit *YWHAЕ-NUTM2*, avec comme indiqué précédemment des analyses fonctionnelles ex-vivo, sur des lignées de cellules mésenchymateuses transfectées de manière stable avec le gène de fusion oncogénique.

Alors que la première partie du travail, qui a consisté en l'établissement d'un modèle cellulaire, est terminée, la seconde partie, correspondant aux analyses fonctionnelles à proprement parlé, est toujours en cours. Les résultats, bien que très préliminaires, sont présentés ci-dessous sous la forme d'un article de recherche.

Article 2

Introduction

The previous work, based on RNAseq analysis in a large cohort of ESS, shows the molecular landscape of ESS and enables to better understand the biology and the carcinogenesis mechanisms. It also showed that the common altered genes identified in ESS are involved in chromatin remodeling. ESS that harbor transcripts involving *JAZF1* or *PHF1* were all classified as LG-ESS whereas tumors with *BCOR* rearrangements were all classified as HG-ESS. Surprisingly, the 5 ESS that harbored an *YWHAE-NUTM2* translocation were split. While three cases were classified as LG-ESS, the two other cases were considered as HG-ESS, clustering together with the *BCOR*-related ESS. Interestingly, these two latter cases presented with an additional *BCOR* or *BCORL1* gene mutation.

YWHAE belongs to the 14-3-3 family of proteins. It mediates signal transduction by binding to several proteins including CDC25 phosphatases, RAF1 or IRS1, and it is frequently dysregulated in cancer (110–113). High level of *YWHAE* has been observed in various cancers including colorectal cancer and hepatocellular carcinoma, and it is implicated in the pathogenesis of small cell lung cancer and breast cancer (114–116). Little is known about NUTM2, a member of the NUTM family. It is related to the NUT protein, which is rearranged with BRD3/4 in NUT midline carcinoma (117). In addition of ESS, the *YWHAE-NUTM2* fusion has also been described in other sarcomas such as clear cell sarcoma of the kidney (CCSK) (118) and undifferentiated round cell pediatric sarcoma (URCS) (119), suggesting its relevance in oncogenesis. In HG-ESS, the fusion protein is localized in the nucleus, whereas wild-type YWHAE is cytoplasmic. Therefore, the accessibility to potential interacting proteins might be

modified (66,120). Importantly, in the fusion protein, YWHAE retains dimerization and phosphoprotein binding domains (66).

BCOR is an epigenetic regulator located on chromosome X. It acts as an interacting corepressor of BCL-6 that enhances BCL-6-mediated transcriptional repression (*BCL-6 COREpressor*) (121) and binds to PCGF1 as part of the non-canonical PRC1.1 complex (Figure 1) (122), inducing gene silencing by epigenetic modifications of histones. The function of BCOR is thereby mediated by two domains: the BCL-6-binding domain and the PUFD domain that binds PCGF1 (123,124). Of note, *BCORL1* might also be a PRC1.1 core protein, alternatively to BCOR (125). BCOR is known to be implicated in different human cancers, with a specific involvement in various sarcomas such as CCSK (126,127), primitive mesenchymal myxoid tumor of infancy (119), small round blue cell “Ewing-like” sarcoma (128) and ESS (88,95). Several *BCOR* abnormalities have already been reported (mainly *BCOR-CCNB3*, *BCOR-MAML3*, *ZC3H7B-BCOR* and *BCOR-ITD*) and represent key genetic drivers in oncogenesis.

Remarkably, *BCOR* rearrangements and *YWHAE-NUTM2* fusion are mutually exclusive in the previously cited sarcomas. The fact that these somatic genetic alterations share strong similarities in clinical presentation, morphology and gene expression, in addition of the discovery of mutational abnormalities on *BCOR* and *BCORL1* in the 2 HG-ESS *YWHAE-NUTM2*, highlight a potential role of *BCOR* in this subtype of translocation-related sarcomas.

Anyway, the biochemical and pathological function of the fusion protein YWHAE-NUTM2 in ESS and the link with BCOR remain unclear. That is why we carried ex vivo experiments in order to explore the role of YWHAE-NUTM2 in ESS carcinogenesis, and decided to focus on *BCOR*.

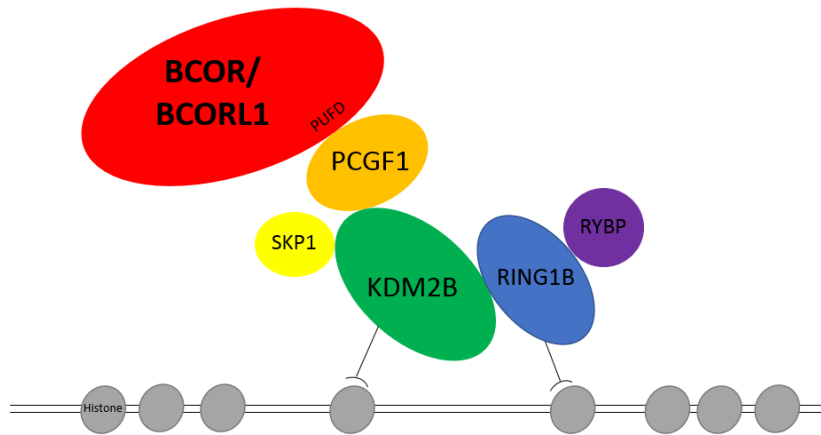


Figure 1. The noncanonical PRC1.1 complex. BCOR binds to PCGF1 by its PUFD domain and induce gene silencing by epigenetic modifications of histones.

Materials and methods

Tumors and cell lines

Tumors used in our study were provided from the “Centre de ressources biologiques” of the Centre Léon Bérard (CLB) and derived from two tumors of patients treated at the CLB (Table 1) and whose fusion transcripts had been identified by RNAseq from RNA (extracted from an FFPE block of the tumor): a *JAZF1-SUZ12* LG-ESS and an *YWHAE-NUTM2* neonatal STS. We used an immortalized mesenchymal stem cell (MSC) line (V54) as model system.

Expression vectors

The full coding region of *JAZF1-SUZ12* and *YWHAE-NUTM2* were determined by RNA-sequencing, designed on Ape[®] (Figure 1) and produced by RT-PCR and PCR from total RNA extracted from the tumors. Primer sequences are detailed in Table 2. After PCR, *JAZF1-SUZ12*

and YWHAE-NUTM2 were cloned into pIRESHyg3 vector (Takara®, Figure 2) to produce the pIRES-JAZF1 and pIRES-YWHAE vectors for constitutive expression. In all the cases, cDNA Sequences were verified by sequencing (Eurofins®).

Table 1. Characteristics of the tumor material used.

Gene fusion	Tumor	N° ARN	Volume	[ARN]	DV 200	28s/ 18s	RIN	Aliquots	Quantity /alicot
YWHAE-NUTM2	T162006	R180289	67 µl	11 ng/µL	32,26	0,8	3,1	1	744 ng
JAZF1-SUZ12	T171360	R180290	70 µl	22 ng/µL	55,74	-	1,8	1	1505 ng

Table 2. List of the primers used for PCR.

Primer	Sequence
JAZF1-SUZ12 forward	AAGGCGCCCCGGGATCCCCACCATGGATTACAAGGATGACG
JAZF1-SUZ12 reverse	GTACGATATCGGATCCTCAGAGTTTTTGTGTTTTGCTCTGT
YWHAE-NUTM2 forward	AAGGCGCCCCGGGATCCCCACCATGGATTACAAGGATGACG
YWHAE-NUTM2 reverse	GTACGATATCGGATCCTACTGGCTACAATGCTGCTTC

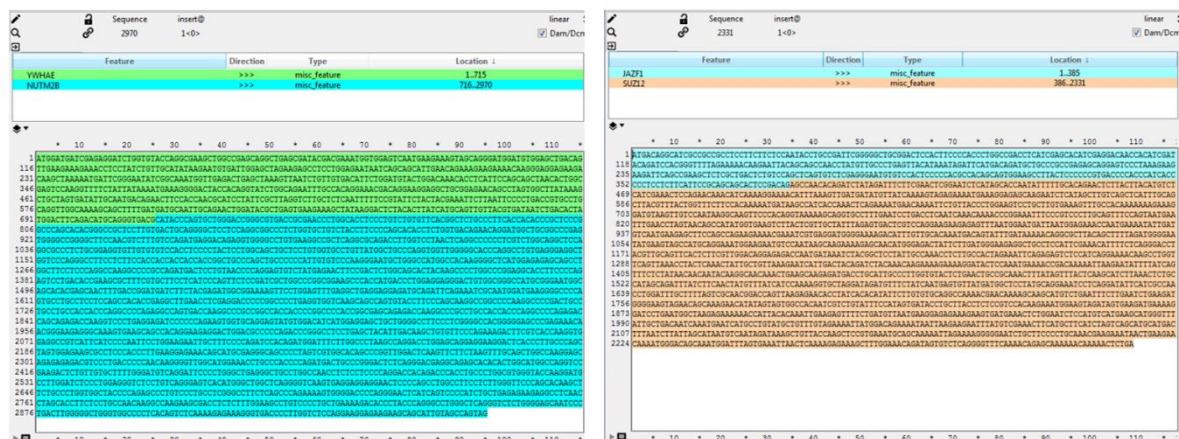


Figure 1. Full coding region of JAZF1-SUZ12, YWHAE-NUTM2, EPC1-PHF1 and BRD8-PHF1 gene fusion.

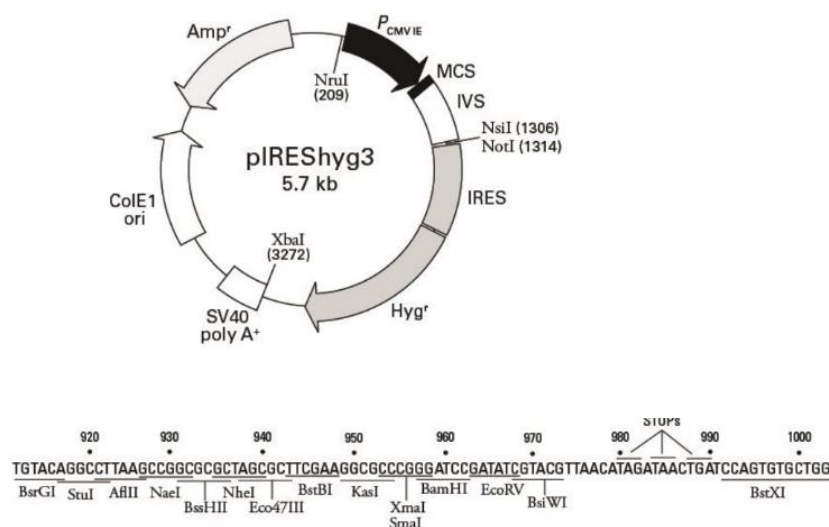


Figure 2. pIRESHyg3 Vector Map and Multiple Cloning Site.

Cell culture, transfections and proliferation

MSC-V54 cells were cultured in RPMI (Gibco®). Cultured media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (Penicillin/Streptomycin). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and tested for mycoplasma contamination. All transfections were carried out using Lipofectamine RNAiMax following the manufacturer's instructions. For plasmid transfections (pIRES-*JAZF1* and pIRES-*YWHAE*), 250 000 cells were transfected with 780 µg of plasmid DNA and 7.2 µL of Lipofectamine® LTX DNA Transfection Reagents. Stable transfected cell lines were isolated after selection in 200 µg/mL hygromycin. The siRNA used was against *BCOR* (siBCOR, 20nM, Dharmacon, ON-TARGETplus SMARTpool, L-004584-01-0005). All plasmid and siRNA transfections were accompanied with empty vector (pIRES) or control siRNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen®) transfections respectively. The MTS Assay Kit (Abcam®) was used to assess cell proliferation. HeLa cell line was used as a positive control to assess the expression of BCOR using western blot and Q-PCR.

Antibodies, Western Blot and immunoprecipitations

Samples were resolved by precast 4 to 12% gradient gel (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ gels, Bio-Rad) and transfer onto membrane (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack, Bio-Rad). Ponceau red is used to check the efficiency of the transfer. Then the membrane is blocked in TBS-t at 5% milk for 1 hour at room temperature and then hybridized overnight at 4°C with the primary antibodies, the characteristics of which are described in Table 3. At the end of this first incubation, the membranes are washed in TBS-t and then incubated with the secondary antibody (Table 3). Membranes are again washed in TBST and finally soaked in ECL reagent for 60 seconds, and exposure to autoradiography film (ChemiDoc™) for visualization of the bands. Immunoprecipitation with crosslinking protocol was performed following the manufacturer's instructions, with 250 µg of proteins and 2.6 µg of antibody (Table 3).

Table 3. Characteristics of the antibodies used.

Antibody	Supplier	Host	Clonality	Dilution
FLAG®M2	Sigma	Mouse	Monoclonal	1/3000 th TBS-0,1%tween-0,5% milk
BCOR	Abcam	Rabbit	Monoclonal	1/500 th TBS-0,1%tween-0,5% milk
Anti-IgG	Abcam	Rabbit	Polyclonal	1/3000 th TBS-0,1%tween-0,5% milk

Results

PCR, Cloning and transfection

The *YWHAE-NUTM2* and *JAZF1-SUZ12* fusion gene sequences have been successfully amplified by PCR. After placing a Tag at the N-terminal extremity, the sequences were cloned into a pIRESHyg3 expression vector by homologous recombination using the In-Fusion Cloning kit (Takara®) and following the manufacturer's instructions. The two recombinant plasmids carrying the sequences were verified by enzymatic digestion and sequencing.

Characterization of the transfected cell lines

Analysis for transfection efficiency

The green fluorescent protein (GFP) was used to determine transfection performance at 24 hours post transfection. In addition, a Western Blot using the ANTI-Flag-M2 monoclonal antibody was performed at 48 hours post transfection, before antibiotic selection (Figure 3).

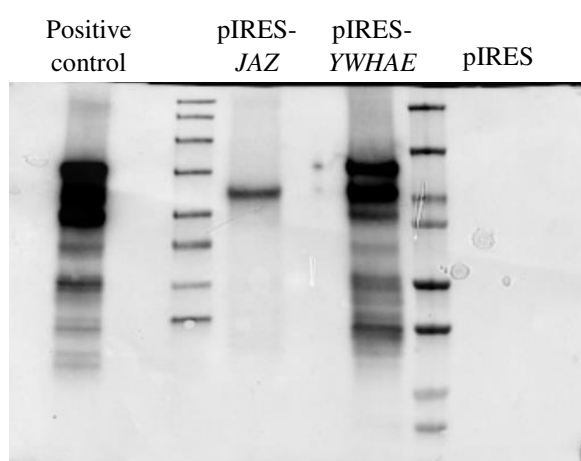


Figure 3. Western Blot analysis with anti-Flag-M2 antibody confirms the expression of the fusion protein at 48 hours post transfection, before antibiotic selection.

Analysis of transcriptional and protein expression of *YWHAE-NUTM2* and *JAZF1-SUZ12*

After antibiotics selection (hygromycin), overexpression of the *YWHAE-NUTM2* and *JAZF1-SUZ12* fusion genes was verified by Q-PCR and Western blot. (Figure 4A and 4B).

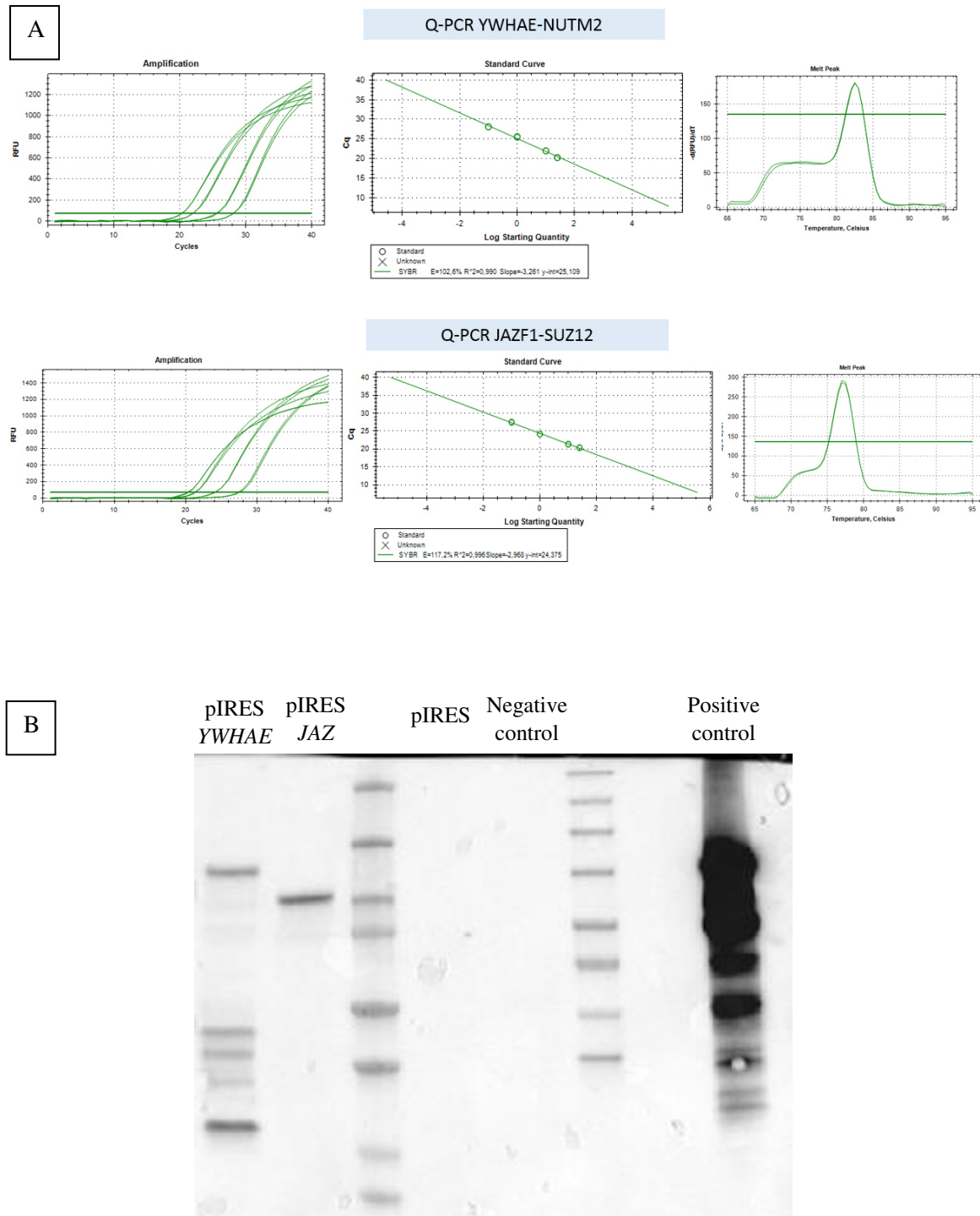


Figure 4. Overexpression of the *YWHAE-NUTM2* and *JAZF1-SUZ12* fusion is confirmed by Q-PCR (A) and Western blot analysis with anti-Flag-M2 antibody (B) after antibiotics selection (hygromycin).

Analyzes of phenotypes and proliferation of transfected cells

The analysis of the cellular phenotypes obtained for the cells transfected with the *YWHAE-NUTM2* fusion gene (pIRES-*YWHAE*) did not show any differences compared to pIRES-*JAZF1* and pIRES cell lines (Figure 5A). The cell size and morphology are indeed similar to those of the control cells. Further analysis also did not show any increase in the rate of proliferation and doubling of cells transfected with *YWHAE-NUTM2*. On the contrary, pIRES-*YWHAE* transfected cells seem to proliferate slower (Figure 5B).

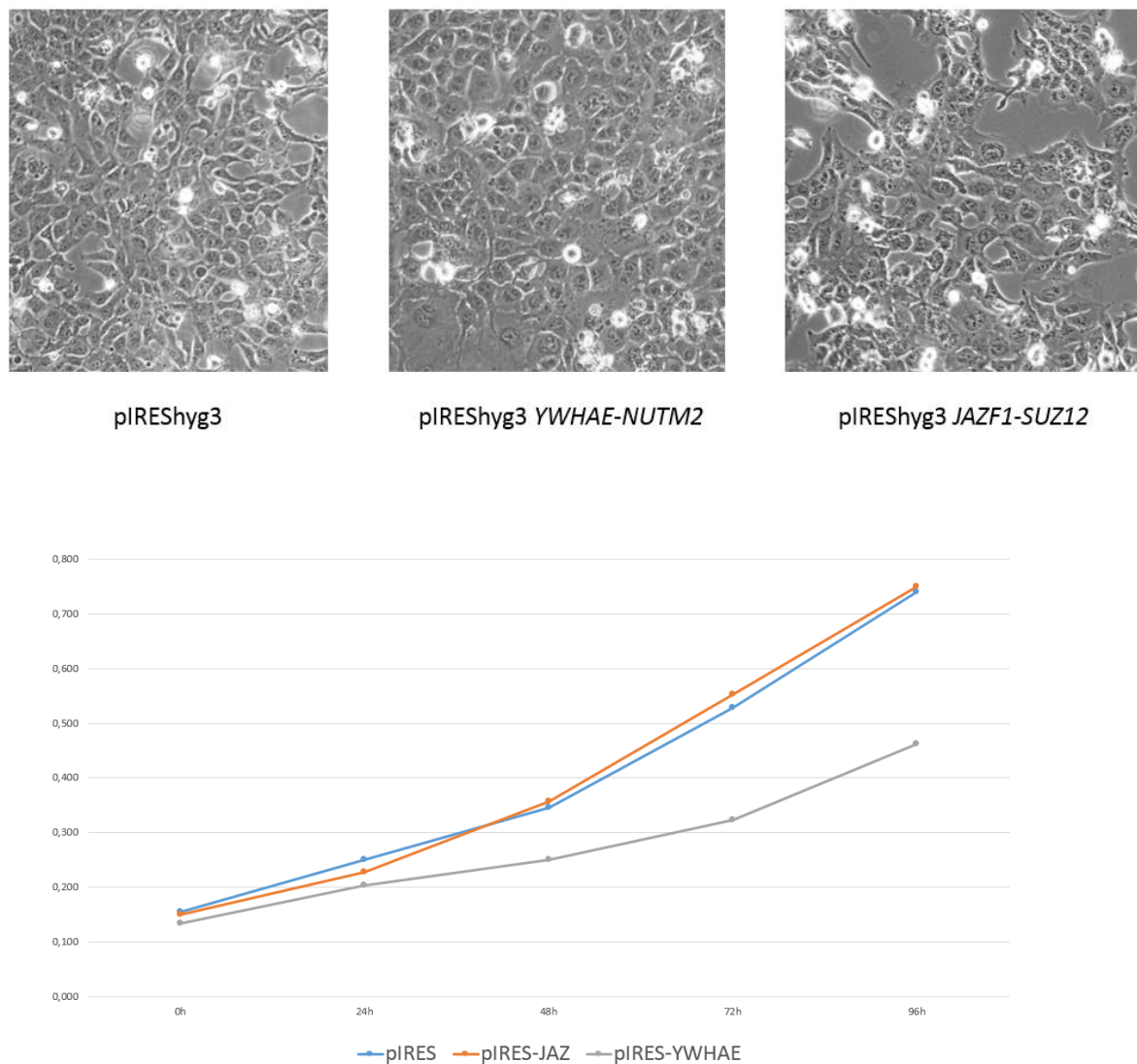


Figure 5. The MSC-V54 cells keep the same morphology regardless of the fusion (A) and did not show any increase in the rate of proliferation (B).

Analysis of interactions between *BCOR* and *YWHAE-NUTM2* or *JAZF1-SUZ12*

In comparison to pIRES and pIRES-*JAZF1*, overexpression of *YWHAE-NUTM2* seems to increase the transcriptional expression the expression of *BCOR* (Figure 6). Regardless of the cell line, co-transfection with siBCOR induces loss of BCOR expression in RNA and protein. Interestingly, it does not seem to modify the expression of *BCORL1* except for the pIRES-*YWHAE* in which we notice an overexpression of *BCORL1* mRNA.

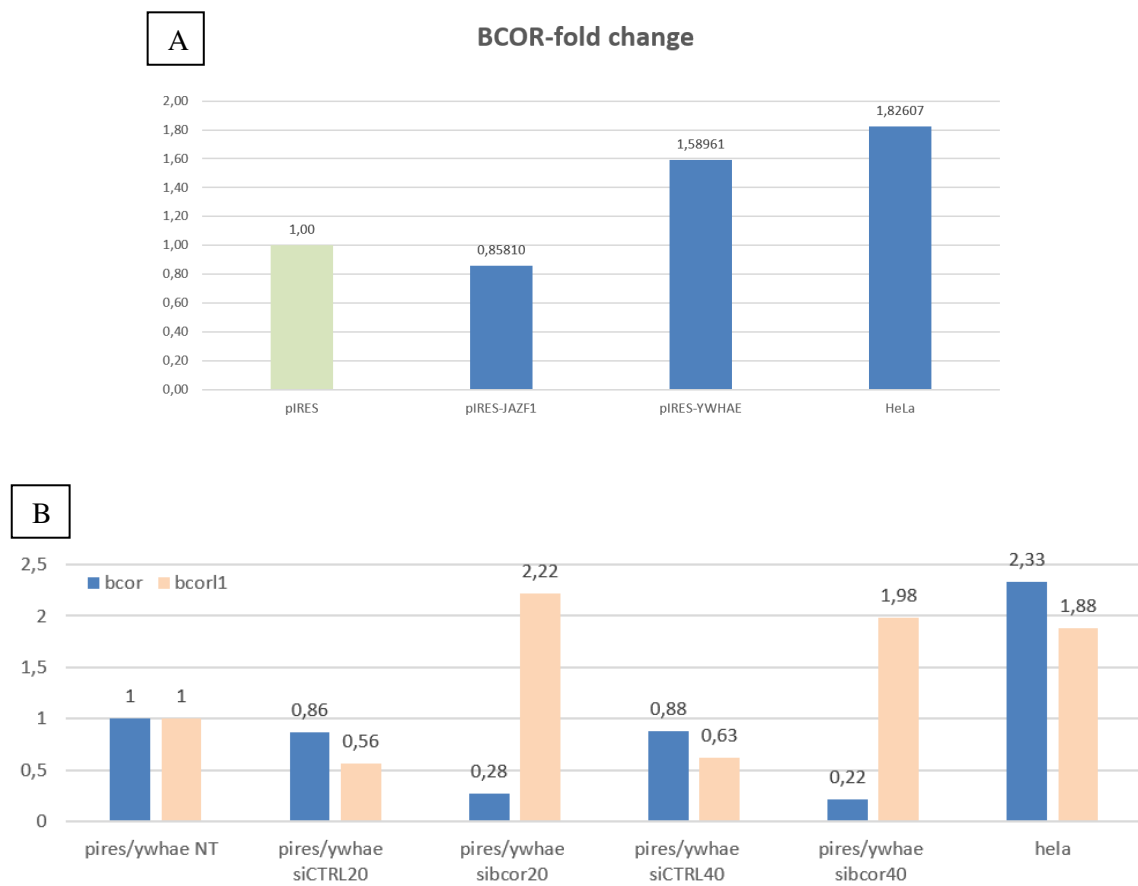


Figure 6. A. Level of expression of *BCOR* mRNA according to the gene fusion. B. Level of expression of *BCORL1* mRNA before and after co-transfection with SiBCOR.

Discussion

Several translocations are known to be “drivers” in ESS, including t(10;17)(q22-23;p13) *YWHAE-NUTM2* gene fusion (70). This fusion protein is also associated with tumorigenesis in other subtypes of sarcomas, and identification of the genes regulated by this oncogenic protein represents a key aspect in the understanding of the molecular pathology of these malignant tumors. This somatic alteration is used as one of the important indicators of the 2014 WHO classification of ESS (46,48), as the HG-ESS category only includes tumors harboring the *YWHAE-NUTM2* gene fusion. Lee et al. previously showed that *YWHAE-NUTM2* maintains a structurally and functionally intact YWHAE protein-binding domain, which is directed to the nucleus by a NUTM2 nuclear localization sequence (66,70). Kenny et al. (118) showed that *YWHAE-NUTM2* expressing cells exhibited significantly greater cell migration compared to isogenic controls. In addition, gene and protein expression studies were indicative of dysregulated MAPK/PI3K–AKT signalling. Otherwise, *YWHAE-NUTM2* tumors are associated with overexpression of *BCOR* and immunohistochemical staining of BCOR might be a useful marker for those tumors (69). Moreover, the characterization of their transcriptomes by RNA-sequencing confirmed their remarkable homogeneity with all *BCOR*-rearranged tumors. BCOR was identified as an interacting corepressor of BCL6 (121), is a core component of PRC1.1 and specific class I and II histone deacetylases (HDACs) have been shown to interact with this protein. Anyway, there are still a lot to learn about the pathogenetic role of *YWHAE-NUTM2* oncoprotein in ESS.

We generated MSCV54 cells with expression of *YWHAE-NUTM2* (pIRES-*YWHAE*), in order to study the functional effects of the fusion protein, compared to controls with expression of *JAZF1-SUZ12* (pIRES-*JAZF1*) and without any gene fusion expression (pIRES). Among the genes not previously described to be regulated by the fusion, we focused on *BCOR*.

First of all, our results suggest that in ESS, *YWHAE-NUTM2* gene fusion might not be directly associated with higher grade disease. As a reminder, our previous work has allowed us to better classify the endometrial stromal tumors, with LG-ESS characterized by *JAZF1* or *PHF1* fusion and HG-ESS with *BCOR* fusion. Interestingly, ESS with *YWHAE-NUTM2* fusion were split between LG and HG. Anyway, we already know that tumors with the same oncogenic fusion can have completely different prognosis. For example, the *EWSR1-ATF1* translocation is shared by clear cell sarcoma, a true malignant tumors with poor prognosis, and angiomatoid fibrous tumors, considered to be a tumor of intermediate malignancy.

Then, our results suggest that the oncoprotein might be directly responsible of an overexpression of *BCOR*. The fact that knock-down *BCOR* using siRNA induce a marked increase in the level of *BCORL1* in pIRES-YWHAE provides a suspicion that *BCOR/BCORL1* expression might be essential by the oncoprotein in its physiologic context.

The mechanism by which *BCOR* is overexpressed in *YWHAE-NUTM2* tumors remain elusive and the role of *BCOR* in the ESS family of tumors is still unknown. The reason why *YWHAE-NUTM2* ESS could be of HG and LG is also elusive. Of note, a difference of expression in hormone receptors was highlighted in the retrospective series, as the three cases of LG-ESS with YWAHE fusion were ER positive while the two cases of HG-ESS with YWHAE fusion were ER negative. These data suggest that ER and YWHAE-NUTM2 co-expression may be an indicator of indolent tumor. In addition, those two latter cases presented with additional mutation of *BCOR* and *BCORL1*. These data suggest that a double hit (*BCOR* and *YWHAE-NUTM2*) may be an indicator of tumor aggressiveness.

In order to continue the investigations about the interaction between the YWHAE-NUTM2 fusion protein and BCOR, the first techniques of immunoprecipitation were carried out and they will be followed by mass spectrometry for identifying fusion protein/protein interactions. Another interesting point would be to generate *BCOR* mutations within the genomic DNA of pIRES-YWHAE cell lines, using the CRISPR/Cas9 system. Moreover, the ER status of the MSC-V54 cell line is unknown but we plan to check it by IHC and Q-PCR. If it is positive, it would be of interest to evaluate the effect of antiestrogens and aromatase inhibitor on growth of the pIRES-YWHAE cell line (or the effect of Estrogen Receptor siRNA) and/or to use a culture media without hormones. Finally, we would like to establish cell lines from patient-derived tumors (patient-derived tumor xenografts, PDX), as it presents strong advantages in the field of preclinical studies.

In conclusion, our observation that the oncoprotein YWHAE-NUTM2 confers a higher level of expression of *BCOR* encourages the speculation of an interaction between those 2 proteins, even if those preliminary results must be confirmed. If there is a direct interaction of the fusion protein with BCOR needs to be explored with additional experiments that are ongoing, especially immunoprecipitation and mass spectrometry.

Conclusion

Nous avons réussi à établir des lignes stables de cellules mésenchymateuses surexprimant les protéines de fusion *YWHAE-NUTM2* et *JAZF1-SUZ12*. Les premiers résultats confortent notre hypothèse que la fusion n'explique pas à elle seule le grade de la tumeur. En outre, il semble exister un lien direct entre l'expression du gène de fusion *YWHAE-NUTM2* et de *BCOR*.

La nature exacte de ce lien reste à déterminer, à l'aide des techniques d'immunoprécipitation et spectrométrie de masse, qui sont en cours. Il faudra également poursuivre les investigations sur les modèles cellulaires, en déterminant le statut des récepteurs aux œstrogènes, et éventuellement en introduisant une mutation de *BCOR* avec un outil CRISPR-Cas9.

Autres sous-types tumoraux

L'utilisation du RNAseq offre de très importantes perspectives de recherches en oncologie, et notamment dans le domaine des sarcomes à translocation. Ainsi, durant ces dernières années, nous nous sommes également intéressés à d'autres sous-types tumoraux. Par exemple, les tumeurs à cellules géantes téno-synoviales (TCGT), également connue sous le nom de synovite villonodulaire pigmentée (PVNS), sont des tumeurs conjonctives rares caractérisées sur le plan moléculaire par une translocation t (1; 2), qui fusionne le gène *CSF1* sur le chromosome 1p11 au promoteur du collagène de type VI a3 (*COL6A3*) sur le chromosome 2q37 (129,130). CSF1, à son tour, attire les cellules inflammatoires non néoplasiques exprimant le récepteur CSF1 (CSF1R), telles que les macrophages exprimant CSF1R, par un effet paracrine. Cette attraction conduit à la formation de cellules géantes multinucléées. Néanmoins, le diagnostic se fait la plupart du temps par la clinique, l'imagerie et la morphologie, et les techniques de biologie moléculaires ne sont pas réalisées en routine. De plus, on sait que des fusions alternatives impliquant CSF1 existent (131).

Nous décrivons ci-dessous le cas d'une patiente présentant une PVNS avec un gène de fusion n'impliquant pas *CSF1*, mais avec une surexpression de CSF1 et une réponse complète sous une thérapie ciblée anti-CSF1R.

A noter qu'une série rétrospective de 37 PVNS séquencée en ARN (RNAseq) est en cours d'analyse.

Article 3

Complete response to CSF1R inhibitor in a translocation variant of teno-synovial giant cell tumor without genomic alteration of the CSF1 gene.

Brahmi M, Alberti L, Tirode F, Karanian M, Eberst L, Pissaloux D, Cassier P, Blay JY.

Annals of Oncology 2018

Annals of Oncology

Official Journal of the

European Society for Medical Oncology and the Japanese Society of Medical Oncology



Volume 29 | No. 6 | June 2018

Letters to the editor

Complete response to CSF1R inhibitor in a translocation variant of teno-synovial giant cell tumor without genomic alteration of the CSF1 gene

Teno-synovial giant cell tumour (TGCT), also known as pigmented villonodular synovitis (PVNS), is a rare neoplasm affecting the synovium and tendon sheaths in young adults, with recurrent translocations involving *COL6A3* and *CSF1* genes [1]. The fusion protein is cleaved, resulting in the overproduction of CSF1, which attracts CSF1R-expressing non-neoplastic cells (macrophages and monocytes) through a paracrine effect [1]. Complete surgical resection is not always feasible and/or may lead to functional impairment or amputation. Tyrosine kinase inhibitors or antibodies, such as imatinib, pexidartinib or

emactuzumab showed encouraging clinical activity in clinical studies [2–4]. *CSF1* gene alteration is therefore considered as the actionable driver oncogene in PVNS.

We report the case of a 61-year-old female with a rapidly growing TGCT of the dominant hand (Figure 1). Because complete surgery could not be conservative, this patient was proposed for inclusion in a phase III study testing pexidartinib [4]. She achieved complete response still ongoing at 17 months. A PCR analysis failed to identify the classical fusion gene *COL6A3-CSF1*. The tumour was submitted to RNAseq analysis from FFPE tissues using TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina®) and NextSeq sequencing system. Two in-frame fusion transcripts, *HMGA2-NCOR2* and *NCOR2-SUPT3H*, were identified. High level of *CSF1* gene expression was also detected, similar to 15 other PVNS, and relatively higher *IL-34* gene expression was

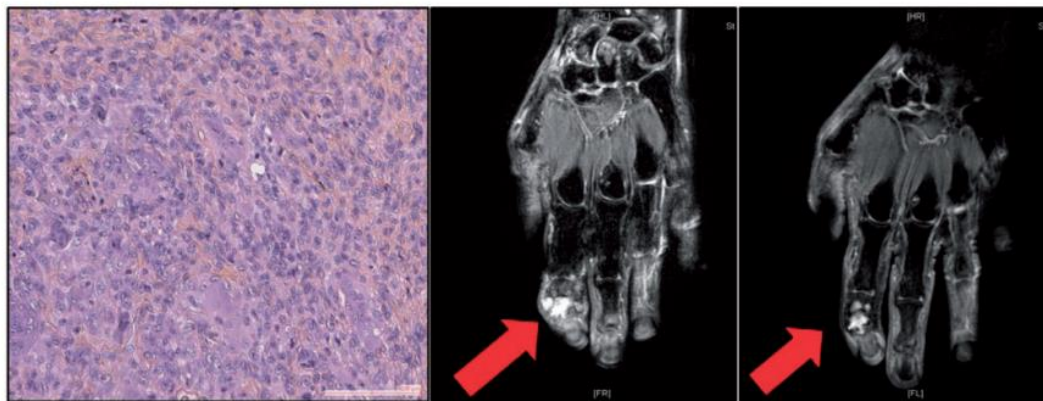


Figure 1. Patient with a PVNS exhibiting *HMGA2-NCOR2* and *NCOR2-SUPT3H* translocations overexpressing both *IL-34* and *CSF1*, and responding to pexidartinib. The patient presented with pain and swelling of the right index finger with limited range of movement. MRI shows bony erosions and nodular synovial proliferation. Mutilating surgery was needed in order to perform a complete resection. (A) Histology of the *NCOR2-SUPT3H* PVNS ($\times 20$): usual aspect of a tenosynovial giant cell tumor, localized type: proliferation composed of osteoclastic-like giant cell and small mononuclear cells; (B) MRI before pexidartinib (6 June 2016); (C) MRI after 9 months of treatment (28 February 2017).

observed in this patient. Other target receptors of pexidartinib (*KIT*, *FLT3*, and ligands) were expressed at similar levels as in other PVNS (not shown). Fluorescence in situ hybridization was carried out, showing rearrangement of *HMGA2*, followed by confirmation of the fusion by RT-PCR.

The antitumor activity of *CSF1R* TKI in PVNS is thought to result from the over production of the *CSF1* ligand resulting from the genomic alteration of *CSF1* gene. Response to a *CSF1R* TKI in a PVNS without genomic alterations of the *CSF1* gene has not been previously described. Similarly, the response to a *CSF1R* TKI in a tumour overexpressing both *CSF1* and *IL-34*, another ligand of *CSF1R* [5], has not been previously reported.

The overexpression of the *CSF1* and *IL-34* genes is probably the consequence of the expression of *HMGA2/NCOR2* and/or *NCOR2/SUPT3H*. One or both of these fusion transcripts are the likely drivers of the upregulation of the expression of the *CSF1* gene as in “classical” PVNS, and also of *IL-34* [1]. The *HMGA2-NCOR2* fusion protein may be a more likely candidate, given the role of *HMGA2* in connective tissue tumours and the protein domains remaining in the fusion gene.

This observation points to the molecular heterogeneity of PVNS, which exhibit translocations encoding for fusion proteins not involving the *CSF1* gene, but inducing the expression of the *CSF1* and *IL-34* genes. This molecular heterogeneity converges therefore to the activation of *CSF1R* with a major clinical response to a *CSF1R* inhibitor in this patient. It also shows that overexpression of *CSF1* and/or *IL-34* may be biomarkers of interest for *CSF1* TKI in PVNS and possibly other tumours.

This is the first report of translocation variant of a TGCT without genomic alteration of the *CSF1* or *IL-34* gene responding to *CSF1* inhibition.

M. Brahmi^{1*}, L. Alberti², F. Tirode³, M. Karanian², L. Eberst¹, D. Pissaloux², P. Cassier¹ & J. Y. Blay¹

Departments of ¹Medical Oncology; ²Biopathology, Centre Léon Bérard, Lyon; ³Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

(*E-mail: mehdi.brahmi@lyon.unicancer.fr)

Funding

NetSARC (INCA) and RREPS (INCA), Association DAM's, Ensemble contre Le GIST, Eurosarc (FP7-278742), la Fondation ARC, Infosarcome, InterSARC (INCA), LabEx DEvweCAN (ANR-10-LABX-0061), Ligue de L'Ain contre le Cancer, LYric (DGOS-INCa-4664), and EURACAN (EU project 739521).

Disclosure

MB, LE, PC and JYB have received research support from Novartis, Plexxikon and Roche. LA, FT and MK declare that they have no conflict of interest.

References

- West RB, Rubin BP, Miller MA et al. A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of *CSF1* expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(3): 690–695.
- Blay J-Y, El Sayadi H, Thiesse P et al. Complete response to imatinib in relapsing pigmented villonodular synovitis/tenosynovial giant cell tumor (PVNS/TGCT). *Ann Oncol* 2007; 19(4): 821–822.
- Cassier PA, Italiano A, Gomez-Roca CA et al. *CSF1R* inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. *Lancet Oncol* 2015; 16(8): 949–956.
- Tap WD, Wainberg ZA, Anthony SP et al. Structure-guided blockade of *CSF1R* kinase in tenosynovial giant-cell tumor. *N Engl J Med* 2015; 373(5): 428–437.
- Guillonneau C, Bézé S, Anegón I. Immunoregulatory properties of the cytokine *IL-34*. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(14): 2569–2586.

doi:10.1093/annonc/mdy129
Published online 14 April 2018

Conclusions

Les travaux que nous présentons ici apportent un éclairage nouveau sur la biologie des SSE. L'analyse rétrospective de la cohorte de 42 patientes a montré que nous étions face à un groupe hétérogène de tumeurs d'un point de vue clinique, anatomopathologique, moléculaire et immunitaire. De nouvelles anomalies moléculaires ont été découvertes par le RNA-sequencing, qui a également permis de reclasser un quart des tumeurs de la série. Or, l'étape de classification de ces tumeurs est cruciale pour la prise en charge des patientes, notamment pour la décision de traitement post-opératoire (adjuvant) par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Nous avons également noté que les anomalies moléculaires retrouvées par RNAseq comprenaient dans la grande majorité des cas des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine (notamment des gènes des complexes PRC1 et 2), ce qui peut suggérer qu'ils activent une voie oncogénique analogue. Enfin, les résultats montrent que les SSE avec réarrangements de *BCOR* sont toujours de haut grade et donc de mauvais pronostic, à la différence de la translocation *YWHAE-NUTM2B* qui peut être retrouvée dans les SSE de BG comme de HG. *BCOR* et/ou l'expression des récepteurs hormonaux pourraient être impliqués dans cette dichotomie. En somme, Le RNAseq apparait donc comme un outil indispensable à la bonne prise en charge diagnostique et thérapeutique des SSE.

D'un point de vue fonctionnel, nous avons pu établir des lignées stables de cellules mésenchymateuses surexprimant les gènes de fusion *YWHAE-NUTM2*. Les résultats sont encore très préliminaires mais il ne semble pas exister d'avantage prolifératif par rapport aux cellules transfectées avec la fusion *JAZF1-SUZ12* ou avec un vecteur vide. En revanche, la surexpression d'*YWHAE-NUTM2* semble augmenter de manière significative l'expression du gène *BCOR*.

Bibliographie

1. Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere A-V, Péoc'h M, Istier L, et al. Incidence of Sarcoma Histotypes and Molecular Subtypes in a Prospective Epidemiological Study with Central Pathology Review and Molecular Testing. PLOS ONE. 3 août 2011;6(8):e20294.
2. Correa H. Li–Fraumeni Syndrome. J Pediatr Genet. juin 2016;5(2):84-8.
3. Patel SR. Radiation-induced sarcoma. Curr Treat Options Oncol. août 2000;1(3):258-61.
4. Farzaliyev F, Hamacher R, Steinau Professor H-U, Bertram S, Podleska LE. Secondary angiosarcoma: A fatal complication of chronic lymphedema. J Surg Oncol. janv 2020;121(1):85-90.
5. Board WC of TE. Soft Tissue and Bone Tumours [Internet]. [cité 10 août 2020]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Soft-Tissue-And-Bone-Tumours-2020>
6. Corless CL. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? Modern Pathology. janv 2014;27(1):S1-16.
7. Tabone-Eglinger S, Subra F, El Sayadi H, Alberti L, Tabone E, Michot J-P, et al. KIT mutations induce intracellular retention and activation of an immature form of the KIT protein in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res. 15 avr 2008;14(8):2285-94.
8. Timbergen MJM, Smits R, Grünhagen DJ, Verhoef C, Sleijfer S, Wiemer EAC. Activated Signaling Pathways and Targeted Therapies in Desmoid-Type Fibromatosis: A Literature Review. Front Oncol [Internet]. 2019 [cité 10 août 2020];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00397/full>
9. Allen MD, Freund SMV, Zinzalla G, Bycroft M. The SWI/SNF Subunit INI1 Contains an N-Terminal Winged Helix DNA Binding Domain that Is a Target for Mutations in Schwannomatosis. Structure. 7 juill 2015;23(7):1344-9.
10. Gadd S, Sredni ST, Huang C-C, Perlman EJ, Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. Rhabdoid tumor: gene expression clues to pathogenesis and potential therapeutic targets. Lab Invest. mai 2010;90(5):724-38.
11. Kohashi K, Yamamoto H, Yamada Y, Kinoshita I, Taguchi T, Iwamoto Y, et al. SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Status in SMARCB1/INI1-preserved Epithelioid Sarcoma. Am J Surg Pathol. 2018;42(3):312-8.
12. Arun D, Gutmann DH. Recent advances in neurofibromatosis type 1. Curr Opin Neurol. avr 2004;17(2):101-5.

13. Italiano A, Bianchini L, Keslair F, Bonnafous S, Cardot-Leccia N, Coindre J-M, et al. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer*. 15 mai 2008;122(10):2233-41.
14. Udager AM, Ishikawa MK, Lucas DR, McHugh JB, Patel RM. MYC immunohistochemistry in angiosarcoma and atypical vascular lesions: practical considerations based on a single institutional experience. *Pathology*. déc 2016;48(7):697-704.
15. Nakano K, Takahashi S. Translocation-Related Sarcomas. *Int J Mol Sci* [Internet]. 28 nov 2018 [cité 10 août 2020];19(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320865/>
16. Guillou L, Aurias A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch*. févr 2010;456(2):201-17.
17. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Pérot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med*. juill 2010;16(7):781-7.
18. Chibon F, Lesluyes T, Valentin T, Le Guellec S. CINSARC signature as a prognostic marker for clinical outcome in sarcomas and beyond. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(2):124-9.
19. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 01 2018;29(Suppl 4):iv51-67.
20. Casali PG, Bielack S, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 01 2018;29(Suppl 4):iv79-95.
21. Casali PG, Abecassis N, Aro HT, Bauer S, Biagini R, Bielack S, et al. Gastrointestinal stromal tumours: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 01 2018;29(Suppl 4):iv267.
22. Derbel O, Heudel PE, Cropet C, Meeus P, Vaz G, Biron P, et al. Survival impact of centralization and clinical guidelines for soft tissue sarcoma (A prospective and exhaustive population-based cohort). *PLoS ONE*. 2017;12(2):e0158406.
23. Ray-Coquard I, Montesco MC, Coindre JM, Dei Tos AP, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Sarcoma: concordance between initial diagnosis and centralized expert review in a population-based study within three European regions. *Ann Oncol*. sept 2012;23(9):2442-9.
24. Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, Nguyen BB, Terrier P, Collin F, et al. Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. janv 1997;15(1):350-62.
25. Blay J-Y, Honoré C, Stoeckle E, Meeus P, Jafari M, Gouin F, et al. Surgery in reference centers improves survival of sarcoma patients: a nationwide study. *Ann Oncol*. 01 2019;30(7):1143-53.
26. Nagar SP, Mytelka DS, Candrilli SD, D'yachkova Y, Lorenzo M, Kasper B, et al. Treatment Patterns and Survival among Adult Patients with Advanced Soft Tissue Sarcoma: A

Retrospective Medical Record Review in the United Kingdom, Spain, Germany, and France. Sarcoma [Internet]. 24 mai 2018 [cité 23 août 2020];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5994280/>

27. Carbonnaux M, Brahmi M, Schiffler C, Meeus P, Sunyach M, Bouhamama A, et al. Very long-term survivors among patients with metastatic soft tissue sarcoma. *Cancer Med*. 27 mars 2019;8(4):1368-78.
28. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 8 janv 2019;47(D1):D941-7.
29. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 29 mars 2013;339(6127):1546-58.
30. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10(1):25-50.
31. Merid SK, Goranskaya D, Alexeyenko A. Distinguishing between driver and passenger mutations in individual cancer genomes by network enrichment analysis. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 19 sept 2014 [cité 10 août 2020];15(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262241/>
32. Fukushima M, Schaefer I-M, Fletcher CDM. Myolipoma of Soft Tissue: Clinicopathologic Analysis of 34 Cases. *Am J Surg Pathol*. févr 2017;41(2):153-60.
33. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer*. juin 2015;15(6):371-81.
34. Bui NQ, Przybyl J, Trabucco SE, Frampton G, Hastie T, van de Rijn M, et al. A clinico-genomic analysis of soft tissue sarcoma patients reveals CDKN2A deletion as a biomarker for poor prognosis. *Clinical Sarcoma Research*. 11 sept 2019;9(1):12.
35. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent Gene Fusions in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer*. juill 2008;8(7):497-511.
36. Bunting SF, Nussenzweig A. END-JOINING, TRANSLOCATIONS AND CANCER. *Nat Rev Cancer*. juill 2013;13(7):443-54.
37. Y Z, M G, Dg H, Ms B, C B, R C, et al. The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol*. 1 janv 2010;106:93-133.
38. Korb J, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell*. 14 mars 2013;152(6):1226-36.
39. Pellestor F, Gatinois V. Chromoanasythesis: another way for the formation of complex chromosomal abnormalities in human reproduction. *Hum Reprod*. 1 août 2018;33(8):1381-7.
40. Shen MM. Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. *Cancer Cell*. 13 mai 2013;23(5):567-9.
41. Anderson ND, de Borja R, Young MD, Fuligni F, Rosic A, Roberts ND, et al. Rearrangement bursts generate canonical gene fusions in bone and soft tissue tumors. *Science*. 31 2018;361(6405).

42. Gostissa M, Ranganath S, Bianco JM, Alt FW. Chromosomal location targets different MYC family gene members for oncogenic translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 févr 2009;106(7):2265-70.
43. Yang L, Hu H-M, Zielinska-Kwiatkowska A, Chansky HA. FOXO1 is a direct target of EWS-Flt1 oncogenic fusion protein in Ewing's sarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 5 nov 2010;402(1):129-34.
44. Sirvent N, Maire G, Pedeutour F. Genetics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors: from ring chromosomes to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. mai 2003;37(1):1-19.
45. Puliyaath G, Nair MK. Endometrial stromal sarcoma: A review of the literature. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2012;33(1):1-6.
46. RJ K, ML C, CS H, RH Y. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs [Internet]. [cité 20 août 2020]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Female-Reproductive-Organs-2014>
47. Chang KL, Crabtree GS, Lim-Tan SK, Kempson RL, Hendrickson MR. Primary uterine endometrial stromal neoplasms. A clinicopathologic study of 117 cases. *Am J Surg Pathol*. mai 1990;14(5):415-38.
48. Ali RH, Rouzbahman M. Endometrial stromal tumours revisited: an update based on the 2014 WHO classification. *J Clin Pathol*. mai 2015;68(5):325-32.
49. Xie W, Bi X, Cao D, Yang J, Shen K, You Y. Primary endometrioid stromal sarcomas of the ovary: a clinicopathological study of 14 cases with a review of the literature. *Oncotarget*. 28 juin 2017;8(38):63345-52.
50. Lee C-H, Nucci MR. Endometrial stromal sarcoma--the new genetic paradigm. *Histopathology*. juill 2015;67(1):1-19.
51. Dionigi A, Oliva E, Clement PB, Young RH. Endometrial stromal nodules and endometrial stromal tumors with limited infiltration: a clinicopathologic study of 50 cases. *Am J Surg Pathol*. mai 2002;26(5):567-81.
52. McCluggage WG, Date A, Bharucha H, Toner PG. Endometrial stromal sarcoma with sex cord-like areas and focal rhabdoid differentiation. *Histopathology*. oct 1996;29(4):369-74.
53. Clement PB, Scully RE. Endometrial stromal sarcomas of the uterus with extensive endometrioid glandular differentiation: a report of three cases that caused problems in differential diagnosis. *Int J Gynecol Pathol*. juill 1992;11(3):163-73.
54. Jung C-K, Jung J-H, Lee A, Lee Y-S, Choi Y-J, Yoon S-K, et al. Diagnostic use of nuclear β -catenin expression for the assessment of endometrial stromal tumors. *Modern Pathology*. juin 2008;21(6):756-63.
55. Chiang S, Oliva E. Cytogenetic and molecular aberrations in endometrial stromal tumors. *Hum Pathol*. mai 2011;42(5):609-17.

56. Koontz JI, Soreng AL, Nucci M, Kuo FC, Pauwels P, van Den Berghe H, et al. Frequent fusion of the JAZF1 and JAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22 mai 2001;98(11):6348-53.
57. Hrzenjak A. JAZF1/SUZ12 gene fusion in endometrial stromal sarcomas. *Orphanet J Rare Dis*. 16 févr 2016;11:15.
58. Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander A null, et al. Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development*. sept 2001;128(17):3371-9.
59. Ma X, Wang J, Wang J, Ma CX, Gao X, Patriub V, et al. The JAZF1-SUZ12 fusion protein disrupts PRC2 complexes and impairs chromatin repression during human endometrial stromal tumorigenesis. *Oncotarget*. 17 janv 2017;8(3):4062-78.
60. Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol*. déc 2009;10(12):1188-98.
61. D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol*. janv 2010;116(1):131-9.
62. Seagle B-LL, Shilpi A, Buchanan S, Goodman C, Shahabi S. Low-grade and high-grade endometrial stromal sarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol Oncol*. 2017;146(2):254-62.
63. Amant F, Floquet A, Friedlander M, Kristensen G, Mahner S, Nam EJ, et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for endometrial stromal sarcoma. *Int J Gynecol Cancer*. nov 2014;24(9 Suppl 3):S67-72.
64. Dahhan T, Fons G, Buist MR, Ten Kate FJW, van der Velden J. The efficacy of hormonal treatment for residual or recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma. A retrospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. mai 2009;144(1):80-4.
65. Kurihara S, Oda Y, Ohishi Y, Iwasa A, Takahira T, Kaneki E, et al. Endometrial stromal sarcomas and related high-grade sarcomas: immunohistochemical and molecular genetic study of 31 cases. *Am J Surg Pathol*. août 2008;32(8):1228-38.
66. Lee C-H, Ou W-B, Mariño-Enriquez A, Zhu M, Mayeda M, Wang Y, et al. 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17 janv 2012;109(3):929-34.
67. Sciallis AP, Bedroske PP, Schoolmeester JK, Sukov WR, Keeney GL, Hodge JC, et al. High-grade endometrial stromal sarcomas: a clinicopathologic study of a group of tumors with heterogeneous morphologic and genetic features. *Am J Surg Pathol*. sept 2014;38(9):1161-72.
68. Lee C-H, Ali RH, Rouzbahman M, Marino-Enriquez A, Zhu M, Guo X, et al. Cyclin D1 as a diagnostic immunomarker for endometrial stromal sarcoma with YWHAE-FAM22 rearrangement. *Am J Surg Pathol*. oct 2012;36(10):1562-70.
69. Chiang S, Lee C-H, Stewart CJR, Oliva E, Hoang LN, Ali RH, et al. BCOR is a robust diagnostic immunohistochemical marker of genetically diverse high-grade endometrial stromal sarcoma, including tumors exhibiting variant morphology. *Mod Pathol*. 2017;30(9):1251-61.

70. Lee C-H, Mariño-Enriquez A, Ou W, Zhu M, Ali RH, Chiang S, et al. The clinicopathologic features of YWHAE-FAM22 endometrial stromal sarcomas: a histologically high-grade and clinically aggressive tumor. *Am J Surg Pathol*. mai 2012;36(5):641-53.
71. Pautier P, Nam EJ, Provencher DM, Hamilton AL, Mangili G, Siddiqui NA, et al. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus review for high-grade undifferentiated sarcomas of the uterus. *Int J Gynecol Cancer*. nov 2014;24(9 Suppl 3):S73-77.
72. Meurer M, Floquet A, Ray-Coquard I, Bertucci F, Auriche M, Cordoba A, et al. Localized high grade endometrial stromal sarcoma and localized undifferentiated uterine sarcoma: a retrospective series of the French Sarcoma Group. *Int J Gynecol Cancer*. 2019;29(4):691-8.
73. Rauh-Hain JA, del Carmen MG. Endometrial stromal sarcoma: a systematic review. *Obstet Gynecol*. sept 2013;122(3):676-83.
74. Beck TL, Singhal PK, Ehrenberg HM, Rose PG, Lele SB, Krivak TC, et al. Endometrial stromal sarcoma: analysis of recurrence following adjuvant treatment. *Gynecol Oncol*. avr 2012;125(1):141-4.
75. Hemming ML, Wagner AJ, Nucci MR, Chiang S, Wang L, Hensley ML, et al. YWHAE-rearranged high-grade endometrial stromal sarcoma: Two-center case series and response to chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2017;145(3):531-5.
76. Serkies K, Abacjew-Chmyłko A, Wieczorek-Rutkowska M, Pęksa R. Aromatase inhibitor therapy for endometrial stromal sarcoma - two-centre experience. *Ginekol Pol*. 2018;89(11):607-10.
77. Yilmaz A, Rush DS, Soslow RA. Endometrial stromal sarcomas with unusual histologic features: a report of 24 primary and metastatic tumors emphasizing fibroblastic and smooth muscle differentiation. *Am J Surg Pathol*. sept 2002;26(9):1142-50.
78. Baker P, Oliva E. Endometrial stromal tumours of the uterus: a practical approach using conventional morphology and ancillary techniques. *J Clin Pathol*. mars 2007;60(3):235-43.
79. Hrzenjak A, Moinfar F, Tavassoli FA, Strohmeier B-, Kremser M-L, Zatloukal K, et al. JAZF1/JJAZ1 Gene Fusion in Endometrial Stromal Sarcomas. *J Mol Diagn*. août 2005;7(3):388-95.
80. Antonescu CR, Sung Y-S, Chen C-L, Zhang L, Chen H-W, Singer S, et al. Novel ZC3H7B-BCOR, MEAF6-PHF1, and EPC1-PHF1 fusions in ossifying fibromyxoid tumors--molecular characterization shows genetic overlap with endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. févr 2014;53(2):183-93.
81. Micci F, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Heim S. Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res*. 1 janv 2006;66(1):107-12.
82. Micci F, Brunetti M, Dal Cin P, Nucci MR, Gorunova L, Heim S, et al. Fusion of the genes BRD8 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(12):841-5.
83. Micci F, Gorunova L, Gatiús S, Matias-Guiu X, Davidson B, Heim S, et al. MEAF6/PHF1 is a recurrent gene fusion in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Lett*. 28 mai 2014;347(1):75-8.

84. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Gorunova L, Eibak AM, Bjerkehagen B, et al. Novel fusion of MYST/Esa1-associated factor 6 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39354.
85. Dewaele B, Przybyl J, Quattrone A, Finalet Ferreira J, Vanspauwen V, Geerdens E, et al. Identification of a novel, recurrent MBTD1-CXorf67 fusion in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Cancer*. 1 mars 2014;134(5):1112-22.
86. Lewis N, Soslow RA, Delair DF, Park KJ, Murali R, Hollmann TJ, et al. ZC3H7B-BCOR high-grade endometrial stromal sarcomas: a report of 17 cases of a newly defined entity. *Mod Pathol*. 2018;31(4):674-84.
87. Kommoss FK, Chang KT, Stichel D, Banito A, Jones DT, Heilig CE, et al. Endometrial stromal sarcomas with BCOR-rearrangement harbor MDM2 amplifications. *The Journal of Pathology: Clinical Research* [Internet]. [cité 28 mai 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjp2.165>
88. Lin DI, Hemmerich A, Edgerly C, Duncan D, Severson EA, Huang RSP, et al. Genomic profiling of BCOR-rearranged uterine sarcomas reveals novel gene fusion partners, frequent CDK4 amplification and CDKN2A loss. *Gynecologic Oncology*. 1 mai 2020;157(2):357-66.
89. Bantignies F, Cavalli G. Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. *Curr Opin Cell Biol*. juin 2006;18(3):275-83.
90. Choi J, Bachmann AL, Tauscher K, Benda C, Fierz B, Müller J. DNA binding by PHF1 prolongs PRC2 residence time on chromatin and thereby promotes H3K27 methylation. *Nat Struct Mol Biol*. déc 2017;24(12):1039-47.
91. Wang Z, Gearhart MD, Lee Y-W, Kumar I, Ramazanov B, Zhang Y, et al. A Non-canonical BCOR-PRC1.1 Complex Represses Differentiation Programs in Human ESCs. *Cell Stem Cell*. 1 févr 2018;22(2):235-251.e9.
92. Aisagbonhi O, Harrison B, Zhao L, Osgood R, Chebib I, Oliva E. YWHAE Rearrangement in a Purely Conventional Low-grade Endometrial Stromal Sarcoma that Transformed Over Time to High-grade Sarcoma: Importance of Molecular Testing. *Int J Gynecol Pathol*. sept 2018;37(5):441-7.
93. Zou Y, Turashvili G, Soslow RA, Park KJ, Croce S, McCluggage WG, et al. High-grade transformation of low-grade endometrial stromal sarcomas lacking YWHAE and BCOR genetic abnormalities. *Mod Pathol*. 21 avr 2020;
94. Jo V, D. M. Fletcher C. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology*. 1 févr 2014;46:95-104.
95. Mariño-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(3):335-41.
96. Allen AJ, Ali SM, Gowen K, Elvin JA, Pejovic T. A recurrent endometrial stromal sarcoma harbors the novel fusion JAZF1-BCORL1. *Gynecol Oncol Rep*. mai 2017;20:51-3.

97. Dickson BC, Childs TJ, Colgan TJ, Sung Y-S, Swanson D, Zhang L, et al. Uterine Tumor Resembling Ovarian Sex Cord Tumor: A Distinct Entity Characterized by Recurrent NCOA2/3 Gene Fusions. *Am J Surg Pathol*. févr 2019;43(2):178-86.
98. Brunetti M, Panagopoulos I, Gorunova L, Davidson B, Heim S, Micci F. RNA-sequencing identifies novel GREB1-NCOA2 fusion gene in a uterine sarcoma with the chromosomal translocation t(2;8)(p25;q13). *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(4):176-81.
99. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, et al. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol*. juin 2018;42(6):791-8.
100. Conklin CMJ, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification. *Adv Anat Pathol*. nov 2014;21(6):383-93.
101. Sumathi VP, Al-Hussaini M, Connolly LE, Fullerton L, McCluggage WG. Endometrial stromal neoplasms are immunoreactive with WT-1 antibody. *Int J Gynecol Pathol*. juill 2004;23(3):241-7.
102. Pujani M, Jairajpuri ZS, Rana S, Jetley S, Hassan MJ, Jain R. Cellular leiomyoma versus endometrial stromal tumor: A pathologists' dilemma. *J Midlife Health*. mars 2015;6(1):31-4.
103. Valkov A, Sorbye S, Kilvaer TK, Donnem T, Smeland E, Bremnes RM, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor are prognostic factors in soft tissue sarcomas. *International Journal of Oncology*. 1 avr 2011;38(4):1031-40.
104. Cassier PA, Lefranc A, Amela EY, Chevreau C, Bui BN, Lecesne A, et al. A phase II trial of panobinostat in patients with advanced pretreated soft tissue sarcoma. A study from the French Sarcoma Group. *Br J Cancer*. 20 août 2013;109(4):909-14.
105. Keung EZ, Burgess M, Salazar R, Parra Cuentas E, Rodrigues-Canales J, Bolejack V, et al. Correlative Analyses of the SARCO28 Trial Reveal an Association Between Sarcoma-Associated Immune Infiltrate and Response to Pembrolizumab. *Clin Cancer Res*. 3 janv 2020;
106. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*. 17 sept 2015;525(7569):389-93.
107. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne C-H, Germing U, et al. TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. *J Clin Oncol*. 20 avr 2012;30(12):1350-7.
108. Aj A, Nk D, T M, KJ F, J D, R M, et al. Leiomyoma with KAT6B-KANSL1 fusion: case report of a rapidly enlarging uterine mass in a postmenopausal woman. *Diagn Pathol*. 25 avr 2019;14(1):32-32.
109. Panagopoulos I, Gorunova L, Bjerkehagen B, Heim S. Novel KAT6B-KANSL1 fusion gene identified by RNA sequencing in retroperitoneal leiomyoma with t(10;17)(q22;q21). *PLoS ONE*. 2015;10(1):e0117010.
110. Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, et al. Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*. oct 1988;85(19):7084-8.

111. Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, et al. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol*. 24 août 2004;14(16):1436-50.
112. Meek SEM, Lane WS, Piwnica-Worms H. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem*. 30 juill 2004;279(31):32046-54.
113. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol*. juin 2006;16(3):162-72.
114. Young GM, Radhakrishnan VM, Centuori SM, Gomes CJ, Martinez JD. Comparative analysis of 14-3-3 isoform expression and epigenetic alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 30 oct 2015;15(1):826.
115. Liu T-A, Jan Y-J, Ko B-S, Liang S-M, Chen S-C, Wang J, et al. 14-3-3 ϵ Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*. 6 mars 2013;8(3):e57968.
116. Yang Y-F, Lee Y-C, Wang Y-Y, Wang C-H, Hou M-F, Yuan S-SF. YWHAE promotes proliferation, metastasis, and chemoresistance in breast cancer cells. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2019;35(7):408-16.
117. French CA. NUT midline carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. nov 2010;203(1):16-20.
118. Kenny C, McDonagh N, Lazaro A, O'Meara E, Klinger R, O'Connor D, et al. Dysregulated mitogen-activated protein kinase signalling as an oncogenic basis for clear cell sarcoma of the kidney. *The Journal of Pathology*. 2018;244(3):334-45.
119. Guizard M, Karanian M, Dijoud F, Bouhamama A, Faure-Contier C, Hameury F, et al. Neonatal Soft Tissue Sarcoma with YWHAE-NUTM2B Fusion. *Case Rep Oncol*. août 2019;12(2):631-8.
120. Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*. 4 mars 2002;156(5):817-28.
121. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*. 15 juill 2000;14(14):1810-23.
122. Wang Z, Gearhart MD, Lee Y-W, Kumar I, Ramazanov B, Zhang Y, et al. A non-canonical BCOR-PRC1.1 complex represses differentiation programs in human ESCs. *Cell Stem Cell*. 1 févr 2018;22(2):235-251.e9.
123. van den Boom V, Maat H, Geugien M, Rodríguez López A, Sotoca AM, Jaques J, et al. Non-canonical PRC1.1 Targets Active Genes Independent of H3K27me3 and Is Essential for Leukemogenesis. *Cell Reports*. 12 janv 2016;14(2):332-46.
124. Lanzuolo C, Orlando V. Memories from the polycomb group proteins. *Annu Rev Genet*. 2012;46:561-89.
125. Wong SJ, Gearhart MD, Taylor AB, Nanyes DR, Ha DJ, Robinson AK, et al. KDM2B recruitment of the Polycomb group complex, PRC1.1, requires cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure*. 4 oct 2016;24(10):1795-801.

126. Kenny C, Bausenwein S, Lazaro A, Furtwängler R, Gooskens SLM, van den Heuvel Eibrink M, et al. Mutually exclusive BCOR internal tandem duplications and YWHAE-NUTM2 fusions in clear cell sarcoma of kidney: not the full story. *J Pathol.* avr 2016;238(5):617-20.
127. Gooskens SLM, Furtwängler R, Vujanic GM, Dome JS, Graf N, van den Heuvel-Eibrink MM. Clear cell sarcoma of the kidney: a review. *Eur J Cancer.* sept 2012;48(14):2219-26.
128. 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.* 4 mars 2012;44(4):461-6.
129. Cupp JS, Miller MA, Montgomery KD, Nielsen TO, O'Connell JX, Huntsman D, et al. Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *Am J Surg Pathol.* juin 2007;31(6):970-6.
130. West RB, Rubin BP, Miller MA, Subramanian S, Kaygusuz G, Montgomery K, et al. A landscape effect in tenosynovial giant-cell tumor from activation of CSF1 expression by a translocation in a minority of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17 janv 2006;103(3):690-5.
131. Vougiouklakis T, Shen G, Feng X, Hoda ST, Jour G. Molecular Profiling of Atypical Tenosynovial Giant Cell Tumors Reveals Novel Non-CSF1 Fusions. *Cancers (Basel).* 31 déc 2019;12(1).