

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Blida-1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de biologie et physiologie cellulaire



Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Génétique

Sous le thème :

***Intérêt de l'hybridation in situ chromogénique (CISH)
pour la détection de statut MDM2 dans les tumeurs
adipeuses des tissus mous***

Soutenu le : 27/09/2020

Présenté par : Mlle SAMEUT Chaimaà Ikram et Mlle FERR Khedidja

Devant le membre jury :

- **Présidente :** Mme Benazouz F. MAA/Université de Blida-1
- **Examinatrice :** Mme ChabaneD. MAA/Université de Blida-1
- **Promoteur :** Mr Kassa Reda MCB/CHU Douera
- **Co-promotrice :** Mme Mokrane A. MCB/Université de Blida-1

2019/2020

Remerciements

*Avant tout, nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.*

Nous remercions très vivement les membres du jury :

***Mme Benazouz F.**, maître assistante A à la faculté des sciences de la nature, université Saad Dahleb, Blida-1, qui nous a fait l'honneur d'avoir bien voulu présider le jury.*

***Mme Mme Chabane D.**, maître assistante A à la faculté des sciences et de la nature, université Saad Dahleb, Blida-1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos profonds remerciements s'adressent à notre promoteur **Dr. KASSA Reda**, maître de conférences B, CHU Douera, merci pour l'encadrement exemplaire que vous nous avez accordé, votre disponibilité, vos précieux conseils et efforts et vos qualités humaines.*

*Nous remercions **Mme Mokrane Ahlem** maître de conférences B à la faculté des sciences et de la nature, université Saad Dahleb, Blida-1, qui a été en copromotion. Merci madame pour votre aide, soutien et précieux conseils.*

Une pensée particulière pour tous nos chers collègues de la promotion, avec qui on a partagé trois ans pleins de beaux souvenirs. Nous souhaitons pour eux une bonne continuation dans le cursus scientifique et la vie professionnelle.

Merci à tous,

Dédicace

Je dédie ce modeste travail avec les sentiments d'amour et de gratitude les plus précieux :

*A mes grandes mères **FATMA** et **ZAHRA** ma source d'amour et de fierté Que Dieu les protège de tout mal,*

*A celle qui m'a donné la vie et l'amour : **MA MÈRE***

*Et à qui j'ai toujours la tête haute disant c'est : **MON PÈRE**,*

Merci pour votre présence au bon et mauvais moment, votre soutien et sacrifices

C'est qu'a vous que je dois toute ma vie et mes réussites, je vous aime très fort.

*À mes chers frères **AMINE** et **LOUAL**, mes sœurs **ASMA**, **AYA**, et **WALAA***

*Ma belle-sœur **LEILA** et ma petite nièce **OUMNIA***

A toute ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines

*Particulièrement ma belle tante **RATIBA** pour m'avoir aidé au premier pas,*

*A mes meilleures amies **SERINE**, **FATIMA**, **NARIMANE**, **ASMA**, **KAHINA**, **WISSEM**, **RADIA**
ET NESRINE*

*Vous êtes mes sœurs avant d'être amies, ma source de confiance, d'encouragement et de joie. Tous les mots me manquent sauf un : gros **MERCI** du fond du cœur.*

*Au Team-labo : **ZEHOR**, **AHLEM**, **CHAIMA**, **MOHAMED** et **SIDALI** avec qui j'ai partagé de très bons souvenirs, et particulièrement **MR. ZAIBEK** et **MME KHIREDDINE** pour son accueil exemplaire et professionnel.*

A mes amis d'option génétique.

*Enfin à la mémoire de ma grand-mère **YAMINE** qui nous a quitté à un moment inattendu que dieu bénisse ton âme « **Lalla** ».*

Chaima à Ikram.

Dédicace

A mes chers parents qui m'ont donné toutes les belles choses :

Existence, amour, tendresse, confiance, qui ont partagé avec moi toutes mes instants de joie et de tristesse, qui m'ont soutenue dans toutes les circonstances de ma vie, qui m'ont toujours épaulé, aidé, orienté, vers les bons sens.

*A mes frères et sœurs : **Abderrahim, Abdeldjallil et Sara.***

Et à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Khedidja,

Liste des figures

Figure 1. a : Dessin d'un adipocyte blanc ; b : Coupe d'un tissu adipeux blanc grandissement X400, coloration de l'hématine-éosine	2
Figure 2. Anatomie du tissu adipeux	2
Figure 3. Fonction de l'adipocyte.....	3
Figure 4. Schéma récapitulatif des lésions avec composantes adipeuses.....	4
Figure 5. Diagramme des anomalies chromosomiques caractérisant le lipome.....	5
Figure 6. Schéma de la rétroaction négative de p53 / MDM2.....	9
Figure 7. Structure du gène MDM2 et de la protéine.....	10
Figure 8. La régulation transcriptionnelle de MDM2.....	11
Figure 9. Principaux variants de MDM2.....	11
Figure 10. Diagramme schématique montrant les fonctions des différentes paires de CDK-cycline dans les différentes phases du cycle cellulaire	13
Figure 11. Rôle de complexe cycline/Cdk et la voie cyclineD-CDK4/6-p16-RB dans le cycle cellulaire.....	14
Figure 12. Mécanisme d'action de MDM2 et CDK4 favorisant la survie cellulaire.....	15
Figure 13. Structure du gène et de la protéine P53.....	15
Figure 14. MDM2 régule la réponse de P53 aux dommages à l'ADN	16
Figure 15. Régulation de P53 par MDM2 et MDMX	17
Figure 16. Protocole expérimental.....	18
Figure 17. Schéma explicatif des différentes étapes de la coloration.....	18
Figure 18. Protocole de l'hybridation in situ chromogénique (CISH).....	19
Figure 19. Photomicrographie colorée à l'hématoxyline-éosine de la section de tissu adipeu.	23
Figure 20. Principe générale de l'immunohistochimie.....	24
Figure 21. Photomicrographie de l'immunohistochimie de l'oncogène MDM2 de biopsie de liposarcome dédifférencié.	25
Figure 22. Principe de l'hybridation <i>in situ</i> fluorescente	27
Figure 23. Photomicrographie sur champs sombre de la FISH-MDM2 d'une section de tissu adipeux.....	27
Figure 24. Photomicrographie de la MDM2-CISH dans une section de tumeurs lipomateuses présente une forte amplification de MDM2 (Signal rouge).....	28

Figure 25. Principe général de l'hybridation <i>in situ</i> chromogénique (CISH).....	29
Figure 26. (A) Lipome et (D) liposarcome myxoïde avec amplification MDM2 négative comme démontré par FISH (B, E) et CISH (C, F), respectivement. A et D, hématoxyline et éosine, 40 ×. C et F, CISH, 100 ×.....	31
Figure 27. ALT-WDLPS (A) et DDLPS (D) avec une amplification MDM2 positive démontrée par FISH (B, E) et CISH (C, F), respectivement. A et D, hématoxyline et éosine, 40 ×. C et F, CISH, 100x..	31
Figure 28. Photomicrographies de MDM2-FISH (1A ; 1B) et MDM2-CISH (1C ; 1D).....	32
Figure 29. Métastase pulmonaire de DDLPS H/63 ans (cas 7).....	34

Liste des tableaux

Tableau I. Classification de l’OMS des tumeurs des tissus mous, 2020.....	4
Tableau II. Présentation de la nature des données	20
Tableau III. Les avantages et les inconvénients de l’immunohistochimie.....	25
Tableau IV Avantages et inconvénients de la FISH.	28
Tableau V. Les résultats d’amplification du gène MDM2 par la CISH.	30

Liste des abréviations

AG :Acide Gras

AGL :Acide Gras Libre

ALT: Atypical lipomatous tumor

AP: Alkaline phosphatase

CDK: Cycline Dependent Kinase

CGH :Comparative génomicHybridization

CHR12: Chromosome 12

CISH : Chromogenic *in situ* hybridization

CEN12: Centromère 12

DDLPS :Di-differentiated liposarcoma

DDISH : Dual-color ,dual-hapten *in situ* hybridization

DIG: Digoxigenine

DNP: Dinitrophenyl

EDTA: Ethylène Diamine-Tétra Acétique

FAS :Fatty Acid Synthase

FISH: Fluorescence *In Situ* Hybridization

HIS: Hybridation *In Situ*

HMGA2:High mobility groupA2

HRP: Horseradish Peroxidase

LDL : Low Density lipoprotein

LHS :Lipase Hormono-Sensible

LPL : Lipoprotéine Lipase

MDM2 : Murine Double Minute 2

MEC :Matrice extracellulaire

MLPS :Myxoïde liposarcoma

NES : Nuclear exportation signal

NLS :Nuclear signal de localisation

NoLS : Nuclear localization signal

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

P53-RE : P53-reponse Element

RING : Really Interesting Novel Gene

TG : Triglycéride.

WDLP :Well differentiated liposarcoma

Résumé

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de l'hybridation *in situ* chromogénique (CISH) pour la détection de l'amplification de gène MDM2 dans les tumeurs de tissu adipeux. On a procédé à l'hybridation *in situ* chromogénique pour la détection de l'amplification sur des coupes histologiques de tissus fixés au formol 10% et inclus dans la paraffine en utilisant des sondes ou petites séquences complémentaires au gène ciblé. Les sondes utilisées sont sous contrôle centromérique ZytoDot[®] SPEC MDM2/CEN 12 Probe Kit marquées à la DIG/DNP respectivement et révélée par une réaction d'anti-anti-corps conjugué à la HRP-Green et AP-red source de signal observé au microscope optique (MDM2/vert, CEN12/rouge). L'évaluation de l'intérêt de l'utilisation de la CISH est fondée sur des anciens travaux dans la littérature, qui ont été basés sur la comparaison entre la CISH et la FISH (hybridation *in situ* fluorescente). Les résultats obtenus présentent une concordance excellente de 98% et une sensibilité et spécificité déduite à 100% et 83.3%, respectivement. Ce qui a validé la CISH comme une technique moins exigeante, plus pratique, fiable et applicable, pour la détection de l'amplification du gène MDM2 et le diagnostic différentiel entre les lipomes (bénignes) et les liposarcomes (malignes).

Mots clés : Tissu adipeux, lipome, liposarcome, hybridation *in situ* chromogénique CISH, hybridation *in situ* fluorescente FISH, MDM2, CEN12.

Abstract

The main objective of this study is to assess the value of the use of chromogenic *in situ* hybridization (CISH) for the detection of MDM2 gene amplification in adipose tissue tumors. Chromogenic *in situ* hybridization was performed for the detection of amplification on histological tissues sections fixed in formol 10% and embedded with paraffin, using probes that are small sequences complementary to the target gene. The probes used are under centromeric control “ZytoDot ® SPEC MDM2 / CEN 12” Probe Kit labeled with DIG / DNP respectively and revealed by a reaction of anti-antibody conjugated to HRP-Green and AP-red. Signal source were observed by using optical microscope (MDM2 / green, CEN12 / red). The assessment of The evaluation of the relevance of the use of the CISH is based on old work in the literature, which were based on the comparison between CISH and FISH (fluorescent *in situ* hybridization). The results obtained show an excellent agreement of 98% and a sensitivity and specificity deduced at 100% and 83.3%, respectively. Which validated the CISH as technic less demanding, more practical, reliable and applicable, for the detection of the amplification of the MDM2 gene and the differential diagnosis between lipomas (benign) and liposarcomas (malignant).

Key words: adipose tissue, lipoma, liposarcoma, chromogenic *in situ* hybridization CISH, fluorescent *in situ* hybridization FISH, MDM2, CEN12

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم استخدام التهجين اللوني الموضعي (CISH) للكشف عن تضخيم الجين MDM2 في أورام الأنسجة الشحمية. تم إجراء التهجين الموضعي للكشف عن التضخيم على المقاطع النسيجية المثبتة في الفورمول بنسبة 10% و المدمجة في البرافين, وهذا باستخدام مسابير التهجين المتمثلة في قطع صغيرة مكملة للجين المستهدف. المسابير المستخدمة تخضع للتحكم المركزي "ZytoDot® SPEC MDM2 / CEN 12 Probe Kit" الموسومة بـ / DIG DNP على التوالي والذي تم الكشف عنه من خلال تفاعل الأجسام المضادة المرتبطة ب HRP-Green و AP-red. تمت ملاحظة مصدر الإشارة باستخدام المجهر البصري (MDM2 / الأخضر، CEN12 / الأحمر). و تم تقييم أهمية استخدام تقنية CISH بالإعتماد على تجارب سابقة والتي استندت إلى المقارنة بين CISH و FISH (التهجين الفلوري الموضعي). و قد أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها توافقا بنسبة 98% (وحساسية وخصوصية بنسبة 100% و 83.3% على التوالي. مما يثبت قيمة تقنية CISH باعتبارها تقنية أقل تطلبا، وأكثر عملية، ويمكن الاعتماد عليها و تطبيقها للكشف عن تضخيم جين MDM2 والتشخيص التفاضلي بين ورم الشحمي الحميد و الخبيث.

الكلمات المفتاحية: نسيج شحمي، ورم شحمي حميد، ورم شحمي خبيث، التهجين اللوني الموضعي CISH، التهجين الفلوري الموضعي FISH, MDM2, CEN12.

Table de matière

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction générale.....1

Partie bibliographique 2

I. Tissu adipeux..... 2

I.1 Anatomie de tissu adipeux 2

I.2 Fonctions du tissu adipeux 3

I.3 Tumeurs de tissu adipeux 3

I.3.1 Lipome 5

I-3-2. Liposarcome (lésions malignes)..... 6

A. Liposarcome bien différencié (WDLPS)..... 6

B. Les liposarcomes dédifférenciés (DDLPS)..... 8

II. L'oncogène MDM2..... 9

II .1. Régulation transcriptionnelle de p53 : 11

II .2. MDM2 et tumeurs de tissu adipeux : 12

II .2-1. Rappel sur le cycle cellulaire et son contrôle 12

II .2.2. MDM2 et Contrôle du cycle cellulaire : 14

II .3. Les fonctions de MDM2 : 15

II .3.1. Régulateur de P53 : 15

II .3.2. MDMX homologue de MDM2 : 17

Matériel et méthodes 18

1. Protocole expérimentale..... 18

1I. Les données bibliographiques..... 20

1I.1. Nature des données 20

1I.2. Les critères d'inclusion et d'exclusion..... 21

III. Présentation des données.....23

III.1. Les techniques.....23

III.1.1. Les technique histologique.....23

III.1.2. Méthodes de biologie moléculaire24

Résultats et discussion23

II. Présentation des résultats.....29

II.1. Les résultats de l'amplification de statut MDM2	29
II.2. Interprétation des résultats microscopiques.....	31
III. Discussion	33
Conclusion	39
Reference	
Annexe	

Introduction

Les tissus mous entourent, protègent, soutiennent et relient les organes et autres parties du corps ; ils peuvent aussi emmagasiner l'énergie. Il y a de nombreux types de tissus mous dont : la graisse, les muscles, les tissus fibreux, les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les nerfs. Les tissus mous peuvent être le siège de nombreuses tumeurs bénigne, maligne ou parfois de malignité intermédiaire. Les sarcomes des tissus mous sont des tumeurs rares représentant 1% de toutes les tumeurs malignes solides ((**Mehdi et al., 2017 ; Asif et al., 2018**). La classification de ces tumeurs est fondée sur leur organe ou tissu d'origine, leur type histologique, et leur degré de malignité (**Creytens, 2019**). Les tumeurs adipeuses présentent deux sous-groupes principales : les tumeurs bénignes avec une incidence annuelle de 3000cas / 1 million, et les tumeurs malignes d'incidence de 50cas/ 1 million (**OMS, 2020**). La classification OMS 2020 des tumeurs des tissus mous distingue plusieurs entités à différenciation adipeuse .Le diagnostic différentiel se pose parfois entre lipome et liposarcome. L'oncogène MDM2 code une E3 ubiquitine ligase, son rôle principal est la régulation négative de la protéine P53, son amplification est observée dans plusieurs tumeurs (**Feely, 2017**).

A travers une étude théorique basée sur la littérature scientifique référencée, nous proposons :

- Etudier l'amplification de l'oncogène MDM2 comme marqueur des tumeurs adipeuses.
- De montrer les avantages de la CISH par apport au FISH (une étude comparative).
- L'étude des essais réalisés par des groupes de chercheurs pour s'assurer la fiabilité de la CISH.
- Une discussion des cas de ces essais.

Les objectifs visés dans cette étude sont de mettre en évidence le rôle du MDM2 et son intérêt dans le diagnostic des tumeurs mésenchymateuses : liposarcome (malin) versus lipome (bénin), et l'évaluation l'intérêt de l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ* chromogénique (CISH).

Partie bibliographique

I. Tissu adipeux

Le tissu adipeux est un ensemble de cellules adipocytaires serrées les unes contre les autres qui stockent des graisses (Ray, 2018). Le noyau des adipocytes est repoussé sur le bord à cause de la présence d'une vacuole lipidique qui occupe la partie majeure du cytoplasme.

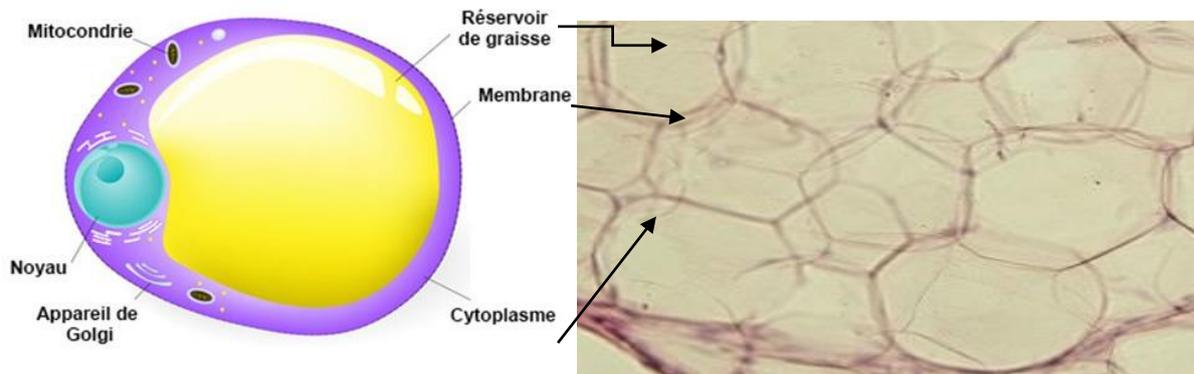


Figure 1. a : Dessin d'un adipocyte blanc ; b : Coupe d'un tissu adipeux blanc grandissement X400, coloration de l'hématine-éosine (Servais, 2018).

I.1 Anatomie de tissu adipeux

Il existe 2 types de tissus adipeux :

- Le tissu adipeux blanc : uniloculaire, on distingue entre le tissu adipeux blanc sous-cutané et le tissu adipeux blanc viscéral.
- Le tissu adipeux brun : multiloculaire, commun chez les nouveau-nés (Marcelin et al., 2018).

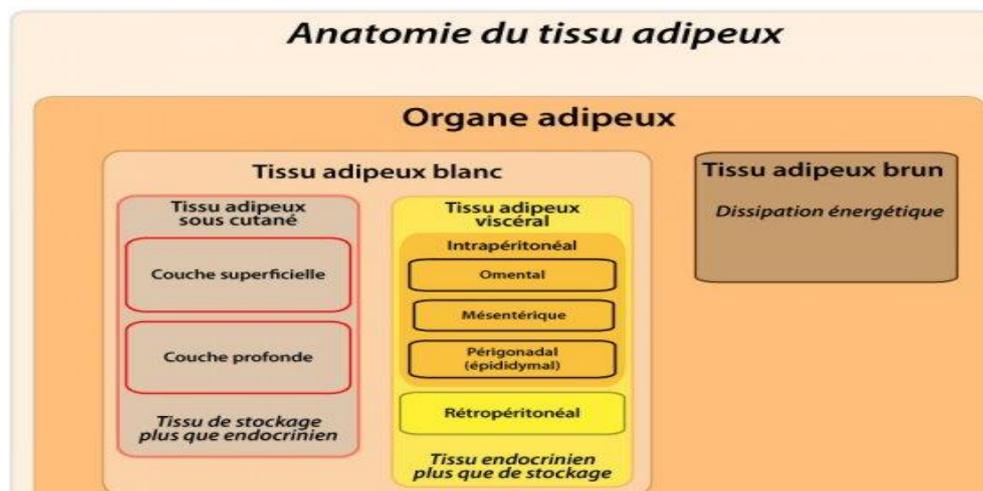


Figure 2. Anatomie du tissu adipeux (Chignon-Sicard, 2018).

I.2 Fonctions du tissu adipeux

L'adipocyte est l'élément central impliqué dans les voies de mobilisation (lipolyse) et de stockage (lipogénèse) des triglycérides dans le tissu adipeux. La lipolyse est contrôlée par la LHS (lipase hormono-sensible) alors que le stockage dépend de la synthèse locale d'acides gras et de la captation des acides gras des triglycérides circulants d'origine endogène ou exogène (Marcelin et *al.*, 2018).

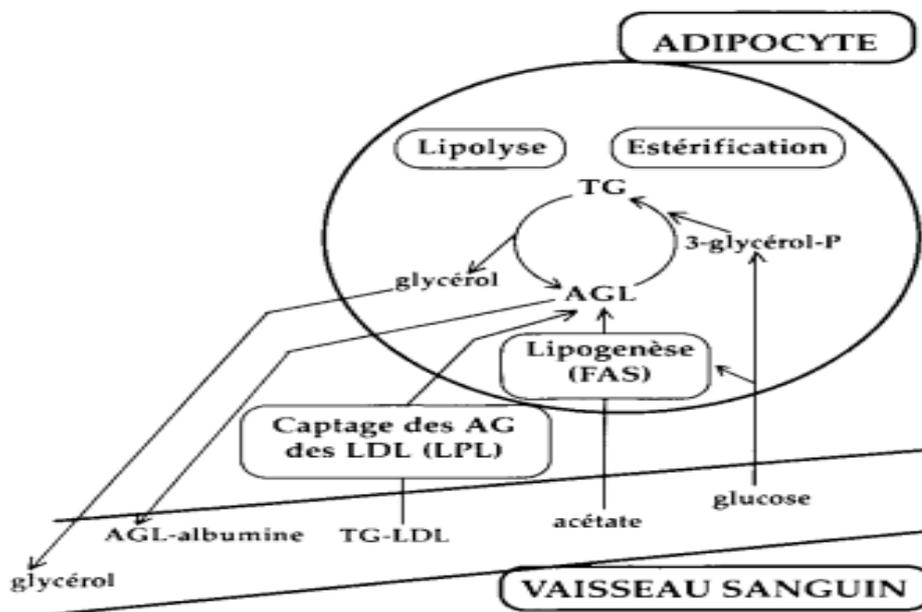


Figure 3. Fonction de l'adipocyte (Trayhurn et *al.*, 2001).

I.3 Tumeurs de tissu adipeux

Selon la classification de l'OMS (organisation mondiale de la santé) 2020, La classification des tumeurs est fondée sur leur organe ou tissu d'origine, leur type histologique, et leur degré de malignité. Le diagnostic est fondé sur l'histologie, mais fait de plus en plus souvent appel à des techniques complémentaires telles que l'immunohistochimie, la cytogénétique et la biologie moléculaire.

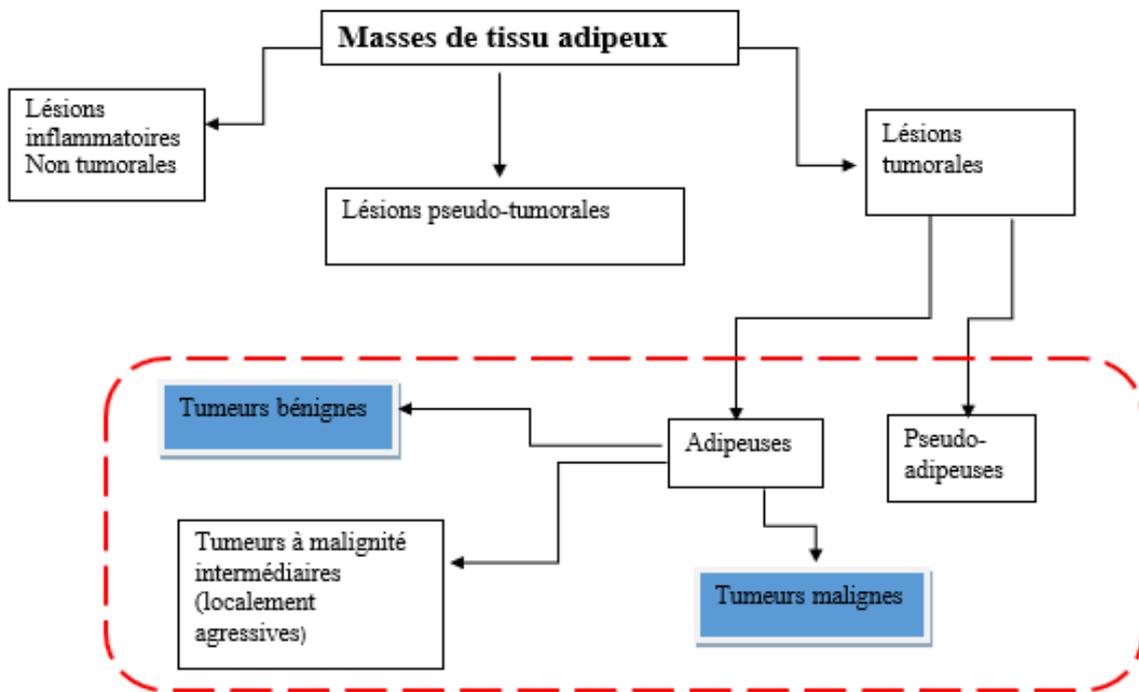


Figure 4. Schéma récapitulatif des lésions avec composantes adipeuses (OMS, 2013).

La classification de l'OMS 2020 distingue :

Tableau I. Classification de l'OMS des tumeurs des tissus mous, 2020.

Tumeurs bénignes	Tumeurs intermédiaires	Tumeurs malignes
<ul style="list-style-type: none"> - Lipome NOS. - Lipomatose. - Lipomatose du nerf. - Lipoblastomatose. - Angiolipome NOS. - Myolipome. - Lipome chondroïde. - Lipome a cellules fusiformes. - Cellule fusiforme atypique/tumeur lipomateuse pléomorphe. - Hibernome. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur lipomateuse atypique. 	<ul style="list-style-type: none"> - Liposarcome bien différencié, NOS. - Liposarcome dédifférencié. - Liposarcome myxoïde. - Liposarcome pléomorphe. - Liposarcome pléomorphe myxoïde.

I.3.1 Lipome

Les lipomes sont des tumeurs bénignes composées des adipocytes matures, formant des masses encapsulées semblable à la graisse sous-cutanée. Pouvant mesurer entre 5 à 20 cm de diamètre, parfois plus ; siégeant le plus souvent au niveau de la partie haute du dos, l'abdomen et aux épaules. Les majorités sont superficiels (dans les régions sous-cutanées). Les lipomes profonds (entre les muscles ou dans les régions profondes) et les intramusculaires (entre les muscles) sont moins fréquents. Le lipome atteint essentiellement l'adulte de sexe masculin, et associés à l'obésité. (McTighe et al.,2014)

a. cytogénétique

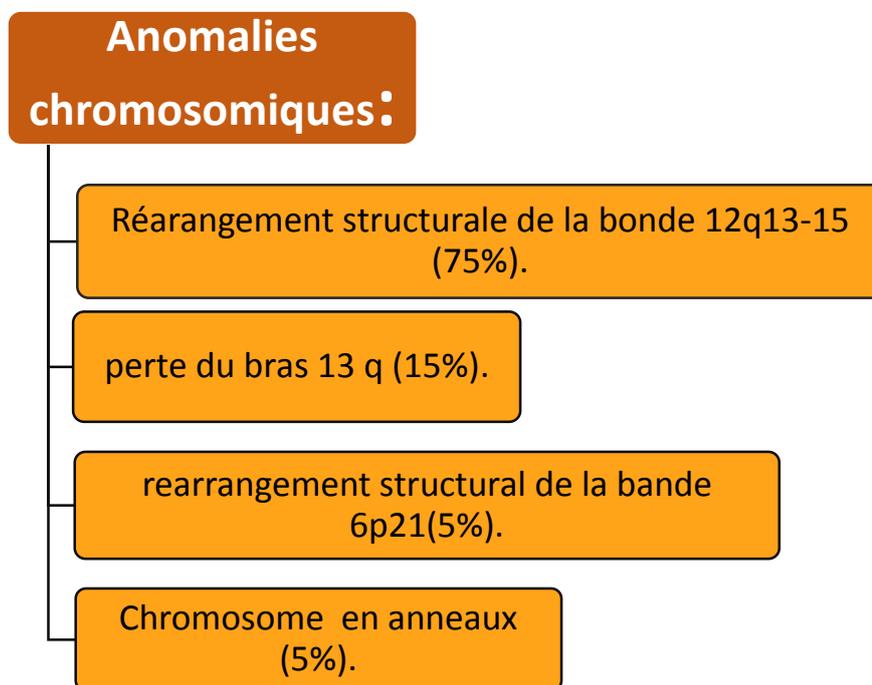


Figure 5. Diagramme des anomalies chromosomiques caractérisant le lipome (OMS 2020).

b. Pathogénèse et génétique moléculaire

HMGA2 qui codant pour un facteur de transcription architectural qui a un rôle dans le cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose (Zhang et al.,2019).Les réarrangements chromosomiques de 12q affectent le gène (cassure produit sur l'intron 3) résulte une protéineHMGA2 tronquée qui contribue au développement de lipome.

c. Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique présente une tumeur bien circonscrite de couleurs jaunâtre présentant des foyers blancs de nécroses avec des tailles variables selon leur localisation superficielle (<5cm) ou profond (>20 cm).

d. Histopathologie

L'examen histologique révèle une prolifération lipomateuse bien différente, caractérisée par:

- Adipocytes matures.
- Des septas fibreux paucicellulaires.
- Infiltration dans l'environnement.
- Absence des cellules stromales hyperchromosomiques atypiques.
- Présence des nodules. (**Karen et al., 2012**)

e. Cytologie

Les adipocytes contenant une seule grosse gouttelette lipidique avec un bord comprimé de cytoplasme et un noyau aplati discret.

I-3-2. Liposarcome (lésions malignes)

Le liposarcome débute par l'apparition d'une masse souvent polylobé peu douloureuse sous la peau qui grossit plus ou moins rapidement. Cependant, au stade avancé, le liposarcome est particulièrement agressif, notamment lorsque les masses sont profondes (intra ou intermusculaire, rétropéritonéale) et mesurent plus de 5 cm (**Fletcher, 2006**).

Selon les critères fondés par l'OMS en 2020 on distingue :

A. Liposarcome bien différencié (WDLPS)

Les WDLPS ou lipome atypique (ALT) sont des néoplasmes mésenchymateux localement agressifs, se manifeste comme une masse profonde indolore qui grossissent lentement et peut atteindre une très grande taille.

a. Épidémiologie

Les WDLPS présentent le plus grand sous-groupe des liposarcomes avec incidence de 40% à 45% des liposarcomes. Ils surviennent chez le sujet adultes (quatrième et cinquième décennies de la vie), et très rare chez les enfants.

b. Pathogénèse

Le caryotype des WDLPS est caractérisé par un chromosome en anneau surnuméraire et un marqueur géant qui contiennent des séquences amplifiées provenant de la région 12q14-q15 dont MDM2 (12q15), Cdk4 (12q14.1) et HMGA2 (12q14.3). Ainsi des associations télomériques. Plus de la région 12q14-15 elles contiennent toujours au moins un autre segment co-amplifié qui le plus fréquent le 1q2-q25.

c. Aspect macroscopique

Les WDLPS apparaissent bien circonscrits et lobulés avec variable consistance dépend de la proportion de fibres et composants myxoïdes.

d. Histopathologie

Les critères morphologiques sont essentiels pour le diagnostic des WDLPS et les subdivisent en trois sous-types :

- **Liposarcome Lipoma-like** : composé d'adipocytes matures de taille variable avec une atypie nucléaire dans les cellules stromales et graisseuses
- **Liposarcome sclérosant** : présence de cellules stromales bizarres avec une hyperchromasie nucléaire marquée placées dans un fond sclérotique fibrillaire, ainsi la présence des lipoblastes multivacuolés.
- **Liposarcome inflammatoire** : un infiltrat inflammatoire à prédominance adipo-cytaire. Ou la présence des cellules stromales multi-alimentées bizarres.

e. Diagnostic moléculaire

Dans les cas difficiles ou sélectionnés un bilan moléculaire dont l'expression nucléaire de MDM2 (et /ou CDK4) par immunohistochimie ou preuve de l'amplification des gènes MDM2 et CDK4 par hybridation chromosomique.

e. Pronostic et prédiction

Le WDLPS ne présente pas de potentiel de métastase. La localisation anatomique présente le facteur pronostique le plus important. La chirurgie est recommandée dans les régions où une résection chirurgicale complète est curative, contrairement aux tumeurs de parties profondes telles que le rétropéritoine qui ont tendance à réapparaître et provoquer la mort à cause d'effets de propagation locale incontrôlée.

B. Les liposarcomes dédifférenciés (DDLPS)

a. Pathogenèse

On peut définir un DDLPS comme un ALT / WDLPS montrant une progression. Ils apparaissent le plus souvent dans le rétropéritoine et plus rarement dans le cordon spermatique, tête et cou et médiastin. Les DDLPS sont caractérisés par l'amplification de MDM2 et CDK4 (12q14-21) avec co-amplification d'autre gène de cette région, les amplicons sont situés dans un chromosome en anneaux surnuméraire et marqueurs géants avec des néocentromères. La séquence (6q21-24) est aussi notée co-amplifiée avec d'autres gènes dont JUA, MAP3K5, TERT, CPM. Ces gènes sont liés à l'histologie. D'autres modifications génétique liées à la complexité génomique du DDLPS sont aussi observé dont la délétion de ATRX (30% des cas) ; perte de la région 11q22-24 (ATM, CHEK1, ZBTB16, PPP2R1B, ET EI24) (OMS,2020).

b. Examen macroscopique

Les DDLPS sont caractérisés par des grandes masses jaunes multinodulaires contenant des zones non lipomateuses discrètes, solide, souvent gris clair avec présence des nécroses.

c. Histopathologie

La caractéristique histologique du DDLPS est la transition de l'ALT / WDLPS à un sarcome non lipogène. Caractérisés par la présence des cellules fusiforme fibroblastique uniforme avec une atypie nucléaire légère, organisés selon un schéma fasciculaire et présentent une cellularité intermédiaire. L'immunohistochimie sert à confirmer de différenciation ainsi l'expression nucléaire de MDM2 (CDK4) fait l'objet.

d. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire est réalisé afin de détecter l'amplification du gène MDM2 par hybridation chromosomique et génomique comparative ou son expression par immunohistochimie.

e. Pronostic et prédiction

DDLPS est caractérisé par une récurrence locale ou des métastases à distance, le facteur pronostique le plus important est la localisation anatomique, avec lésions rétro-péritonéales présentant le pire comportement clinique.

II. L'oncogène MDM2

L'oncogène MDM2 code une E3 ubiquitine ligase (pour la dégradation protéasomique) joue un rôle de régulateur négatif de P53 via une boucle de rétroaction négative dans laquelle TP53 active la transcription du gène MDM2, son amplification ou surexpression est observé dans plusieurs tumeurs (Feely, 2017). Oliner et al.(1992)sont les premiers qui ont découvert ce gène chez une lignée cellulaire BALB/c3T3 de souris spontanément transformés (3T3_DM) Il est roté sur des petits corps acentromèresnucléaires extrachromosomique appelé double minute d'où son nom murin double minute2(Hou et al., 2019). Le gène MDM2 est localisé sur le chromosome 12q15, une région fréquemment amplifiée dans le cancer humain.(Mendoza, 2014).

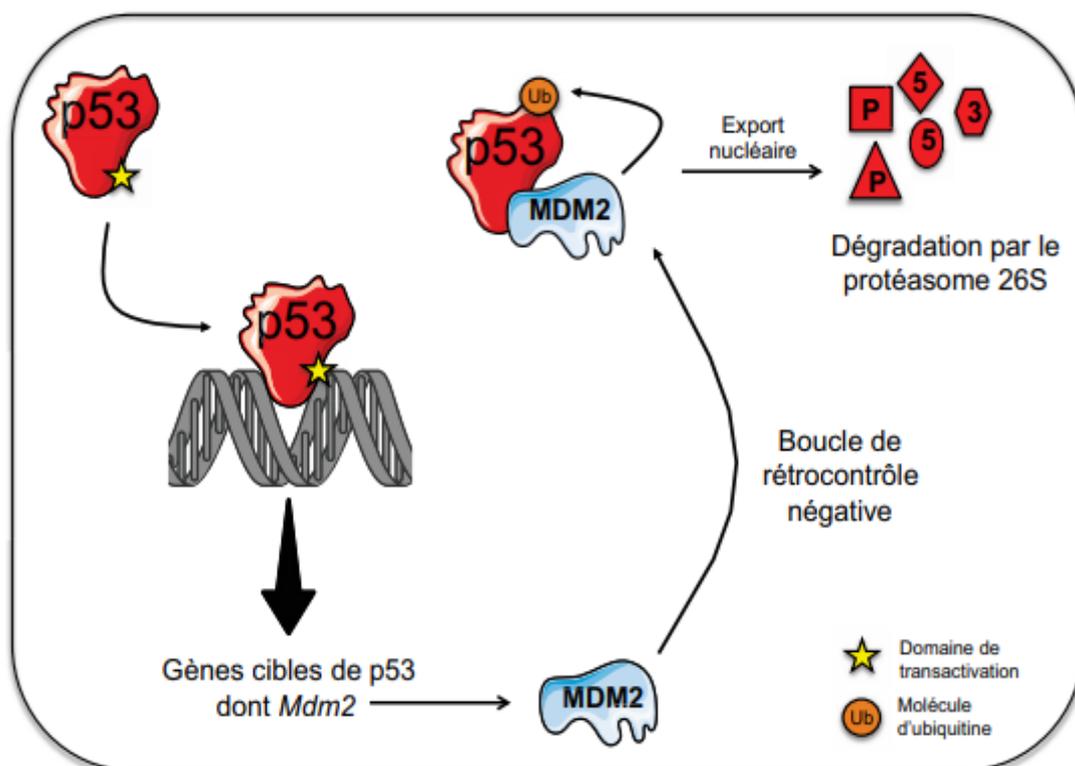


Figure 6. Schéma de la rétroaction négative de p53 / MDM2 (Riscale, 2016).

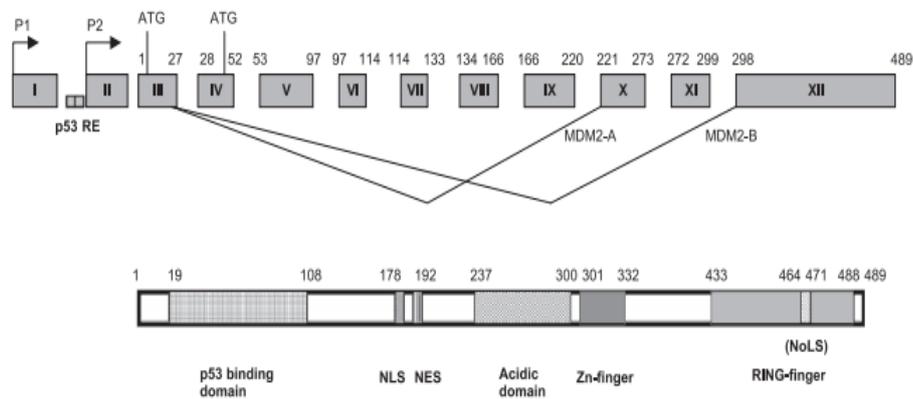


Figure 7. Structure du gène MDM2 et de la protéine (Iwakuma et al., 2003).

Le gène MDM2 se compose de 12 exons et de deux éléments sensibles à p53 (p53 RE) dans l'intron 1. Deux promoteurs P1 et P2 dont le deuxième comporte un élément de réponse de P53 (ncbi Genbank) génèrent de poids moléculaire différent dont p90 et p76 cette dernière ne comporte pas de domaine de liaison à la protéine P53 et peut agir comme un inhibiteur de p90 (Naski et al., 2009).

La protéine MDM2 est protéine ubiquitaire constituée de 491 acides aminés et du poids moléculaire apparent de 90 kDA (Riscal, 2016) caractérisée par 4 domaines principales hautement conservées : le domaine N-terminale qui est le domaine de liaison à P53, le domaine acide centrale (riche en acides aminés acides), le domaine en doigt de zinc, ainsi le domaine RING en C-terminale contenant le domaine de liaison E3 ligase (Tan et al., 2017). De plus de motifs conférant sa localisation subcellulaire : NLS et NoLS pour signal de localisation nucléaire, NES pour le signal d'exportation nucléaire.

II.1 Régulation transcriptionnelle de MDM2

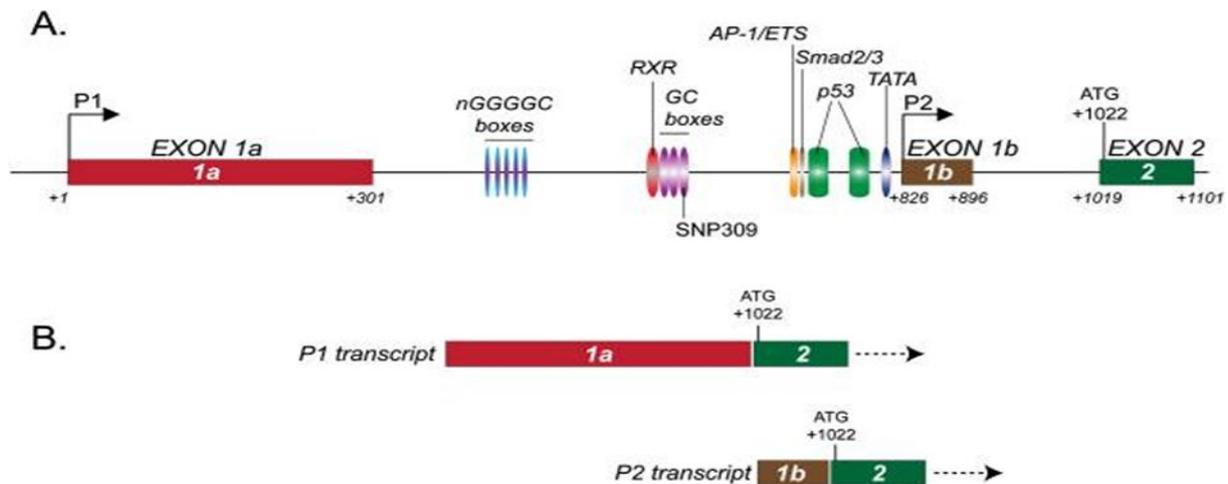


Figure 8. La régulation transcriptionnelle de MDM2 (Manfredi, 2010).

La transcription de gène MDM2 génère deux transcrits différents dont le 1er est le transcrit P1 contrôlé par le promoteur P1 et le transcrit P2 sous contrôle de promoteur P2 situé en aval régulé par la protéine P53 et d'autres facteurs de transcription (RXR, AP-1, la famille Ets, Smad2 et Smad3) (Manfredi, 2010). Ces deux promoteurs ont deux protéines de poids moléculaire différents dont p90 et p76 cette dernière ne comporte pas de domaine de liaison à la protéine P53 et peut agir comme un inhibiteur de p90 (Naski et al., 2009). D'autres protéines tronquées peuvent être générées par différents événements d'épissage alternatif qui ne comportent pas de domaine de liaison à la protéine p53 aussi mais contiennent le domaine E3 ligase qui peuvent interagir avec la protéine MDM2 (P90) et inhiber son interaction avec la protéine P53, ils sont observés souvent surexprimés dans les cancers (Zheng et al., 2013).

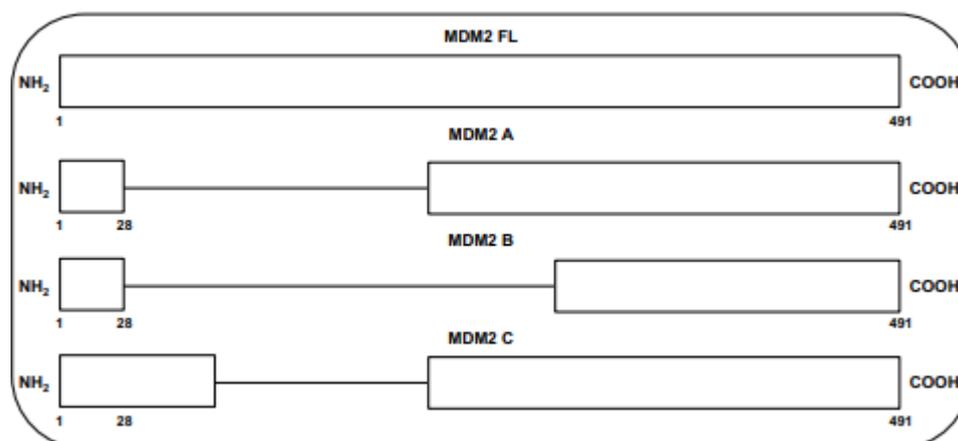


Figure 9. Principaux variants de MDM2 (Riscal, 2016).

II.2MDM2 et tumeurs de tissu adipeux

Comme décrit avant L'amplification de MDM2 est le caractéristique principale définissant la différenciation maligne des tumeurs adipeuses notamment ALT/WDLPS et DDLPS. La Protéine MDM2 a un impact principal sur la régulation de la survie cellulaire en diminuant le taux d'apoptose et favorisant la progression cellulaire incontrôlée (inhibition de P53).

II.2.1 Rappel sur le cycle cellulaire et son contrôle

A. Rappel sur le cycle cellulaire et sa régulation :

Le cycle cellulaire se déroule en deux principales phases :

- **L'interphase** : où la cellule se développe et fait copie son ADN, elle est composée de deux phases de croissance G1 et G2 (pour Gap1 et 2) séparées par une phase de synthèse qui la phase S.
- **La phase M** : le noyau puis le cytoplasme se divisent, elle est divisée en 5 étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase (**Schmucker et al.,2014**).

La progression de la cellule durant les phases nécessite le passage des points décisifs (contrôle) sous actions des Cycline et CDK spécifique pour chaque transition :

- **Un point de restriction en G1** : en fonction de présence ou d'absence des facteurs de croissance et nutriments s'ils ne sont pas disponibles en quantité suffisante la cellule ne poursuit pas la division et elle rentre en phase de repos G0.
- **Transition G1/S**: contrôler si la croissance cellulaire est faite normalement.
- **Transition S/G2** : l'ADN doit être complètement répliqué et réparé.
- **Durant M** : vérification de duplication de l'ADN en 2 copies identiques (**Barnumet al., 2014**).

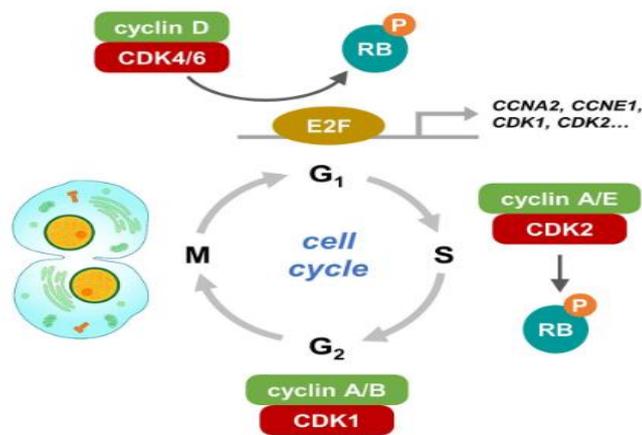


Figure 10. Diagramme schématisant les fonctions des différentes paires de CDK-cycline dans les différentes phases du cycle cellulaire (Mok *et al.*, 2018).

B. Les inhibiteurs des cycline/cdk

Ces cycline-CDK sont régulés par des inhibiteurs pour le bon déroulement du cycle.

Les protéines Cdk sont activées par leur liaison aux cyclines et inactivées par leur liaison aux CKI (P15 ou P16). Se dernier entre en compétition avec la cycline D.

P21 (Waf1/Cip1) : une protéine inhibitrice des complexes G₁/S-Cdk et S-Cdk. Elle est transactivée par P53 et P27kip1 (Lopez-Meij *et al.*, 2014).

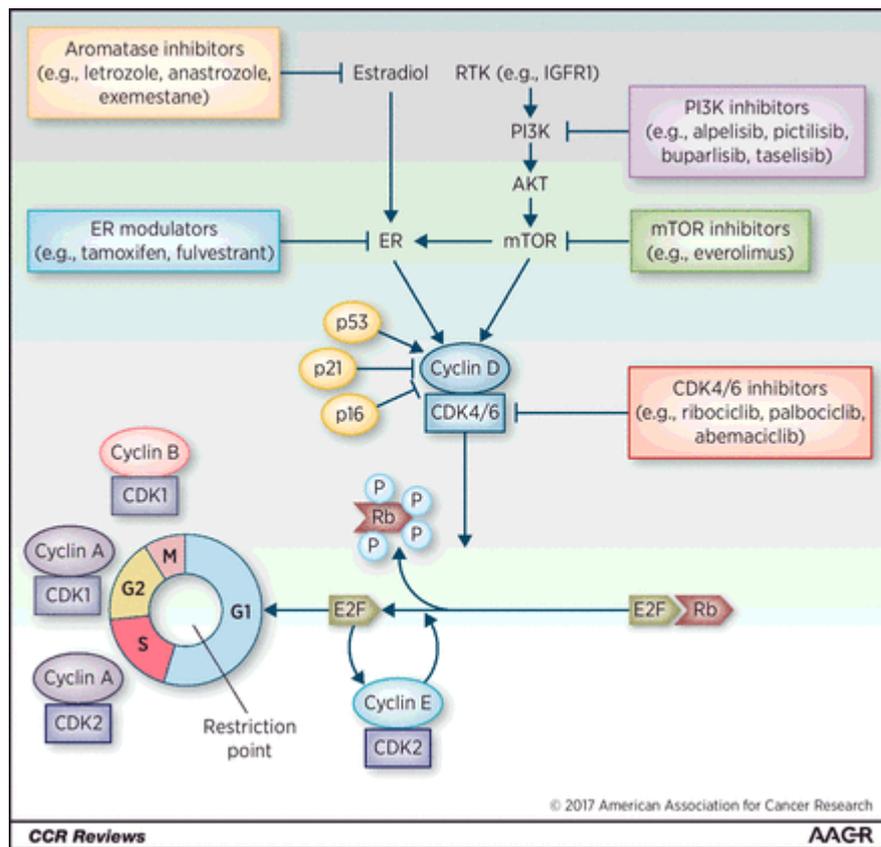


Figure 11. Rôle de complexe cycline/Cdk et la voie cyclineD-CDK4/6-p16-RB dans le cycle cellulaire (Tripathy, 2017).

II.2.2 MDM2 et Contrôle du cycle cellulaire :

MDM2 peut former un complexe avec pRB (« Retinoblastoma protein ») in vivo, perturbant ainsi l'arrêt cellulaire en G1 médié par pRB. Il est capable d'interagir directement avec une des cibles principales de pRB, le facteur de transcription E2F1/DP1, qui joue un rôle important dans l'entrée en phase S (Wang *et al.*, 2010).

Autre mécanisme décrit par Coindre *et al.* (2010) Le gène CDK4 est co-amplifié avec MDM2 qui jouent en collaboration pour inhiber l'apoptose (action de MDM2 sur P53) et favoriser la progression cellulaire (phosphorylation de pRB par cdk4).

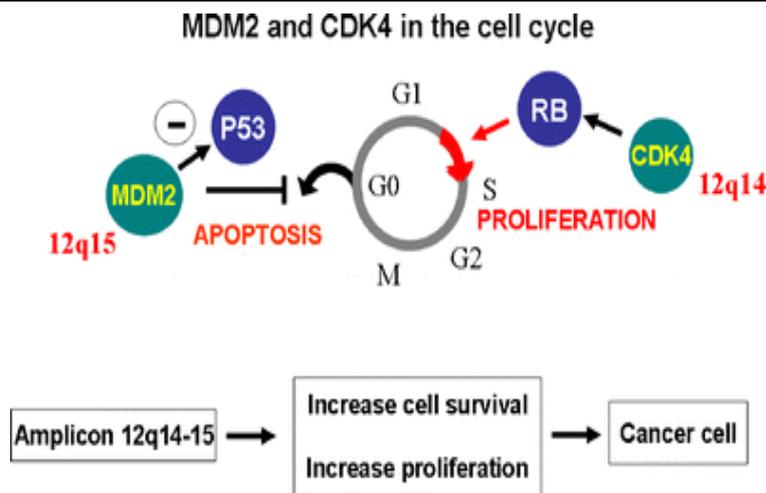


Figure12. Mécanisme d’action de MDM2 et CDK4 favorisant la survie cellulaire (Coindre *et al.*, 2010).

II.3 Les fonctions de MDM2

II.3.1 Régulateur de P53

La protéine P53 est un facteur de transcription oncosuppressif. Il est stabilisé en réponse à des nombreux phénomènes moléculaire : des lésions d’ADN, hypoxie, des infections virales, activation d’oncogènes, d’apoptose, de sénescence et la différenciation cellulaire. En activant l’expression de nombreux gènes dont P21 et MDM2 (Hong *et al.*,2014).Le gène P53 est localisé surle chromosome 17 (17p13.1) est contenant 1 exons (ncbi Genbank).

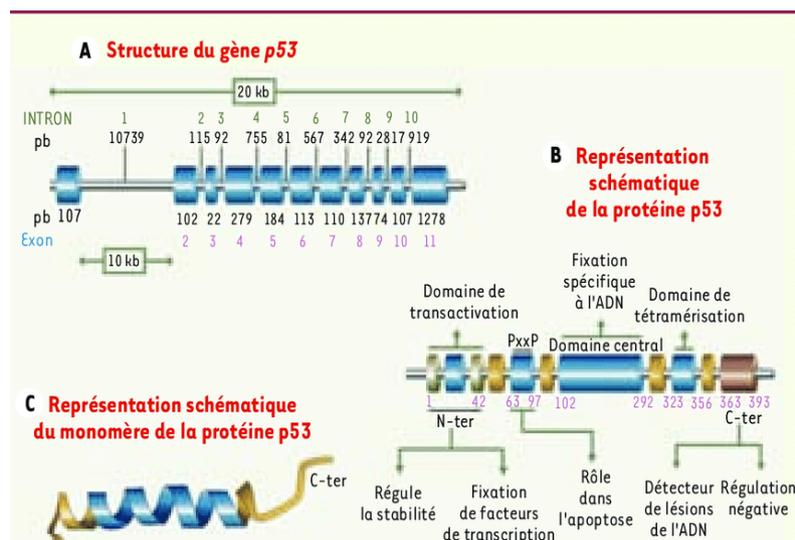


Figure 13. Structure du gène et de la protéine P53 (Soussi, 2000).

La protéine P53 est caractérisée par 3 domaine principale : un domaine de transactivation en N-terminale (liaison au MDM2) un domaine central et un domaine de tétramérisations en C-terminale.

○ Interaction P53-MDM2

La protéine RPL26 est une protéine ribosomale qui en réponse au stress génotoxique se lie à l'ARNm de p53 et augmente sa traduction (**Ofir-Rosenfeld, 2008**). Dans le cas normal MDM2 régule l'ubiquitinylation de P53 (ainsi RPL26) soit par interaction directe (Protéine-protéine) ou en se liant à l'ARNm codant pour la protéine P53 et donc inhibe sa traduction (**Hao, 2020**). Dans le cas des dommages à l'ADN l'interaction de MDM2-P53 est perturbé la protéine MDM2 sera phosphoryler et la p53 phosphorylé et acétylé (fig.14).

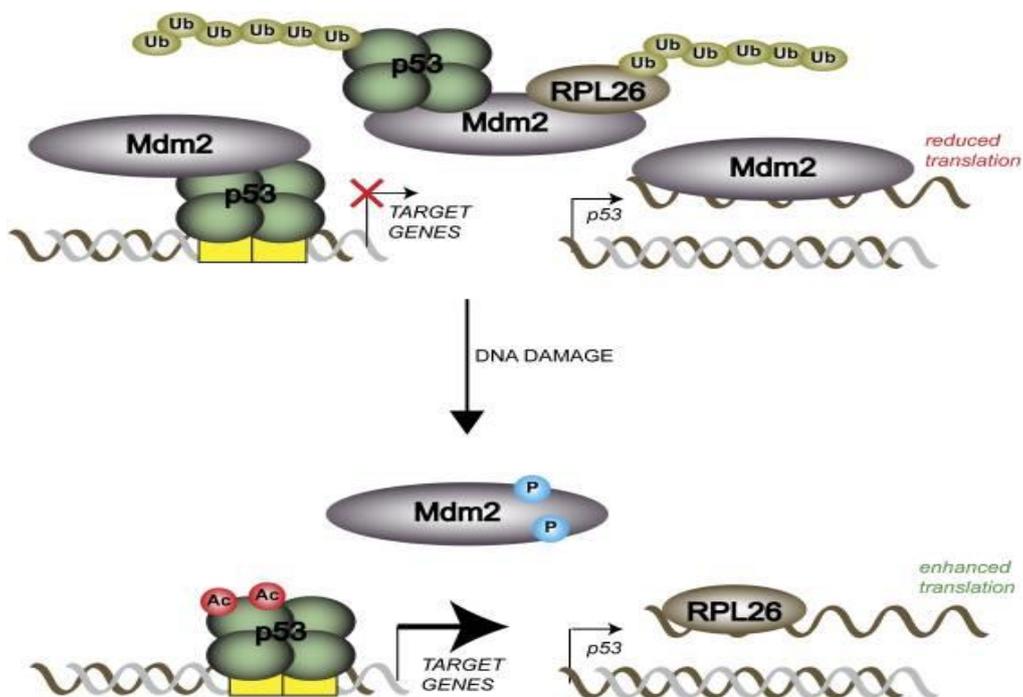


Figure 14. MDM2 régule la réponse de P53 aux dommages à l'ADN (**Manfredi, 2010**).

II.3.2 MDMX homologue de MDM2

La protéine MDMX (MDM4) est un homologue de la protéine MDM2 qui sous stress peut contribuer aussi à la régulation de P53 (sa transcription n'est pas régulée par P53) en formant un hétérodimère avec MDM2 (Zhao *et al.*, 2014).

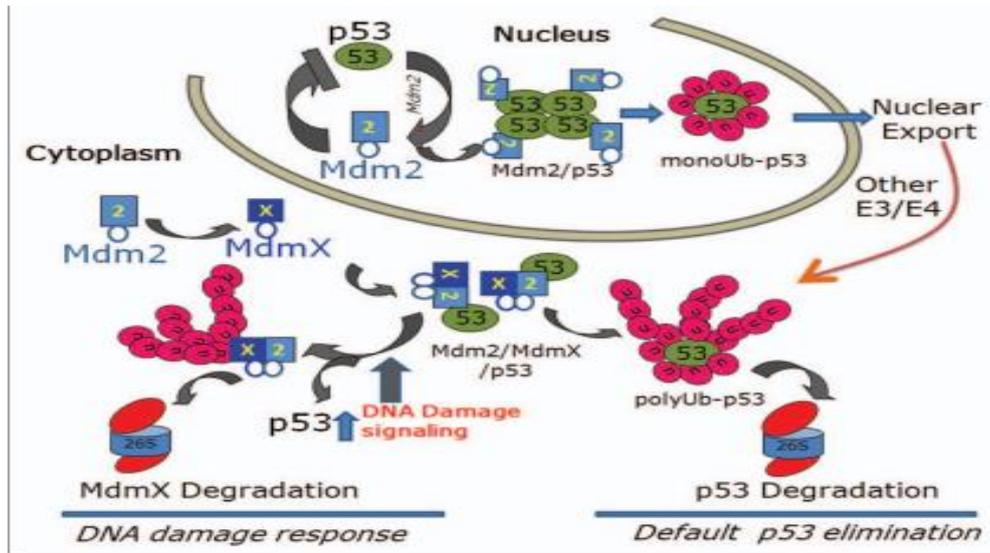


Figure 15. Régulation de P53 par MDM2 et MDMX (Wang, 2011).

Matériel et méthodes

I. Protocole expérimentale:

Afin de réaliser cette étude, nous avons travaillé en collaboration avec le service d'Anatomie pathologique de l'hôpital Djilali Bounaama de DOUERA, dirigé par le Professeur BELARBI. Malheureusement, en raison des conditions sanitaires liées à la propagation de la pandémie du COVID-19, notre partie pratique n'a donc pas pu être réalisée. En revanche, Nous avons orienté notre travail vers un volet théorique basé sur la littérature scientifique référencée.

Ci-dessous est présentée la partie expérimentale prévue au départ. Elle a été abandonnée suite aux évènements pandémiques liés au corona virus.

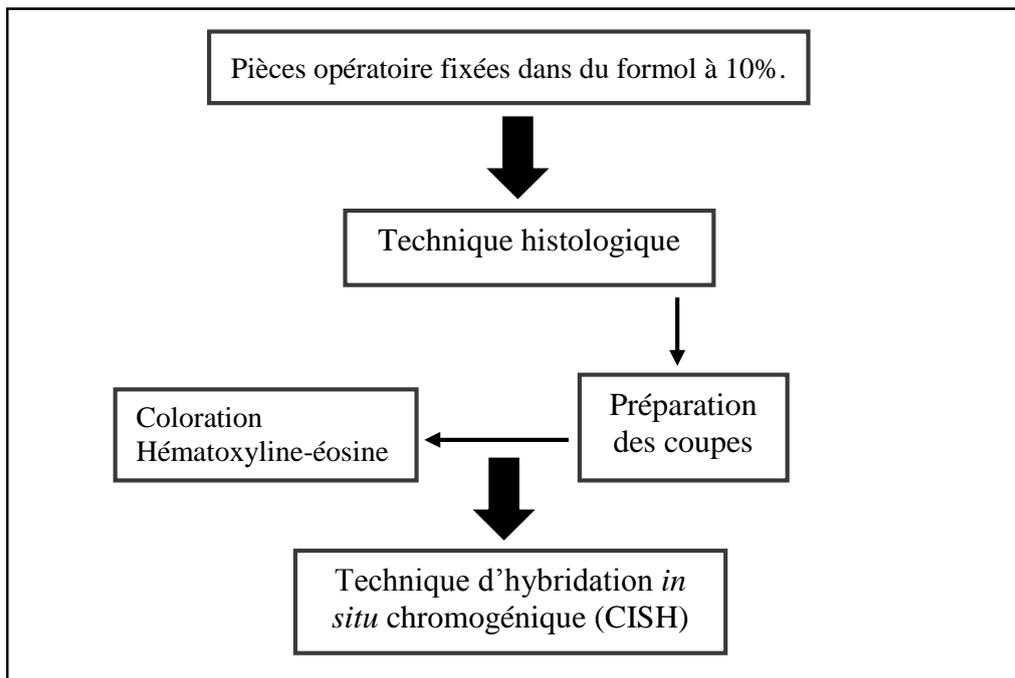


Figure 16. Protocole expérimental

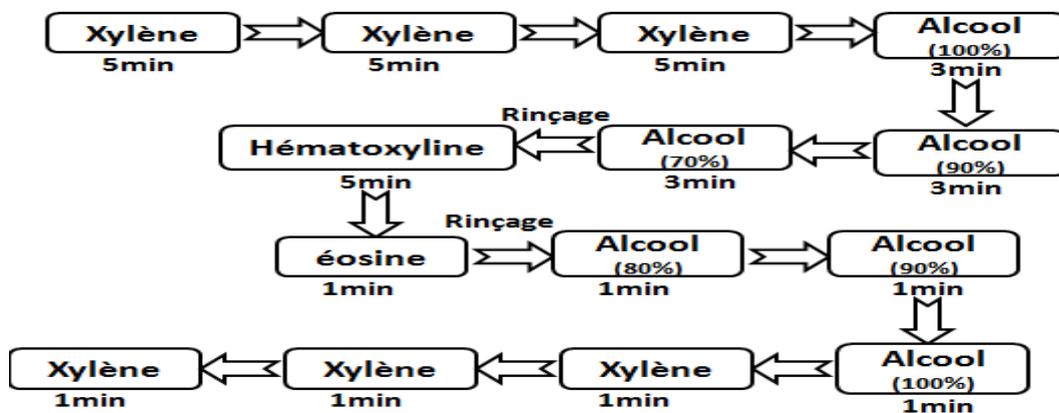


Figure 17. Schéma explicatif des différentes étapes de la coloration.

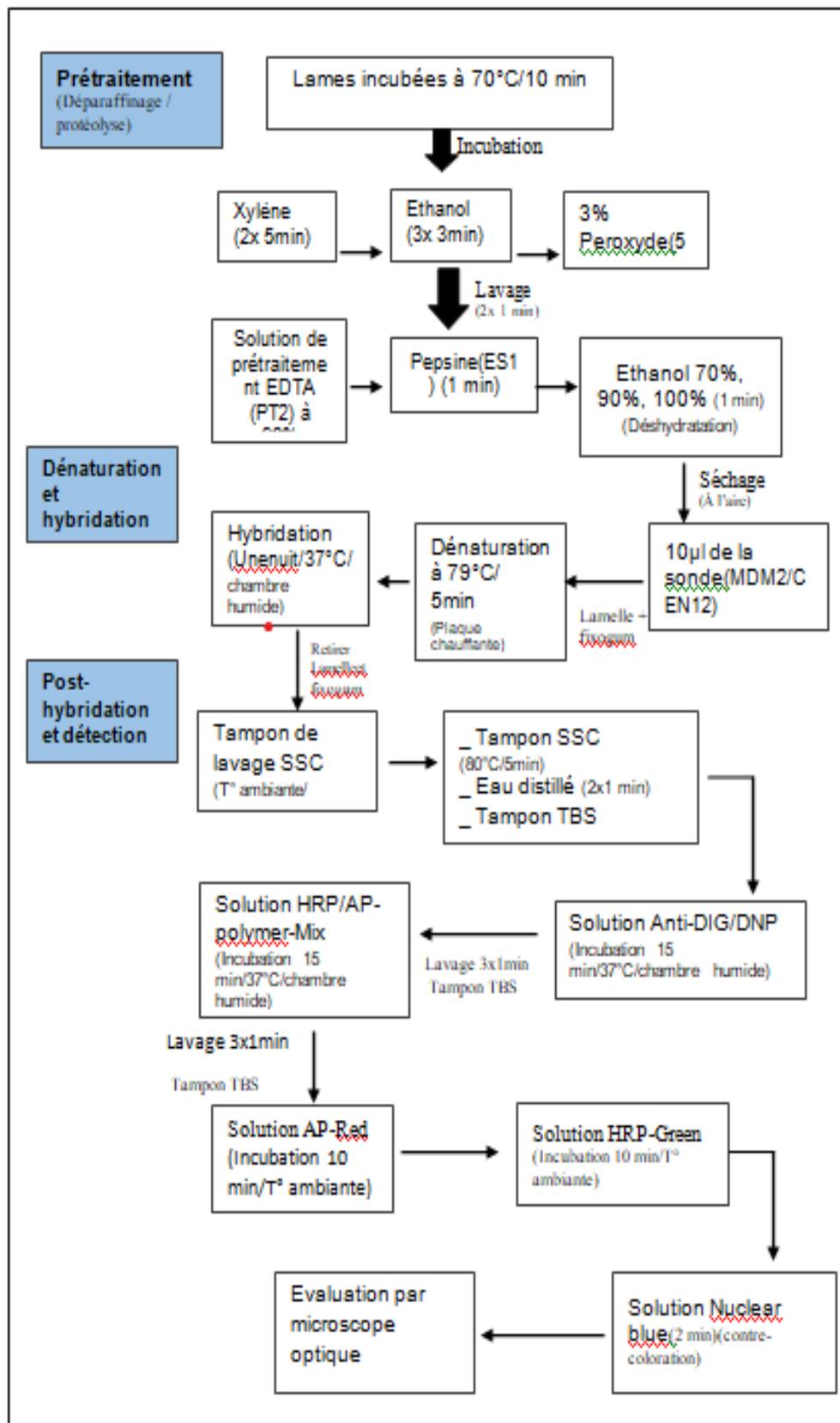


Figure 18. Protocole de l'hybridation *in situ* chromogénique (CISH).

Critères d'interprétation :

Selon les recommandations du fournisseur l'étude se fait sur 30 noyaux minimum.

Les résultats se définissent comme suit :

- 1-2 copies : pas d'amplification.
- 3-5 copies : polysomie
- 6 - 9 copies : gain
- ≥ 10 copies : amplification.

II. Les Données bibliographiques

En raison des conditions actuelles dues au Coronavirus, nous avons dû réaliser de manière théorique notre étude sous forme d'une méta-analyse d'articles qui traitent l'hybridation *in situ* chromogénique de l'oncogène MDM2 dans les tumeurs de tissu adipeux.

II.1 Nature des données :

La recherche en ligne nécessite des moteurs de recherche scientifique et des mots clés. Le tableau suivant présente la nature de notre documentation scientifique :

Tableau II. Présentation de la nature des données

	Nature des données
Les moteurs de recherche	PubMed
	Google scholar
	Biomedcentral
	Science.gov
Les mots clés	Hybridation <i>in situ</i> chromogénique MDM2 tumeurs adipeuses liposarcome l'amplification de MDM2
La langue	Anglais Français
L'année de publication	2010-2020
Nombre d'articles	04

II.2. Les critères d'inclusion et d'exclusion

II.2.1. Les critères d'inclusion

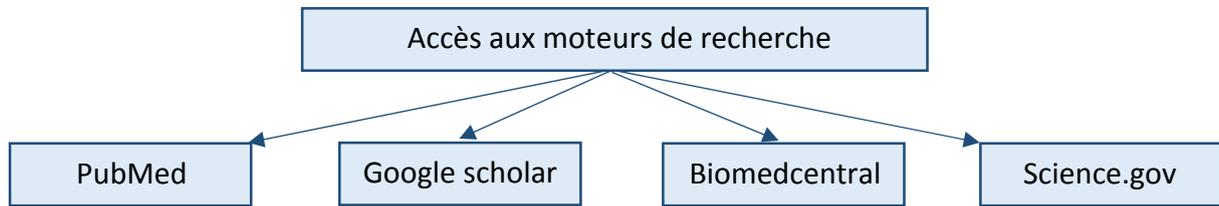
Avant l'analyse des articles concernant la détection de l'amplification de l'oncogène MDM2 nous sommes basés sur des critères d'inclusion, qui sont :

- ✚ Etudes faites sur les tumeurs adipeuses.
- ✚ Application de l'hybridation *in situ* chromogénique.
- ✚ Etudes ayant pour but évaluation de l'utilité de la CISH pour diagnostic des tumeurs adipeuses.
- ✚ Etudes comparatives entre la CISH et autres méthodes utilisées en cytopathologie.
- ✚ Etudes de détection de l'amplification de l'oncogène MDM2 par la technique de CISH.

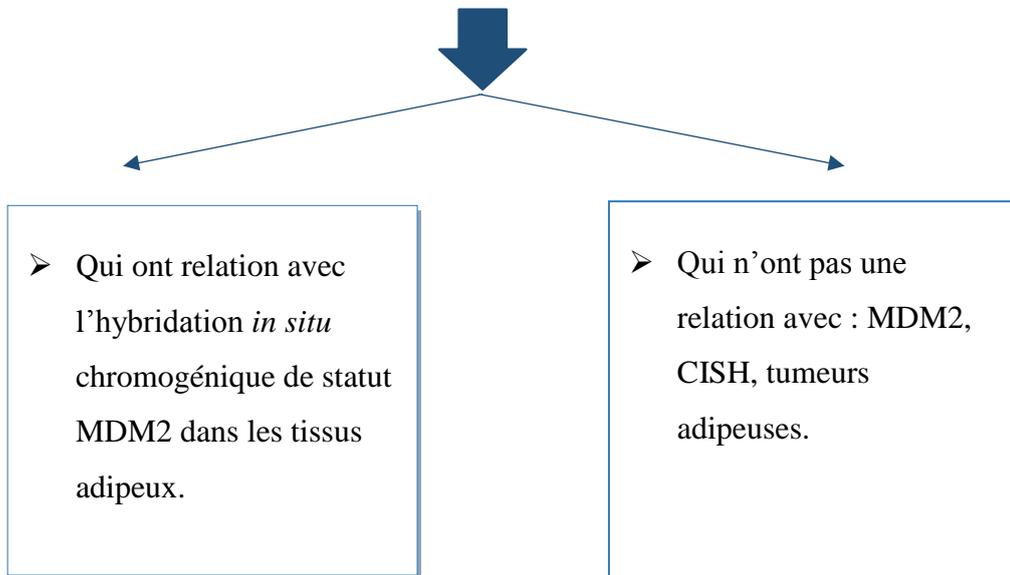
II.2.2. Les critères d'exclusion:

- ✚ La détection de l'amplification de l'oncogène MDM2 par la FISH
- ✚ La détection de l'amplification de l'oncogène MDM2 par la CISH dans d'autres types de tumeurs.

Schéma récapitulatif:



Mots clés utilisé : Hybridation *in situ* chromogénique_MDM2_tumeurs adipeuses_liposarcome_l'amplification de MDM2.



III. Présentation des données:

Les échantillons étudiés dans ces essais sont des pièces opératoires humaines des tumeurs adipeuses des tissus mous fixées au formol et inclus en paraffine, adressées pour la détection de l'amplification de l'oncogène MDM2. Les tumeurs sélectionnées s'agit de lésions bénignes (lipomes) et malignes (liposarcomes).

III.1. Les techniques

III.1.1. Les technique histologique

Les techniques utilisées dans laboratoires d'anatomopathologie passant au premier lieu par les techniques histologiques (macroscopiques et microscopique) ayant pour objectif de préparer des lames pour l'observation des structures tissulaires et le diagnostic des tumeurs après la coloration HÉ. Sur cette base que le médecin pathologiste sélectionne la zone cible pour les tests de biologie moléculaire.

Coloration HE (hématoxyline-éosine)

Il s'agit d'une coloration topographique permettant la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme. Cette technique associe une coloration bleue de l'acide nucléaire par l'hématoxyline de Harris (colorant basique) et une coloration rose des protéines cytoplasmique par l'éosine (colorant acide) (Véronique M., 2010).

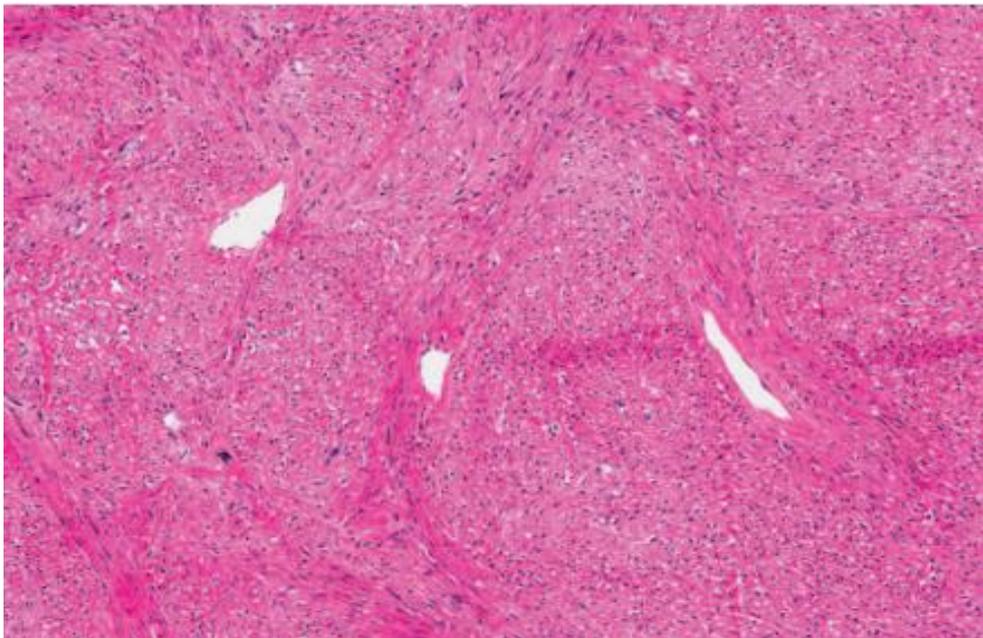


Figure 19. Photomicrographie colorée à l'hématoxyline-éosine de la section de tissu adipeux (GR x310) (Zhang *et al.*, 2016).

III.1.2. Méthodes de biologie moléculaire

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire tels l'immunohistochimie, la PCR et l'hybridation *in situ* permet de mettre en évidence les altérations moléculaires au niveau de l'ADN, l'ARN et les protéines.

A. L'immonu-histochimie (IHC)

Le but de l'immunohistochimie (IHC) est de mettre en évidence dans les tissus des molécules (antigènes) membranaires, cytoplasmiques et/ou nucléaires grâce à la détection par un anticorps spécifique. Cette réaction antigène-anticorps est révélée par une réaction enzymatique (anticorps secondaire-chromogène) donnant un précipité de couleur (Travis *et al.*, 2016).

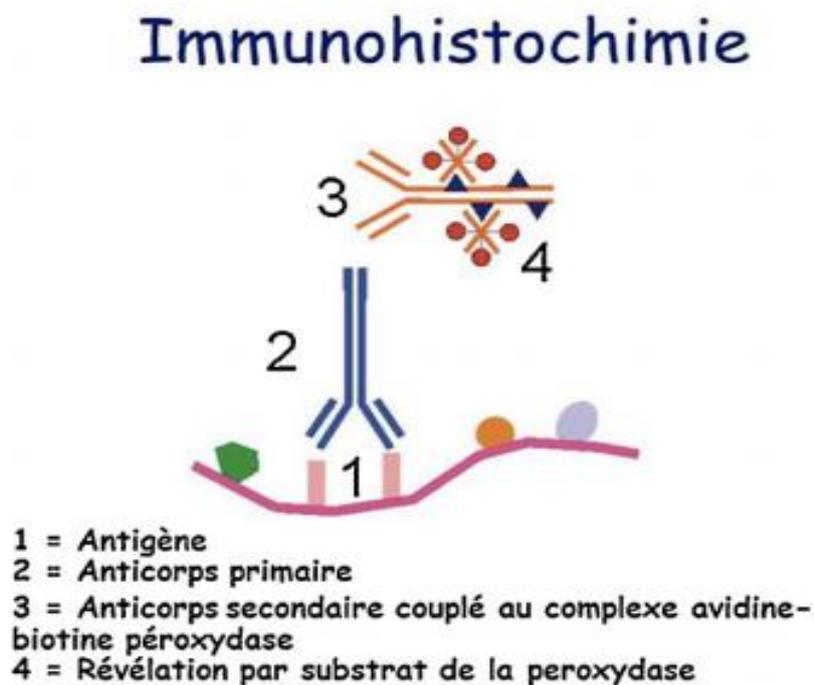


Figure20. Principe générale de l'immunohistochimie.

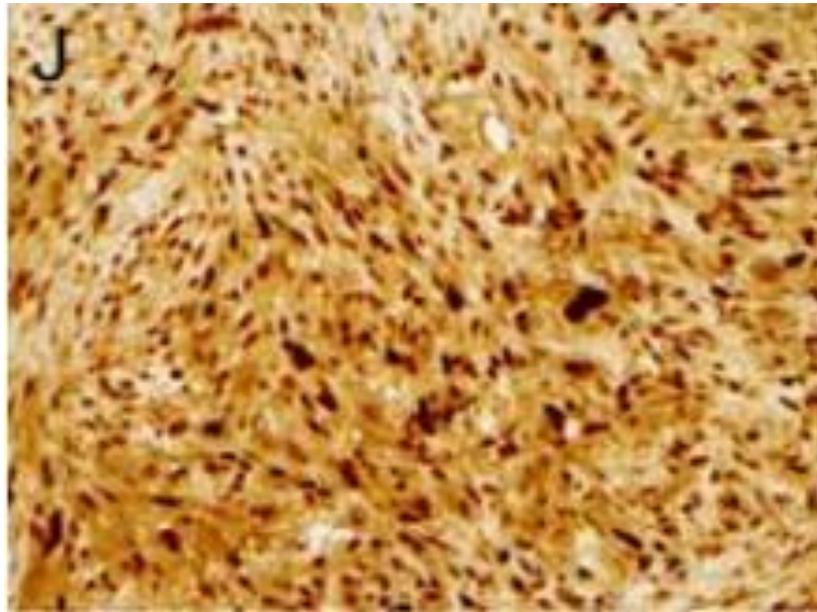


Figure 21. Photomicrographie de l'immunohistochimie de l'oncogène MDM2 de biopsie de liposarcome dédifférencié

Tableau III. Les avantages et les inconvénients de l'immunohistochimie.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">• Réalisée à partir du tissu fixé au formol et inclus en paraffine.• Elle ne nécessite pas de prélèvements spécifiques.• disponible dans tous les laboratoires d'anatomopathologie.• souvent automatisée.• Elle est peu onéreuse.	<ul style="list-style-type: none">• Elle est tributaire.• liaisons non spécifiques sont plus fréquentes

B. Les techniques d'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) est une technique de la biologie moléculaire ayant pour but de localiser des cibles d'acide nucléique mono-brin spécifiques sur une coupe histologique de tissu ou des cellules fixées au formol et inclus dans la paraffine. Pour cela on utilise une petite séquence complémentaire à la cible appelée sonde. Cette technique peut être utilisée pour évaluer l'amplification génique, la délétion de gènes, la translocation chromosomique et le nombre de chromosomes.

Il existe des types d'hybridation *in situ* qui se différencient par le marquage de la sonde :

- a. FISH** (Fluorescent *in situ* hybridization) : la sonde est marquée avec un fluorochrome.
- b. CISH** (Chromogenic *in situ* hybridization) : la sonde est marquée avec un chromogène.
- c. SISH** (silver *in situ* hybridization) : la sonde est marquée avec des sels d'argent.

Ces types d'HIS sont basés sur le même principe mais les caractéristiques inhérentes à chaque méthode de détection font que la FISH et la CISH sont destinées à des applications très distinctes. De plus, les instruments utilisés pour visualiser les résultats ne sont pas les mêmes en fonction de la méthode utilisée : microscopie à fond clair pour la CISH/SISH et microscopie à fluorescence pour la FISH (Ramzan et al., 2017).

a. FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire. Qui a pour but de mettre en évidence de manière spécifique les anomalies moléculaires au niveau chromosomique : réarrangement ou amplification génique, repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de l'ADN. Les sondes utilisées sont marquées à la biotine et révélées par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome (FITC) et visualisées par microscope à fluorescence (Speicher et al., 2005) Elle est applicable sur les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (Ventura et al., 2006).

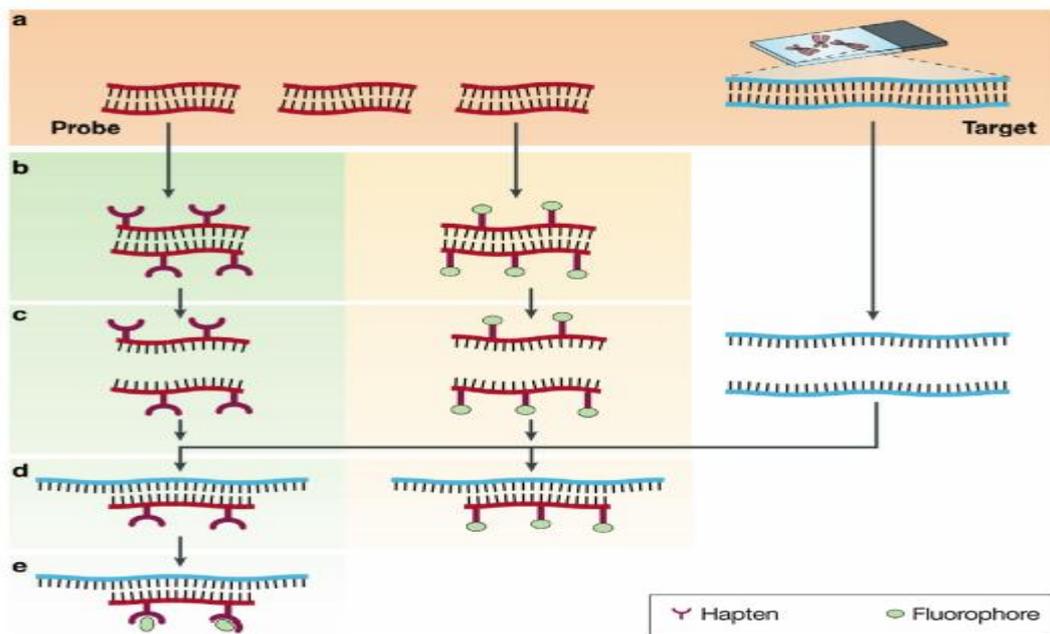


Figure 22. Principe de l'hybridation *in situ* fluorescente (Speicher et al., 2005).

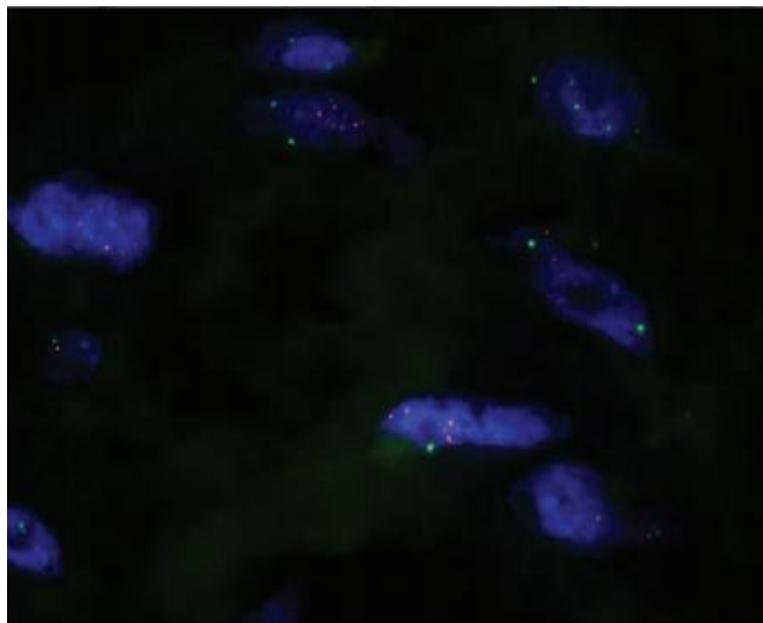


Figure 23. Photomicrographie sur champs sombre de la FISH-MDM2 d'une section de tissu adipeux (Zhang et al., 2016).

Tableau IV. Avantages et inconvénients de la FISH (Lambros et al., 2007).

Avantages	Inconvénient
<ul style="list-style-type: none"> • Une technique très sensible et spécifique. • Un diagnostic rapide ayant un impact thérapeutique. • Elle est plus rapide avec des sondes directement marquées ms le marquage indirecte offre l'avantage d'amplification de signal (signal plus lumineux). • Jusqu'aux quatre sondes de différentes couleurs peuvent être détecté sur une seule lame 	<ul style="list-style-type: none"> • impose un microscope à fluorescence et champ sombre. • La lecture de la FISH est longue et une seconde lecture est recommandée. • elle est de bonne qualité quand il y a au moins 100 noyaux intacts, ce qui peut être difficile en cas de petite biopsie. • une auto-fluorescence engendrée par les colorantes éosines. • la conservation qui doit être à 4 °C. • les signaux sont moins conservables morphologie tissulaire et cellulaire non interprétable.

a. L'hybridation *in situ* chromogénique (CISH)

Le concept des applications ISH en fond clair multicolore a été signalé dans les années 90 (Speel et al., 1994 , Hopman et al., 1997). La technique d'hybridation *in situ* chromogène est similaire à celle de la FISH mais la détection du signal de la sonde se fait grâce à un chromogène et l'observation du signal faite par microscope optique (Rosa et al., 2013). Cette technique combine les principes de l'hybridation *in situ* et la méthode de détection chromogène de l'immunohistochimie (anticorps conjugués au chromogène) (Tanner et al., 2000).

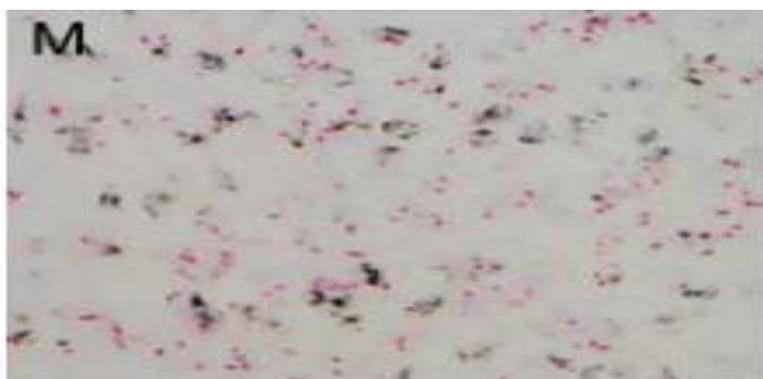


Figure 24. Photomicrographie de la MDM2-CISH dans une section de tumeurs lipomateuses présente une forte amplification de MDM2 (Signal rouge) (Kobayashi et al., 2019).

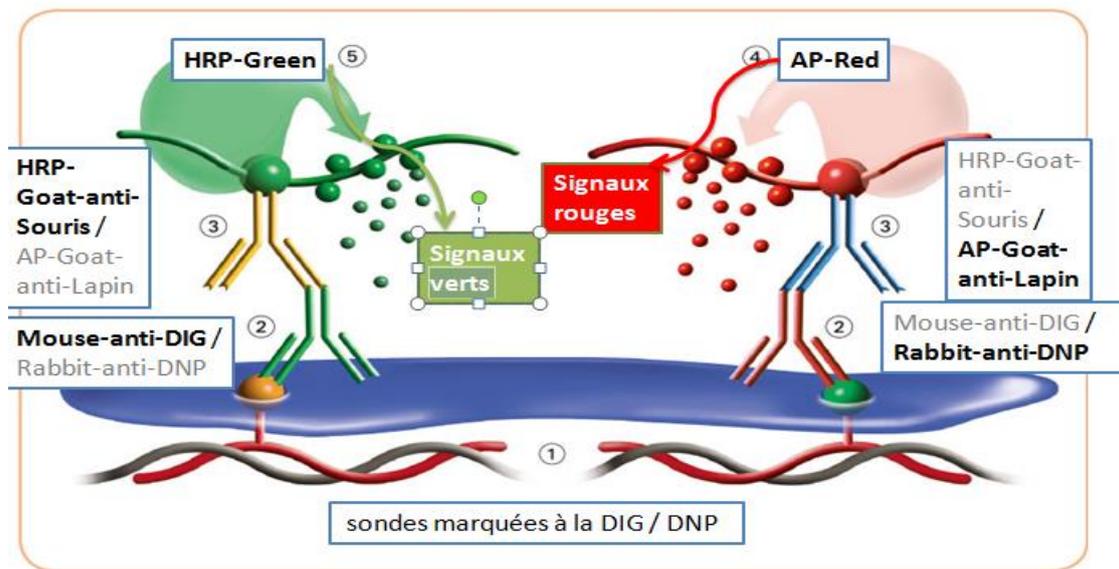


Figure 25. Principe général de l'hybridation *in situ* chromogénique (CISH).

Résultats et discussion

I. Présentation des résultats

I.1. Les résultats de l'amplification de statut MDM2

Le statut d'amplification ou non amplification est déterminé par le ratio MDM2/CHR12 si il est supérieur ou égale à 2 on le considère comme amplifié les résultats sont présentées dans le tableau suivant:

Tableau V. Les résultats d'amplification du gène MDM2 par la CISH.

Amplifié	Non amplifié	Faible amplification /Aneusomie CHR12
<ul style="list-style-type: none"> - ALT/WDLPS (39) - DDLPS (22) - Osteosarcome (1) - Chondrosarcome (1) - Sarcome pléomorphe (6) - Sarcome synovial (9) 	<ul style="list-style-type: none"> - lipome (106) - Osteosarcome (4) - Chondrosarcome (3) - Sarcome myxoïde (7) - ALT/WDLPS (2) - Mésentérite sclérosant 2) - Myofibroblastome (1) - Sarcome pléomorphe (2) - Néoplasme à cellules fusiforme (1) - Tissus mous (10) 	<ul style="list-style-type: none"> - Lipomes (2) - ALT/WDLPS (6) - DDLPS (1) - Osteosarcome (3) - Sarcome synovial (1) - Pléomorphe (8) - Rabdomyosarcome alvéolaire (1) - Rabdomyosarcome embryonnaire (2)

L'amplification de MDM2 est présente dans pratiquement tous les ALT/WDLPS (39 des 47 cas : 84%) ainsi que 6 cas présentaient une aneusomie CHR12 est 2 cas non amplifiés (cause d'hétérogénéité) . Aussi bien que pour les liposarcomes dédifférenciés dans les 23 cas étudiés 22 sont amplifiés pour le statut MDM2 et 1 cas est noté comme faible amplifié avec un aneusomie CHR12. Contrairement aux lipomes bénins qui ne présentent pas d'amplification de l'oncogène MDM2 (106 des 108 cas non amplifiés : 98%) sauf une faible amplification observée dans 2 cas.

Les résultats microscopiques d'amplification et non amplification de l'oncogène MDM2 par l'hybridation *in situ* FISH et CISH sont présentait dans les figures suivant (**fig.22 ; fig.23**).

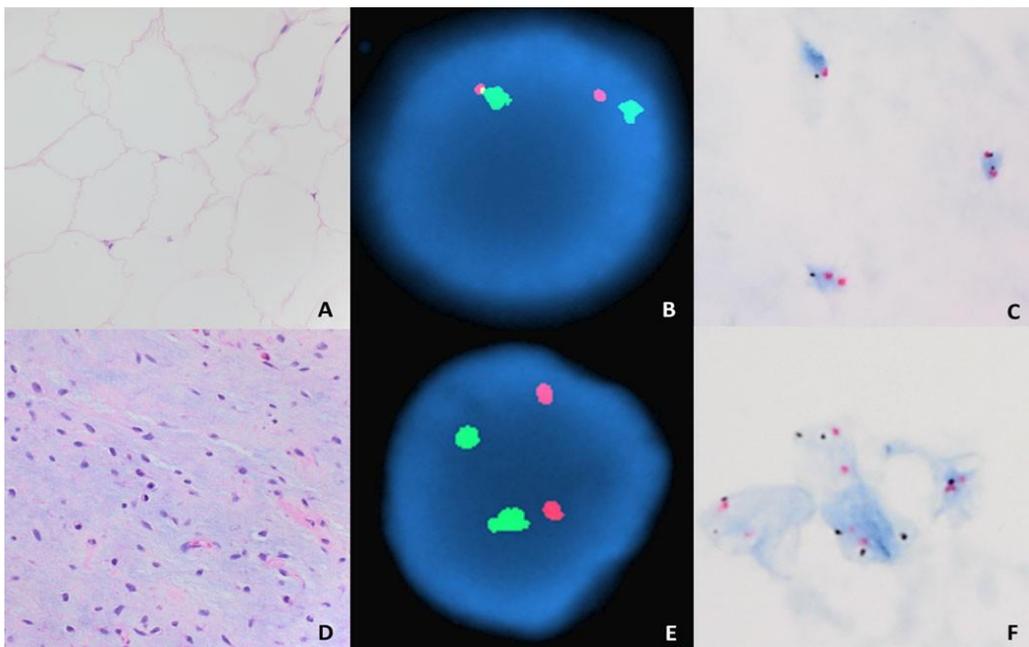


Figure 26. (A) Lipome et (D) liposarcome myxoïde avec amplification MDM2 négative comme démontré par FISH (B, E) et CISH (C, F), respectivement. A et D, hématoxyline et éosine, 40 ×. C et F, CISH, 100 × (Mardekian et al., 2015).

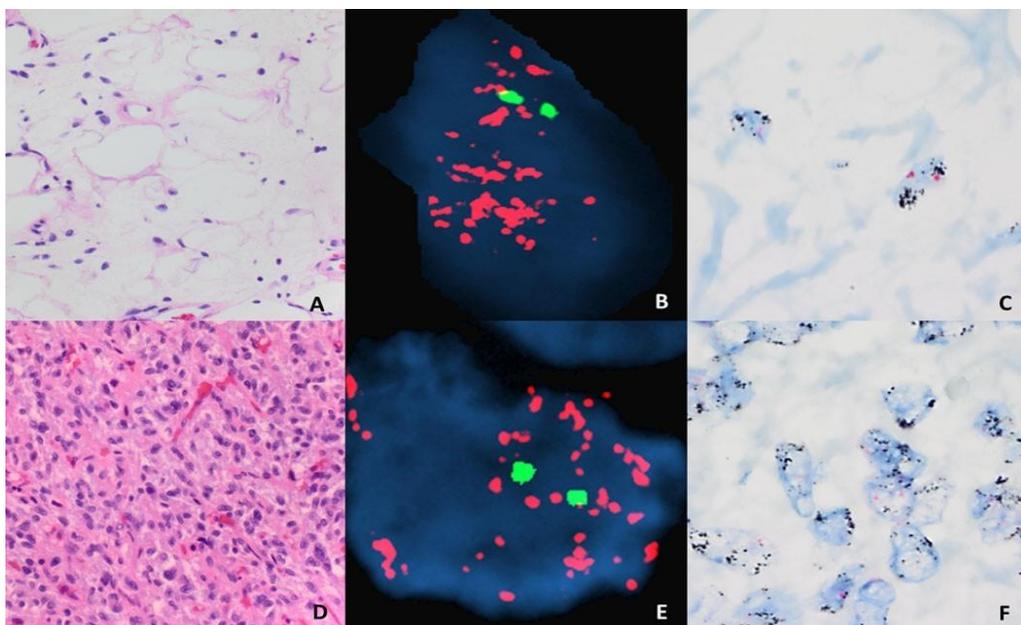


Figure 27. ALT-WDLPS (A) et DDLPS (D) avec une amplification MDM2 positive démontrée par FISH (B, E) et CISH (C, F), respectivement. A et D, hématoxyline et éosine, 40 ×. C et F, CISH, 100x (Mardekian et al., 2015).

I.2. Interprétation des résultats microscopiques

La figure ci-jointe (**Fig.28**) montre deux cas de MDM2-FISH et MDM2-CISH interprétable. En (1A) montrant un état global non amplifiée la plupart des cellules ont 2 copie de locus MDM2 (Signal rouge) et le nombre de copie chromosome 12 (CHR12) varie de 2 à 4 (Signal vert). Contrairement au (1B) ou l'amplification de l'oncogène MDM2 est présente sous forme d'amas du signal rouge.

Passant au résultat de la CISH ; En (1C) MDM2-CISH non amplifié (Nombre de copie MDM2 et CHR12 égale). Et (1D) montre un état amplifié de MDM2 (signal noire) et CHR12 présenté par le signal rouge ; Ces deux signaux vont être compté (lorsque c douteux de prédire le statut de l'amplification donc pas le cas pour le 1D) ensuite un Ratio de MDM2/ CHR12 vas être déterminé et défini a un intervalle donné.

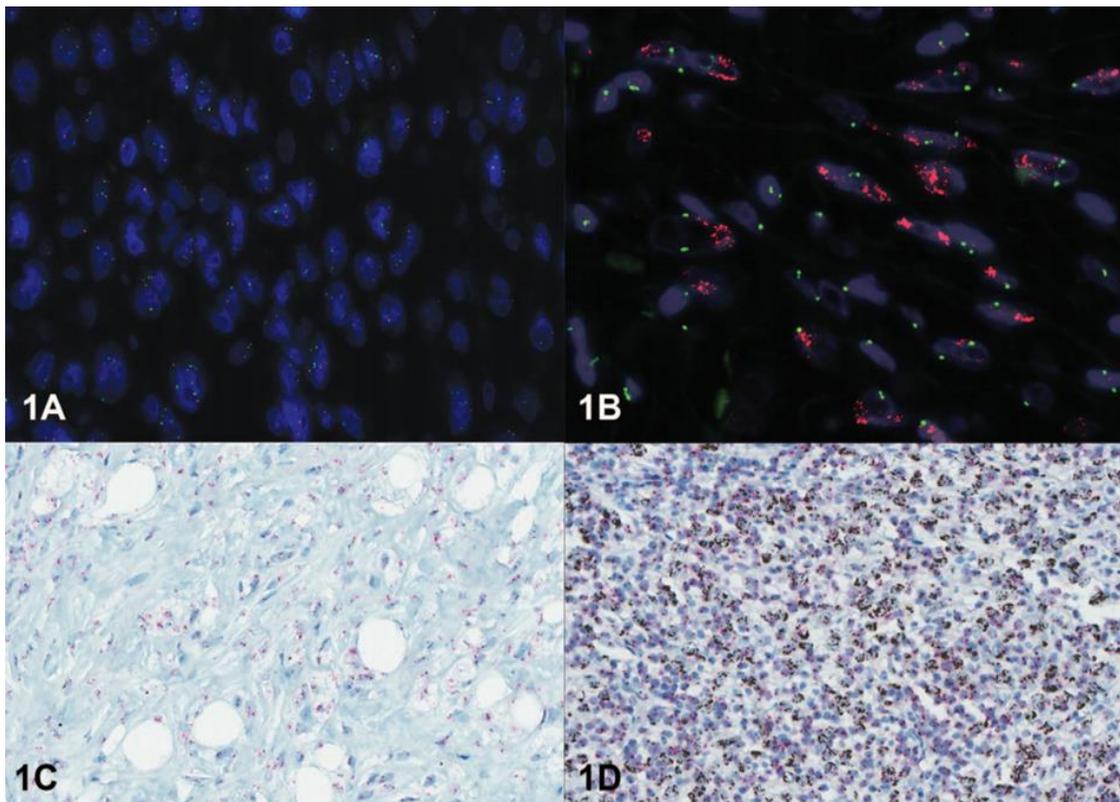


Figure 28. Photomicrographies de MDM2-FISH (1A ; 1B) et MDM2-CISH (1C ; 1D).

II. Discussion

La différenciation entre les lipomes bénins et liposarcome (malins) est basée sur les critères morphologiques définis par l'OMS (la taille et la localisation), mais parfois il est très difficile de différencier les tumeurs lipomateuses atypiques / liposarcomes bien différenciés et des lipomes bénins en basant seulement sur les critères morphologiques surtout lorsque ces derniers sont de taille anormale ou emplacement profond (**Asif et al., 2018 ; Stojanov et al., 2018**), ainsi de mettre la différence entre les liposarcomes dédifférenciés d'autres sarcomes de haut grade (**Kimura et al., 2013**). Dans ces cas les tests passent aux analyses de la biologie moléculaire à fin de détecter l'amplification de l'oncogène MDM2 (**Mendoza et al., 2014**) étant un marqueur spécifique et caractéristique des ALT/WDLPS et DDLPS dont une concordance notée entre l'atypie histologique et l'amplification de MDM2 (**Dei Tos et al., 2000 ; Coindre et al., 2009 ; Horvai et al., 2009**).

La détection de l'amplification de MDM2 (la région 12q14-15) est considérée comme un outil précieux pour le diagnostic différentiel entre les lipome et liposarcome (**Kimura et al., 2013 ; Ben Salha et al., 2016**) ; dont elle peut être utile dans le diagnostic, la classification et dans le choix de traitement des tumeurs de tissu adipeux (**Wong et al., 2016**). Les méthodes de biologie moléculaire tels l'immunohistochimie, la PCR et l'hybridation *in situ* ont été utilisées pour le diagnostic des tumeurs lipomateuses mais les techniques cytogénétiques ont été qualifiées d'être plus utiles et précises car elles ciblent directement la cause d'amplification de l'oncogène MDM2 sur l'ADN (ou l'ARN).

Kobayashi et al. (2019) ont étudié l'amplification de MDM2 (P16 et CHK4) Par immunohistochimie et CISH dans des cas difficiles de DDLPS ; l'étude comprenait 11 DDLPS et cas de sarcomes non lipogènes de haut grade (LPS) ; une forte amplification de MDM2 (aussi P16 et CDK4) était présente dans tous les 11 cas DDLPS et deux cas de LPS qui ont été classés comme DDLPS après re-examen des échantillons initiaux. Ces données confirment encore l'importance de la détermination de l'amplification de l'oncogène MDM2 pour le diagnostic des tumeurs lipomateuses (Voir annexe 2).

De plus, dans les cas de DDLPS dépourvue de composant ALT (critère essentiel pour différencier les DDLPS) (**fig.29**) le diagnostic ne peut pas être basé seulement sur les données histologiques mais autre il est important de déterminer l'amplification de l'oncogène MDM2 (**Kobayashi et al., 2019**)

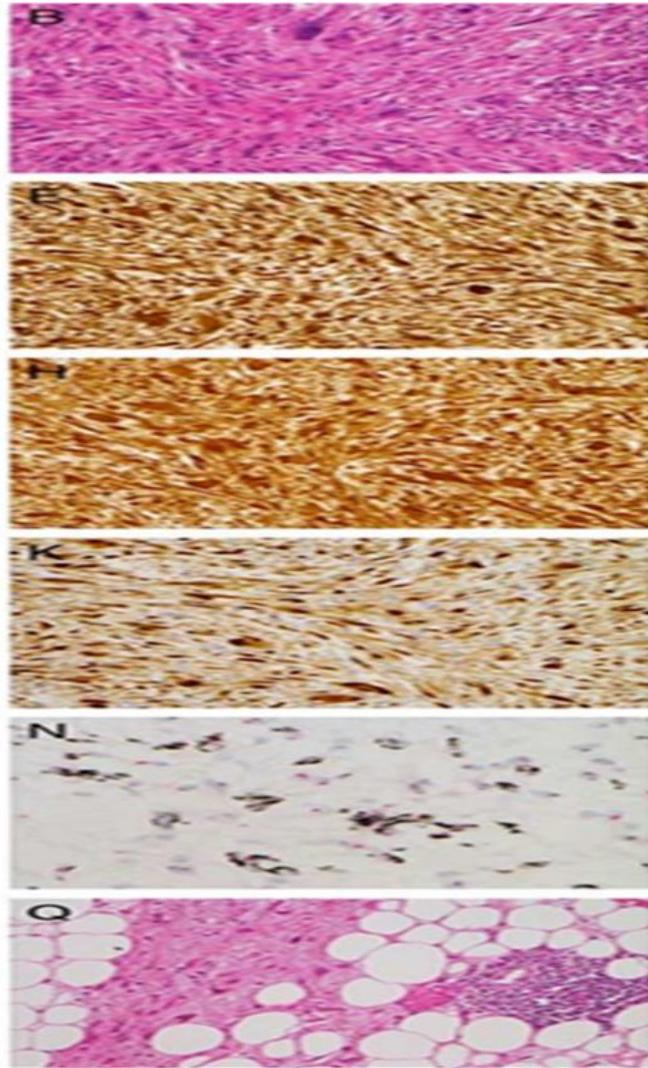


Figure 29. Métastase pulmonaire de DDLPS H/63 ans (cas 7) (kobayashi et al., 2019).

Aucune zone ALT n'était présente dans la tumeur métastatique, qui avait des caractéristiques de type UPS (B). Les immunoréactivités pour p16 (E), CDK4 (H) et MDM2 (K) étaient de 3+. La CISH a détecté une amplification significative de MDM2 (N). Les composants ALT étaient présents dans les tumeurs d'origine (Q) » (kobayashi et al., 2019).

Les pièces opératoires des tumeurs adipeuses s'agissent souvent de biopsies qui posent le problème de matériel de diagnostic limité (Mardekian et al., 2015) surtout dans les cas de DDLPS vu sa complexité morphologique (OMS) heureusement la présence d'anomalie cytogénétique unique pour les ALT/WDLPS et les DDLPS selon les caractéristiques de l'OMS des liposarcomes qui reposent sur les critères morphologique et génétique; qui peut être exploiter par les outils de diagnostic supplémentaire (IHC, FISH, CGH et récemment la CISH) (OMS 2020).

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est la méthode la plus utilisée pour les tests d'amplification de MDM2. D'après **Sirvent et al. (2007)** la FISH est un outil très fiable pour la détection rapide de l'amplification du gène MDM2 et peut être réalisé sur des échantillons dérivés de la paraffine et fixés au formol (**weaver et al., 2008 ; Zhang et al., 2010**) ; De plus elle était décrite comme méthode sensible et spécifique pour le diagnostic des liposarcomes bien différencie/tumeurs lipomateuses atypiques et les liposarcomes dédifférenciés (**weaver et al., 2009**). La FISH s'avère être une technique de cytogénétique moléculaire auxiliaire robuste et son utilisation devient plus répandue en routine (**Miura et al., 2012**); il semble raisonnable de l'utiliser pour évaluer l'amplification de l'oncogène *MDM2* dans un premier temps (**Sirvent et al., 2007 ; Zhang et al., 2010**). La plupart des séries rapportées ont utilisé FISH comme «étalon-or» de diagnostic des lésions lipomateuses avec un examen ou un réexamen du diagnostic final en fonction de ses résultats histologique et clinique (**Clay et al., 2016**).

Il est important de noter aussi les cas de tumeurs présentaient de caractéristiques clinicopathologique (la taille, la localisation ...) et génétique y compris l'absence d'amplification de MDM2 sont plus proche de lipomes que de WDLPS de sorte que leurs identification par FISH est pronostiquement utile (**Macarenco et al., 2009**).

La FISH comme tous les tests auxiliaires accompagnant l'histologie et en tenant compte du faible taux d'échecs de la technique (avec recommandation d'interprétation dans le contexte des résultats histologiques et cliniques) (**Thway et al., 2015**) est une technique très sensible et spécifique (**Lambros et al., 2007**), l'avantage de la FISH réside dans le fait que jusqu'à quatre sondes ou cibles de couleurs différentes peuvent être analysées sur une seule lame.

Comme la FISH est à la fois laborieux et coûteux (exigence de microscope à fluorescence et une champ sombre et la conservation à 4°C) et un test à forte intensité de main d'œuvre (**Thway et al., 2015**) et possibilité d'une erreurs d'auto-fluorescence par les colorantes éosines et les signaux moins conservables. La morphologie tissulaire et cellulaire un autre critère important et facilitant le diagnostic qui est non interprétable en champ sombre. A ce fait les pathologistes ont été réticents à adopter des tests manuels de FISH pour l'utilisation de routine aux laboratoires, les défis étaient la dépense le temps requis pour l'interprétation et les conditions et la durées de stockage des lames (les signaux FISH diminuent avec le temps).

Résultats et discussion

Des méthodes d'ISH en champs clair ont été développées pour la détection d'ADN ou d'ARN, ils sont maintenant disponibles pour détecter les amplifications et les réarrangements des gènes ainsi révéler les séquences d'ADN/ARN viraux associés aux tumeurs (**Volpi et al., 2018**). En particulier les méthodes bicolores qui ont été initialement développées pour l'amplification du gène HER2 (**Arnould, 2003**). concordance de 96%. L'hybridation chromogène *in situ* (CISH) est aussi sensible et spécifique que l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). CISH est plus rentable que FISH (**Di Palma, 2006**). Concordance de 100%.

Les techniques de l'hybridation *in situ* sur fond clair dont l'hybridation *in situ* chromogène (CISH) ou argentique (SISH) sont en évolution depuis les années quatre-vingt-dix (**Bubendorf et al., 2008**). La CISH est en train de devenir une alternative pratique rentable et valide à l'hybridation *in situ* fluorescente dans les tests d'altération génique (**Madrid et al., 2004**). Cette technique a été initialement appliquée pour le diagnostic du cancer du sein et validée après études comparatives avec la FISH ; Dans ce contexte des travaux menés par **Mollerup et al. (2012)** dont les résultats de la détermination de statut HER2 par les deux techniques FISH et CISH avaient une concordance significative de 98% ; Ces résultats sont en concordance avec autres données publiées (**Lambros et al., 2007 ; Akhdar et al., 2011**). La CISH est aussi confirmée étant utile pour la détection de gène ALK pour les carcinomes pulmonaires noté comme concordance avec la FISH de 96% (**Wagner et al., 2013**). Cette technique est autrement considérée comme outil de diagnostic du cancer de la tête et du cou lié au papillomavirus humain (ARN-CISH HPV) (**Outh-Guer et al., 2019**). L'amplification de MDM2 peut être évaluée par la CISH bicolore à fond clair basée principalement sur l'évaluation du rapport MDM2/CHR12. (**Zhang et al., 2011**). La DISH est considérée comme méthode précieuse et applicable pour détecter l'amplification de MDM2 dans des sections pathologiques de hauts grades et qui présentent des difficultés de diagnostic basées sur les composés caractéristiques de DDLPS (un mélange d'ALT et de composants différenciés).

Tous les travaux dont les résultats ont été traités confirment que la CISH est un outil fiable et applicable pour la détection de l'amplification de gène MDM2 et le diagnostic des tumeurs de tissu adipeux dont la comparaison avec la FISH a clarifié la concordance significative entre les deux approches ce qui a été confirmé par **Mardekian et al. (2015), Zhang et al. (2016), Kobayashi et al. (2019)**. La CISH s'avère être une alternative viable au FISH avec les avantages supplémentaires qui en font une option plus attrayante.

Ce que CISH offre:

- Lors de l'évaluation de gros tissus composés majoritairement des adipocytes la densité nucléaire est faible et il faut veiller à évaluer le tissu dans son intégralité pour éviter de manquer l'hétérogénéité (identification de noyau).
- L'identification des signaux par champs claire est moins lourde qu'avec la fluorescence.
- L'interprétation est effectuée à l'aide de l'équipement qui existe déjà dans les laboratoires d'histopathologie (microscope optique standard ...).
- Les signaux chromogènes nets sont développés en CISH, ils sont prise en charge par une contre coloration par l'hématoxyline pour améliorer les caractéristique morphologiques (architecture tissulaire, altération moléculaire).
- L'hétérogénéité tumorale est plus facilement appréciée par CISH.
- Les produits de réactions chromogènes stables permettent un stockage permanent des lames.
- De nombreuses variables dans la technique de CISH peuvent être ajustées lors de la répétition des cas d'échec tels le temps de l'incubation avec les réactifs et le temps de digestion.
- La détection de statut MDM2 et CHR12 sur la même lame.
- La microscopie à fond claire permet l'observation détaillée de la morphologie tissulaire et cellulaire et l'hétérogénéité génétique.
- Il permet l'évaluation simultanée des altérations du nombre de copies, des cellules tumorales et de la morphologie des tissus sur la même lame et permet l'étude de la relation entre les cellules tumorales et leur microenvironnement.
- La facilité d'utilisation et la fiabilité de test font la CISH un outil de diagnostic de routine potentiel pour les liposarcomes.
- Possibilité de visualiser simultanément le signal CISH et la morphologie des tissus.
- Résultats archivables et quantitatifs. (**Rosa et al., 2013**).

Les méthodes ISH à double couleurs en champ clair pour la détection de l'amplification génique peuvent être utilisés aujourd'hui comme tests cliniques pour sélectionner les patients cancéreux candidats à une thérapie génique personnalisée. A cet effet elles peuvent servir de méthodes alternatives ou complémentaires valables à l'analyse FISH. Récemment des inhibiteurs de MDM2 ont été signalés comme un traitement anticancéreux prometteur. Les patients porteurs de tumeurs avec amplification de l'oncogène MDM2 bénéficieraient d'une thérapie basée sur les antagonistes de MDM2 (**Dei Tos et al., 2000 ; Zhang et al., 2011**).

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été engagés pour évaluer l'efficacité clinique d'inhibiteurs pharmacologiques de MDM2 dans le traitement de différents types de cancers. Plusieurs stratégies ont été développées, incluant l'utilisation d'oligonucléotides anti sens, des approches basées sur l'ARN interférence (Nag et al., 2014). De plus l'interaction entre le suppresseur de tumeur clé p53 et son régulateur négatif MDM2 est un point d'intérêt dans la recherche de médicament contre le cancer dans le concept que la disruption de cette interaction protéine-protéine peut activer la voie de p53 et notamment l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Bill et al., 2015 ; Burgess et al., 2016). Les premières molécules chimiques ayant démontré une activité anti-tumorale, les « chalcones », peuvent se lier à la poche hydrophobique de MDM2 et activent la voie de p53 mais causent également de nombreux effets indésirables, limitant leurs applications (Kumar et al., 2003). Enfin, différents inhibiteurs pharmacologiques de synthèse qui s'insèrent dans la poche impliquée dans l'interaction entre MDM2 et p53 grâce à une forte similitude avec l'interaction entre MDM2 et les acides aminés critiques de p53, la Nutline-3a a montré une forte activité anti-tumorale (Vassilev et al., 2004 ; Hong et al., 2014). Outre, un composé nommé RG7112 (RO5045337, Roche/Genentech) a été synthétisé. C'est un dérivé similaire à la Nutline-3a qui a été spécialement formulé pour une utilisation clinique. (Tovar et al., 2013).

En conclusion les liposarcomes (ALT/WDLPS et DDLPS) sont caractérisés cytogénétiquement par des marqueurs géants et des chromosomes en anneau impliquant la région chromosomique 12q13-15. La région chromosomique 12q13-15 est très complexe et contient plusieurs gènes, dont l'homologue murin double minute 2 (MDM2) qui joue un rôle majeur sur la prolifération cellulaire en tant d'inhibiteur du gène suppresseur de tumeur P53. Les tumeurs amplifiées pour l'oncogène MDM2 présentent les risque de métastase à distance aussi une diminution de la réponse à l'intervention thérapeutique ; Dans cet effet la détermination de statut MDM2 dans les liposarcomes fourni une signification pronostique et thérapeutique. L'hybridation *in situ* est la méthode la plus sensible et précise pour la détection des anomalie dont la CISH qui a l'avantage de pouvoir être évalués sur des échantillons contre-colorés au microscope optique, ce qui est plus confortable et permet une meilleure conjonction avec la morphologie et vue sa la facilité de son utilisation et la fiabilité des résultats elles devenus de plus en plus attribuée à la recherche et la pratique diagnostique de routine.

Conclusion

Conclusion

En conclusion, les résultats confirment bien le rôle de la détection de l'amplification de MDM2 par la CISH dans l'évaluation et le diagnostic des tumeurs de tissu adipeux vue sa sensibilité et spécificité déduit à 100% et 83.3%, respectivement (**kobayashi et al., 2019**). L'oncogène MDM2 comme une ubiquitine ligase inhibiteurs de P53 joue un rôle dans l'homéostasie et la prolifération cellulaire, son amplification induit la perturbation du cycle cellulaire et enfin l'apparition des tumeurs. Il est amplifié dans les liposarcomes et considéré comme marqueur cytogénétique spécifique pour les ALT/WDLPS et DDLPS (Marqueurs chromosomiques géants ou en anneaux).

Les méthodes de l'hybridation *in situ* sont les plus spécifiques et sensibles pour la détermination des anomalies génétiques dont l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est la plus fiable est dite comme un « Etalon-or » pour la détermination de l'amplification de MDM2. Autre, les travaux étudiés la MDM2-CISH comme outil de diagnostic des liposarcomes en comparaison entre les résultats des deux techniques FISH et CISH présente une concordance significative (98%) ce qui valide l'utilisation de la CISH. Donc l'amplification de l'oncogène MDM2 peut être évaluée par la CISH bicolore à fond clair basé principalement sur l'évaluation du rapport MDM2/CHR12

Le diagnostic des tumeurs lipomateuses est basé sur la détermination de l'amplification de MDM2 corrélé aux caractéristiques histologiques ce qui marque l'avantage de la CISH pour la détection de l'amplification de MDM2 et la morphologie tissulaire et cellulaire donc elle peut être une méthode alternative fiable à la FISH en prenant en compte les avantages qu'elle confère par rapport à la FISH. La technique de CISH semble être moins chère et moins exigeante et plus pratique vu qu'elle utilise des microscopes à fond clair et la facilité de son utilisation ; la CISH prend moins de temps et les échantillons peuvent être stockés plus longtemps que les échantillons traités par la FISH. Mais il faut noter qu'on ne peut pas compter sur un examen auxiliaire pour établir le diagnostic final des tumeurs de tissu adipeux mais plutôt l'ensemble des données sur la lésion comme l'histologie et les données cliniques dont le site de la lésion, son diamètre et le critère morphologique et composant. Récemment des inhibiteurs de MDM2 ont été signalés comme un traitement anti-cancéreux prometteur, la Nutline-3a est la plus connue, elle a montré une forte activité anti-tumorale, elle exerce son rôle sur l'interaction MDM2-P53 en se fixant sur la région de liaison de la protéine P53 à l'oncoprotéine MDM2.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Akhdar A., Bronsard M., Lemieux R. et Geha S., 2011. Détermination de l'amplification de l'oncogène HER-2 dans le cancer du sein invasif par hybridation chromogénique *in situ* double couleur (dc-CISH) : étude comparative avec l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH). *Annales de Pathologie*, vol. 31, p. 472–479.
- Arnould L., Denoux Y., MacGrogan, G., Penault-Llorca F., Fiche M., Treilleux I., Mathieu MC., Vincent-Salomon a., Vilain MO., et Couturier J., 2003. Agreement between chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *British Journal of Cancer*, vol. 88(10), p. 1587–1591.
- Asif A., Mushtaq S., Hassan U., Akhtar N., Hussain M., Azam M. et Qazi R. 2018. Hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) pour le diagnostic différentiel des sarcomes des tissus mous. *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 19 (3), p. 655-660.
- Barnum K. J., et O'Connell, M. J, 2014. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Cell Cycle Control*, vol. 1170, p. 29–40.
- Ben Salha Imen, Zaidi Shane, Noujaim Jonathan, Miah Aisha B., Fisher Cyril, Jones Robin L., et Thway Khin ,2016. Rare aggressive behavior of MDM2-amplified retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma, with brain, lung and subcutaneous metastases. *Rare Tumors*, vol. 8, p. 105-108.
- Chignon-Sicard Bérengère, 2018. Analyse moléculaire du tissu adipeux humain en fonction de sa localisation anatomique et effet du PRP (Plateled Rich Plasma) sur les progéniteurs adipeux humains (ASCs). Université Côte d'Azur. Thèse de doctorat, 40 pages, p.30.
- Cho J., Lee SE. et Choi, Y.L., 2012. Valeur diagnostique de la fluorescence MDM2etDDIT3 *In Situ* Hybridization in Liposarcome Classification: A Single-Institution Experience. *Journal coréen de pathologie*, vol. 46 , p. 115.122.
- Clay M. R., Martinez A. P., Weiss S. W. et Edgar M. A., 2016. MDM2 and CDK4 Immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 40, p. 1647–1652.
- Coindre Jean-Michel, Pédeutour Florence, et Aurias Alain, 2009. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Archiv*, vol. 456, p. 167–179.
- Creytens David, 2019. What's new in adipocytic neoplasia? *Virchows Archiv*.
- Dei Tos AP., Doglioni C., Piccinin S., et al., 2000. Coordinated expression and amplification of the MDM2, CDK4, and HMGI-C genes in atypical lipomatous tumours. *J Pathol*. Vol. 190, P.531-536.
- Feeley Kyle P., Adams Clare M., MirtaRamkrishna et Eischen Christine M., 2017. Mdm2 is required for survival and growth of p53-deficient cancer cells. *Cancer Research*, vol. 77, p. 3823- 3833.
- FletcherC. D. M., 2006. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. *Histopathology*, vol. 48, p. 3–12.

- Hao Qian, Wang Jieqiong, Chen Yajie, Wang Shanshan, Cao Mingming, Lu Hua, et Zhou Xiang, 2020. Dual regulation of p53 by the ribosome maturation factor SBDS. *Cell Death & Disease*, vol.11, p.1-15.
- Horvai A. E., Devries S., Roy R., O'Donnell R. J. et Waldman F, 2009. Similarity in genetic alterations between paired well-differentiated and dedifferentiated components of dedifferentiated liposarcoma. *Modern Pathology*, Vol. 22, p. 1477–1488.
- Hou Helei, Sun Dantong et Zhang Xiaochun, 2019. The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. *Cancer Cell International*, vol. 19, p. 1-8.
- Iwakuma Tamoo et Lozano Guillermina, 2003. MDM2, an introduction. *Molecular cancer research*, Vol. 1, p. 993–1000.
- Karen Fritchie, Jordan Renner, Kathleen Rao et Robert Esther, 2012. Osteolipoma: radiological, pathological, and cytogenetic analysis of three cases. *Skeletal Radiol*, vol. 41, p. 237-244.
- Kobayashi Anna, Sakuma Toshiko, Fujimoto Masayo, Jimbo Naoe et Hirose Takanori, 2019. Diagnostic Utility and Limitations of Immunohistochemistry of p16, CDK4, and MDM2 and Automated Dual-color *In Situ* Hybridization of MDM2 for the Diagnosis of Challenging Cases of Dedifferentiated Liposarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, vol. 27, p. 758-763.
- Lambros M.B., Natrajan R., Reis-Filho J.S. 2007. Chromogenic and fluorescent *in situ* hybridization in breast cancer. *Hum Pathol* , vol. 38, p. 1105-1122.
- Lopez-Meija I.-C., Lagarrigue S., et Fajas L, 2014. Rôle des régulateurs du cycle cellulaire dans le contrôle métabolique de la cellule cancéreuse. *Obésité*, vol. 9, p.177–181.
- Macarenco R.S., Erickson-Johnson M., Wang X., Folpe A.A., Rubin B.P., Nascimento A.G. et Oliveira A.M., 2009. Tumeurs lipomateuses rétropéritonéales sans atypie cytologique: s'agit-il de lipomes? Une étude clinicopathologique et moléculaire de 19 cas. *Suis J Surg Pathol*, vol. 33, p. 1470-1476.
- Madrid M.A. et Lo R.W., 2004. Hybridation chromogène *in situ* (CISH): une nouvelle alternative dans le dépistage d'échantillons de tissus de cancer du sein d'archives pour le statut HER-2 / neu. *Recherche sur le cancer du sein*, vol. 6 (5), p. 593 600.
- Manfredi James J., 2010. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Development*, vol.24, p. 1580–1589.
- Mardekian Stacey K., Solomides Charalambos C., Gong Jerald Z., Peiper Stephen C., Wang Zi-Xuan, et Bajaj Renu, 2015. Comparison of Chromogenic *In Situ* Hybridization and Fluorescence *In Situ* Hybridization for the Evaluation of MDM2 Amplification in Adipocytic Tumors. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 29, p. 462-468.
- Mariño-Enríquez A., Fletcher C. D. M., Cin P. D. et Hornick J. L., 2010. Dedifferentiated liposarcoma with 'homologous' lipoblastic (Pleomorphic Liposarcoma-like) differentiation: clinicopathologic and molecular analysis of a series suggesting revised diagnostic criteria. *American Journal of Surgical Pathology*, Vol. 34, p. 1122–1131.

- McTighe Shane et Chernev Ivan, 2014. Intramuscular Lipoma: A Review of the Literature. *Orthopedic Reviews*, vol. 6, p.156-163.
- Mehdi M.M., Sajid A., Noreen H.? Usman L., Asif H. et Mudassar A.M. 2017. Soft Tissue Tumours with Epithelioid Morphology. *Journal of Rawalpindi Medical College*, vol. 21 p1 37-4..
- Mendoza Michael, Mandani Garni et Momand Jamil, 2014. The MDM2 gene family. *Biomol Concepts*, vol. 5, p. 9-19.
- Miura Y., Keira Y., Ogino J., Nakanishi K., Noguchi H., Inoue T., Hasegawa T., 2012. Détection d'anomalies génétiques spécifiques par hybridation *in situ* de fluorescence dans les tumeurs des tissus mous. *Pathol Int*, vol. 62, p. 16-27.
- Mok Myth T., Zhou Jingying, Tang Wenshu , Zeng Xuezhen, Oliver Antony W., Ward Simon E., Cheng Alfred S.,2018. CCRK is a novel signalling hub exploitable in cancer immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 186,p. 138-151.
- Mollerup J., Henrikse U., Müller S., et Schønau A., 2012. Hybridation *in situ* chromogène bicolore pour la détermination du statut HER2 dans le cancer du sein: une grande étude comparative à l'hybridation *in situ* de fluorescence actuelle de pointe. *Pathologie clinique BMC*, vol.12, p. 1-7.
- Naski N, Gajjar M, Bourougaa K, Malbert-Colas L, Fahraeus R, et Candeias MM, 2009. The p53 mRNA-Mdm2 interaction. *Cell Cycle*. Vol.8, p. 31-34.
- Ofir-Rosenfeld Y., Boggs K., Michael D., Kastan M. B., et Oren, M, 2008. Mdm2 Regulates p53 mRNA Translation through Inhibitory Interactions with Ribosomal Protein L26. *Molecular Cell*, vol.32, P. 180–189.
- Oliner J. D., Kinzler K. W., Meltzer P. S., George D. L., et Vogelstein B., 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, vol.358, p.80–83.
- Outh-Gauer S., Augustin J., Mandavit M., Grard O., Denize T., Nervo M., Lépine C., Rassy M., Tartour E. et Badoual C., 2019. L'hybridation chromogène *in situ* comme outil de diagnostic du cancer de la tête et du cou lié au VPH. *J. Vis. Exp.* Vol. 148.
- Palma Di., Collins S., Faulkes N., Ping C., Ferns B., Haagsma G., Layer G., Kissin M W. et Cook, M. G., 2006. Chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 60(9), p.1067–1068.
- Ramzan Fahad, Younis Adnan et Lim Ki-Byung, 2017. Application of Genomic *In Situ* Hybridization in Horticultural Science. *International Journal of Genomics*, p. 1-12.
- Rosa F.E., Santos R.M., Rogatto S.R., et Domingues M.A.C., 2013. Chromogenic *in situ* hybridization compared with other approaches to evaluate HER2/ neu status in breast carcinomas. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 46, p. 207-216.

- Riscal Romain, 2016. L'oncogène Mdm2 : nouvelles fonctions et implications dans le métabolisme des cellules cancéreuses. *Endocrinologie et métabolisme*. Université Montpellier. Thèse de doctorat, 164 pages, p. 20-26
- Schmucker S., et Sumara, I., 2014. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Molecular & Cellular Oncology*, vol. 1, p. 1-9.
- Sirvent N., Coindre J.-M., Maire G., Hostein I., Keslair F., Guillou L., dominique R-V., Terrier P., et Pedeutour F., 2007. Detection of MDM2-CDK4 Amplification by Fluorescence *In Situ* Hybridization in 200 Paraffin-embedded Tumor Samples: Utility in Diagnosing Adipocytic Lesions and Comparison With Immunohistochemistry and Real-time PCR. *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 31, p. 1476–1489.
- Soussi T., 2000. Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53. *Médecine/Sciences*, vol.16, p. 469-72.
- Speicher M. R., et Carter N. P., 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, vol. 6(10), p. 782–792.
- Stojanov I.J., Mariño-Enriquez A., Bahri N., Jo VY. et Woo S.-B., 2018. Lipomas of the Oral Cavity: Utility of MDM2 and CDK4 in Avoiding Overdiagnosis as Atypical Lipomatous Tumor. *Head and Neck Pathology* , vol. 13, p. 169-176.
- Tan Ban Xiong, Peng Liew Hoe, Chua Joy S, Ghadessy Farid J., Tan Yaw Sing, Lane David P., et Coffill Cynthia R., 2017. Anatomy of Mdm2 and Mdm4 in evolution. *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 9, p. 3-15.
- Tanner M., Gancberg D., Di Leo A., Larsimont D., Rouas G., Piccart MJ et Isola J., 2000. Hybridation *in situ* chromogène. *L'American Journal of Pathology*, vol. 157 (5), p. 1467-1472.
- Thway K., Rockcliffe S., Gonzalez D., Swansbury J., Min T., Thompson L. et Fisher C., 2010. Utilité de l'analyse des gènes de fusion spécifiques au sarcome dans du matériel inclus en paraffine pour le diagnostic de routine dans un centre spécialisé. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 63, p. 508–512
- Thway K., Wang J., Swansbury J., Min T., Et Fisher C., 2015. Fluorescence *In Situ* Hybridization forMDM2Amplification comme outil de diagnostic auxiliaire de routine pour les liposarcomes suspectés bien différenciés et dédifférenciés: expérience dans un centre tertiaire. *Sarcome*, p. 1–10.
- Trayhurn P., et Beattie J. H.,2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 60, p. 329–339.
- Travis W. D., Brambilla E., Nicholson AG., 2016. Testing for neuroendocrine immunohistochemical markers should not be performed in poorly differentiated nscs in the absence of neuroendocrine morphologic features according to the 2015 WHO Classification. *J Thorac Oncol*, vol.11, p.26—7.
- Tripathy D., Bardia A., et Sellers W. R.,2017. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, vol.23, p. 3251–3262.

- Ventura RA., Martin-Subero JI., Jones M., McParland J., Gesk S, et Mason DY., 2006. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*, vol. 8, p. 141—51.
- Volpi C.C., Gualeni V., Pietrantonio F., Vaccher E., Carbone A. et Gloghini A., 2018. BRIGHT-FIELD *IN SITU* HYBRIDIZATION DETECTS GENE ALTERATIONS AND VIRAL INFECTIONS USEFUL FOR PERSONALIZED MANAGEMENT OF CANCER PATIENTS. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 3, P. 259-277.
- Wagner F., Streubel A., Roth A., Stephan-Falkenau S., et Mairinger T., 2013. L'hybridation chromogène *in situ* (CISH) est une méthode puissante pour détecter les carcinomes pulmonaires non à petites cellules ALK-positifs. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 67 (5), p.403–407.
- Wang Xinjiang, 2011. p 53 regulation Teamwork between RING domains of Mdm2 and MdmX. *Cell Cycle*, vol. 10, p. 4225-4229.
- Weaver Joshua, Downs-Kelly Erinn, Goldblum John R., Turner Sondra, Kulkarni Sucheta, Tubbs Raymond R., Rubin Brian P. et Skacel Marek, 2008. Fluorescence *in situ* hybridization for MDM2 gene amplification as a diagnostic tool in lipomatous neoplasms. *Modern Pathology*, vol. 21, p. 943-949.
- WHO classification of tumours.5th Edition. 2020. Soft Tissue and bone Tumours.
- Wong D.D., Low I.C., Peverall J., et al., 2016. MDM2/CDK4 gene amplification in large/deep-seated 'lipomas': incidence, predictors and clinical significance. *Pathology*. Vol.48(3), p.203-209.
- Zhang Gloria, Lanigan Christopher, Goldblum John, Tubbs Raymond et Downs-Kelly Erinn, 2016. Automated Bright-Field Dual-Color *In Situ* Hybridization for MDM2. *Arch Pathol Lab Med*, vol. 140, p. 1111-1115.
- Zhang H., Erickson-Johnson M., Wang X., Oliveira J. L., Nascimento A.G., Sim F.H., Wenger D.E., Zamolyi R.Q., Pannain V.L., et Oliveira A. M., 2010. Molecular Testing for Lipomatous Tumors: Critical Analysis and Test Recommendations Based on the Analysis of 405 Extremity-based Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology*, vol.34, p. 1304–1311.
- Zhang W., McElhinny A., Nielsen A., et al. 2011, Automated brightfield dual-color *in situ* hybridization for detection of mouse double minute 2 gene amplification in sarcomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Vol.19, p.54-61.
- Zhao Yuhan, Yu Haiyang, et Hu Wenwei, 2014. The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 46, p. 180–189.
- Zheng T., Wang J., Zhao Y., Zhang C., Lin M., Wang X., Yu H., Liu L., Feng Z., et Hu W., 2013. Spliced MDM2 isoforms promote mutant p53 accumulation and gain-of-function in tumorigenesis. *Nat Commun*, vol.4, p. 1-12.

Les annexes

Annexe 1 : liste du matériel non biologique

Produits chimiques	Appareillages	Autre matériels
Formol	Automate (Leica TP1020)	Cassettes Perforées En
Ethanol	Microtome	Plastique
Xylène	Bain Marie	Lame
Hématoxyline De Harris	Etuve	Paraffine
Eosine	Microscope Photonique	Eukitt
		Zytodot [®] SPEC
		MDM2/CEN 12 Probe Kit
		Zytodot [®] 2C CISH
		Implementation Kit

Annexe 02 : Titres des articles inclus avec objectifs.

Références	Titre	Objectifs
(Zhang et al.,2011)	Automated Brightfield Dual-Color <i>In Situ</i> Hybridization for Detection of Mouse Double Minute 2 Gene Amplification in Sarcomas	Cette étude a été menée pour évaluer la sensibilité et la spécificité de l'hybridation <i>in situ</i> chromogénique CISH (DDISH automatisé) pour la détection de l'Amplification de gène MDM2 (et CHR12) dans 100 cas de sarcomes
(Zhang et al.,2016)	Automated Bright-Field Dual-Color <i>In Situ</i> Hybridization for MDM2	L'objectif de cette recherche était d'étudier l'utilité de diagnostic des tumeurs lipomateuses par la CISH-MDM2 dans une série de 102 cas de tumeurs adipeuses.
(Kobayashi et al.,2019)	Diagnostic Utility and Limitations of Immunohistochemistry of p16, CDK4, and MDM2 and Automated Dual-color <i>In Situ</i> Hybridization of MDM2 for the Diagnosis of Challenging Cases of Dedifferentiated Liposarcoma	Cette étude évalue l'utilité des marqueurs cytogénétique pour la diagnostique des cas difficile de DDLPS par l'IHC et CISH dans une série de 11 DDLPS et 17 liposarcome non lipogènes.
(Mardekian et al.,2015)	Comparison of Chromogenic <i>In Situ</i> Hybridization and Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization for the Evaluation of MDM2 Amplification in Adipocytic Tumors	Cette étude s'agit de comparaison de la CISH et la FISH pour l'amplification de MDM2 dans une série de 41 tumeurs adipeuses (19 bénins et 22 malins)

Annexe 3. Données Cliniques, diagnostic et résultats d'IHC et DISH pour 11 cas de DDLPS (Kobayashi et al., 2019).

Case	Age/ Sex	Location	Specimen	Diagnosis	Immunohistochemistry			DISH	Comments
					p16	CDK4	MDM2	MDM2	
1	40/M	Rt. Thigh	Biopsy	DDLPS	3+	2+	2+	+	Surgical specimens corresponded to DDLPS
2	66/F	Lt. thigh	Biopsy	DDLPS	3+	3+	3+	+	Surgical specimens corresponded to DDLPS
3	60/F	Lt. axilla	Biopsy	DDLPS	3+	3+	3+	+	Lipomatous components were observed in MRI
4	70/F	Lt. thigh	Biopsy	DDLPS	3+	2+	3+	+	Lipomatous components were observed in MRI
5	35/M	Pelvis	Biopsy	DDLPS	3+	3+	3+	+	A few lipoblasts were present in the specimen
6	85/M	Spermatic cord	Surgery	DDLPS	3+	3+	3+	+	ALT was present in primary, but not in recurrence
7	63/M	Lung	Surgery	DDLPS	3+	3+	3+	+	ALT was present in primary, but not in metastasis
8*	74/M	Retroperitoneum	Surgery	DDLPS	3+	ND	3+	+	ALT was present in primary, but not in recurrence
9	77/M	Rt. Thigh	Surgery	DDLPS	3+	3+	3+	+	Whorl structures and metaplastic bones were present
10	70/M	Lt. buttock	Surgery	DDLPS	3+	3+	3+	+	ALT was present in primary, but not in metastasis
11	93/M	Lt. scrotum	Surgery	DDLPS	3+	3+	2+	+	ALT was present in primary, but not in recurrence
12	68/M	Lt. lower leg	Surgery	LMS	3+	3+	3+	+	The diagnosis was revised as DDLPS
13	79/M	Rt. Inguinal	Surgery	LMS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
14	80/F	Lt. shoulder	Surgery	LMS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
15	72/M	Lt. thigh	Surgery	LMS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
16	60/F	Uterus	Surgery	LMS	3+	3+	0	-	The diagnosis was retained
17	53/F	Uterus	Surgery	LMS	3+	3+	0	-	The diagnosis was retained
18	74/M	Rt. Thigh	Surgery	MFS	0	3+	0	-	The diagnosis was retained
19	63/M	Rt. Thigh	Surgery	MFS	3+	3+	0	-	The diagnosis was retained
20	70/M	Lt. thigh	Surgery	MFS	3+	0	0	ND	The diagnosis was retained
21	73/M	Lt. upper arm	Surgery	MFS	3+	1+	0	-	The diagnosis was retained
22	70/M	Rt. lower leg	Surgery	MFS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
23	77/M	Rt. chest wall	Surgery	UPS	3+	3+	3+	+	The diagnosis was revised as DDLPS
24	85/M	Lt. chest wall	Surgery	UPS	0	2+	3+	+	Superficial UPS with MDM2 amplification
25	77/F	Mesentery	Surgery	UPS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
26	72/F	Lt. thigh	Surgery	UPS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
27	82/M	Rt. Back	Surgery	UPS	0	0	0	ND	The diagnosis was retained
28	38/M	Abdominal wall	Surgery	UPS	3+	2+	0	-	The diagnosis was retained

0: négatif (0%); 1+ : faiblement positif (<10%); 2+ : focalement positif (10% à 50%); 3+ : diffusément positif (<50%); (+) : significativement amplifié ; (-) : pas significatif.

ALT : tumeur lipomateuse atypique ; DDLPS : liposarcome dédifférencié ; DISH : hybridation *in situ* bicolore ; F : femme ; M : homme ; Lt : left ; Rt : Right ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; ND : pas fait.

