Université de Bordeaux

Audrey MICHOT

Née le 20 Octobre 1983

Projet PériSARC : Identification de facteurs morphologiques et moléculaires prédictifs de rechute dans les sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc

Thèse dirigée par M. le Docteur François LE LOARER, MD, PhD, Professeur des universités

Soutenue publiquement le 16 juin 2023

Jury

Mme le Docteur MATHOULIN, MD, PhD, Professeure des universités, Président du Jury

Mme le Docteur BONVALOT, MD, PhD, Professeure des universités, Rapporteure

Mme le Docteur LIGUORO, MD, PhD, Professeure des universités

M. le Docteur BUSCAIL, MD, PhD, Professeur des universités

Mme le Docteur DUTOUR Aurélie, PhD, Rapporteure

Travail réalisé au sein du laboratoire BRIC, Bordeaux Institute of Oncology – U 1312 Inserm et Université de Bordeaux










SOROPTIMIST
INTERNATIONAL


Bergonié
UNICANCER
NOUVELLE-AQUITAINE

Remerciements

Résumé : Les sarcomes sont des tumeurs conjonctives malignes rares et représentent 2/100.000 nouveaux cas par an. Il s'agit d'un groupe hétérogène de tumeurs, généralement de mauvais pronostic. La chirurgie reste à ce jour le seul traitement curatif. Ces tumeurs peuvent récidiver même après une chirurgie considérée comme optimale, classée R0 c'est à dire sans reliquat microscopique (dans environ 10% des cas). Différents facteurs anatomocliniques pronostiques de rechute sont identifiés, incluant la taille tumorale initiale, le grade histologique FNCLCC et la localisation tumorale profonde. A l'heure actuelle, on ne dispose d'aucun marqueur prédictif du risque individuel de récidive au décours d'une prise en charge chirurgicale curative de sarcome. L'identification de facteurs prédictifs de rechute permettrait de mieux cibler les traitements adjuvants sur les patients à haut risque de rechute et de proposer une surveillance radio-clinique accrue.

Jusqu'ici, les études se sont concentrées sur les caractéristiques des cellules tumorales mais n'ont jamais pris en compte les marges tissulaires. La marge constitue l'interface entre le tissu tumoral et le tissu sain, il s'agit d'un tissu remanié situé au contact direct des cellules tumorales. Le mode d'infiltration des cellules tumorales diffère d'une tumeur à l'autre et pourrait moduler ou refléter le risque de rechute locale. Une signature moléculaire de tissu sain prédictive de rechute locale a ainsi été mise en évidence dans le carcinome hépatocellulaire mais aucune donnée n'est disponible dans les sarcomes. Mon projet de thèse vise à identifier des facteurs prédictifs de rechute tumorale locale en étudiant de façon systématique et comparative la tumeur et ses zones périphériques, incluant la zone tumorale centrale (Tc), zone tumorale périphérique (Tp), le tissu péritumoral sain au contact des cellules tumorales (TS-R1) et le tissu sain à distance (TS) dans une série rétrospective de 144 sarcomes des tissus mous.

Le premier volet a caractérisé l'infiltrat immunitaire associé aux sarcomes en étudiant systématiquement la marge tissulaire avec un focus sur les structures lymphoïdes tertiaires (TLS), facteurs prédictifs de réponse à l'immunothérapie dans les sarcomes à l'aide d'une étude microscopique et immunohistochimique des prélèvements. La distribution des TLS prédomine dans la marge tumorale et semble être corrélée à un meilleur pronostic.

Le second volet a étudié par deep learning (DL) les différentes zones tumorales à l'aide de lames scannées afin de mettre en évidence de nouveaux facteurs morphologiques prédictifs

inconnus et une signature DL prédictive de rechute locale. Le score du DL dépasse les courbes de survie associées au grade FNCLCC, standard utilisée en clinique.

Une 3e approche a comparé le transcriptome des différentes zones tumorales déterminé par *whole RNA-sequencing* afin d'identifier des biomarqueurs dérégulés de façon différentielles dans les différentes zones et de déterminer les signatures immunologiques entre les différents territoires. Des gènes d'intérêt ont été mis en évidence dans la zone marginale pouvant être associé au risque de rechute. Enfin une analyse spatiale transcriptomique par technique *Visium* a été réalisée sur quelques cas à titre exploratoire.

Notre étude a ciblé des biomarqueurs corrélés au risque de rechute qui pourraient permettre à l'avenir d'identifier les patients à haut risque de rechute afin de personnaliser leur suivi et valider des modalités thérapeutiques complémentaires.

Mot clefs : Sarcomes des tissus mous ; prédiction de la rechute ; récidive ; capsule péritumorale ; marges ; deep learning ; structures lymphoides tertiaires ; analyse transcriptomique.

Abstract

Identification of morphological and molecular predictive factors of recurrence in soft tissue sarcomas of the limbs and trunk wall

Sarcomas are rare malignant mesenchymal tumors that represent 2/100,000 new cases per year. They represent a heterogeneous group of tumors, generally associated with a poor prognosis. Surgical resection remains the only curative treatment. These tumors can recur even after optimal surgery, classified R0, i.e. without microscopic residue (in about 10% of cases). Different pathological prognostic factors are known, including initial tumor size, FNCLCC histological grade scheme and deep tumor location. At present, there is no available marker to predict the risk of recurrence following curative surgical resection of a sarcoma, which complicates the clinical decision making.

So far, studies have focused on the features of tumor cells but the features of tissue margins surrounding sarcoma cells are unknown. The margin constitutes the interface between the tumor tissue and the healthy tissue, it is a remodeled tissue located in direct contact with the tumor cells. The mode of tumor cell infiltration differs from one tumor to another and could

modulate or reflect the risk of local relapse. Interestingly, a molecular signature predictive of local relapse has been identified in hepatocellular carcinoma by studying of the “healthy tissue”, but no data is available in sarcomas. This thesis project aims at identifying predictive factors of local tumor relapse by systematically and comparatively studying the tumor and its peripheral zones, including the central tumor zone (Tc), peripheral tumor zone (Tp), healthy peritumoral tissue in contact tumor cells (HT-R1) and remote healthy tissue (HT) in a retrospective series of 144 soft tissue sarcomas.

In a first part, we have characterized the immune infiltrate associated with sarcomas by systematically studying the tissue margin with a focus on tertiary lymphoid structures (TLS), a predictive factor of response to immunotherapy in sarcomas using microscopy and immunohistochemistry. The distribution of TLS predominates in the tumor margin and seems to be correlated with a better prognosis.

The second part studied by deep learning (DL) the different tumor areas using scanned slides to highlight new unknown predictive morphological factors correlated with relapse and to establish a predictive Deep learning (DL) signature of local relapse. The DL score exceeds the survival curves associated with the FNCLCC grade; the current gold standard used to assess patient risk in clinical practice.

A third approach compared the transcriptome of the different tumor areas determined by *whole RNA-sequencing* to identify deregulated biomarkers in the different areas and to determine the immunological signatures in the different territories. Genes of interest have been highlighted in the marginal zone that may be associated with the risk of relapse. Finally, a spatial transcriptomic analysis by *Visium* technique was carried out on a few cases on an exploratory basis.

Our study has evidenced biomarkers correlated with a higher risk of relapse that could allow in the future to identify high risk patients to personalize their follow-up and validate complementary therapeutic modalities.

Keywords : soft-tissue sarcoma; prediction ; relapse ; recurrence ; peritumoral area ; margin ; tertiary lymphoid structures ; deep learning ; transcriptomic analysis.

Table des matières

Université de Bordeaux 1

Remerciements 4

Résumé 5

Abstract 6

Abréviations 12

Abréviation des gènes et des protéines 13

Introduction 15

A. Généralités sur les sarcomes 15

Grade FNCLCC 18

Traitements 20

La chirurgie 22

La radiothérapie 25

La perfusion de membre isolée 25

La chimiothérapie 25

La thérapie ciblée 26

L'immunothérapie 26

B. Caractérisation moléculaire des sarcomes 27

Sarcomes à génétique simple 27

Sarcomes à translocation 27

Mutations activatrices ou inhibitrices 29

Les sarcomes avec amplification génomique récurrente 30

Les sarcomes à génétique complexe 32

Facteurs pronostiques des sarcomes des tissus mous 33

Hétérogénéité des tumeurs et des sarcomes 34

Problématique, Enjeux du projet et questions posées 36

C. Résultats 37
Partie 1 . Mise en évidence de l'identité du tissu péritumoral et corrélation avec la rechute 37
Apport de cette première étude 47
Partie 2 : Identification de critères morphologiques de rechute dans les sarcomes des tissus mous 48
Identification de critères morphologiques de rechute 48
Partie 2.A les Structures lymphoides tertiaires 48
Identification de biomarqueurs immunologiques dans l'environnement péritumoral prédictif du risque de rechute locale 48
Ou Valeur pronostique des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans les sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc opérés d'emblée 48
Rationnel de l'étude 48
Figure 1. Cycle de l'immunité antitumorale 50
Méthodologie détaillée 55
Objectif principal 55
Objectifs secondaires 55
Analyse statistique 55
Analyses explicatives 56
Modèles de survie : 56
Résumé de l'étude TLS 57
Apport de ce travail 73
Partie 2.B DEEP LEARNING 75
A Deep Attention-MIL framework to predict survivals of soft-tissue sarcoma **Erreur ! Signet non défini.**
from Whole Slide Images ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Apport de cet article 78
Matériel 78

Choix de la cohorte 78
Relecture et enregistrement des lames 78
Méthode : Entraînement de modèle et stratégies d'expérimentation 79
Première série d'expérimentation : 82
Deuxième série d'expérimentation : 82
Résultats sur la région analysée pour la prédiction du score 83
Sur une région individuelle 88
Facteurs pronostiques 89
Résultats 89
Conclusion ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Partie 3 : Identification de biomarqueur prédictif de rechute 104
Vers une signature moléculaire 105
Déroulement de la recherche : Matériel et méthodes 105
a. Recueil des pièces tumorales et sélection de la cohorte de travail 105
b. Critères d'inclusion et de non-inclusion 106
Critères de non-inclusion 106
c. Protocole de recueil anatomo-pathologique 106
d. Caractérisation du profil transcriptomique 107
Extraction d'ARN à partir de bloc paraffine FFPE avec l'extracteur d'acides nucléiques Maxwell® RSC utilisé en Pathologie Moléculaire (Promega) 107
Contrôle de la quantité et de la qualité de l'ARN : 108
Séquençage haut débit ARN par True seq RNA Exome (Illumina) 108
Analyse des données et Bio-informatique 111
Complementary analysis : 124
High troughpout transcriptomic analysis of 8 UPS 124

Analyse ancillaire de l'infiltrat immunitaire au sein de la capsule péritumorale par technique visium 124

Est-ce que le mode d'infiltration de la tumeur a un rôle dans la rechute locale ? 124

Premier cas 126

D.Conclusion et perspectives 132

ADORA2B ou la nouvelle cible prédictive de la rechute 133

Rationnel: 133

Retombées attendues / perspectives 136

Références 136

Abréviations

ADM-2: aberration detection method
ADN: Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique

CD : cellules dendritiques
CGH: comparative genomic hybridation
CINSARC: Complexity Index in SARComas

DL : deep learning

EWS-FLI : Ewing sarcoma breakpoint region 1- Frient leukemia integration
ESMO: European society of medical oncologists

FFPE : formalin-fixed, parraffin-embedded
FISH: fluorescence in situ hybridization
FNCLCC : Fédération Française des Centres de Lutte contre le cancer

GIST: gastrointestinal stromal tumor
GI: Genomic index
GO: gene ontology
GSF-GETO: Groupe sarcome Français- Groupe d'étude des tumeurs osseuses
Gy: gray

ICD-O : international classification of diseases for oncology
IHC : immunohistochimie
IRM : imagerie par résonance magnétique

LMS: léiomyosarcome
LPS: liposarcome

MDM2: Mouse double minute 2 homolog
MEC: matrice extracellulaire
MFS: myxofibrosarcome
MMP: métalloprotéases
Mm : millimètres

NETSARC: French clinical reference network for soft-tissue and visceral sarcomas
NK : natural killer

OMS : organisation mondiale de la santé
OS: overall survival

PCR: polymerase chain reaction

R0 : résection in sano
R1 : maladie microscopique résiduelle
RNA : ribonucleic acid
RNA seq: RNA sequencing
RMS: rhabdomyosarcome

STM: sarcome des tissus mous
STS: soft-tissue sarcoma
SS: synovialosarcome

T: tumeur
TLS: strutures lymphoides tertiaires
TNM : T Tumor , N node, M metastasis
TS: tissu sain

UICC: union internationale contre le cancer
UPS: undifferenciated pleomorphic sarcoma

VIH: virus immunideficient humain

Abréviation des gènes et des protéines

ABCC6 : ATP binding cassette subfamily C membre 6
ACTC1 : actin alpha cardiac muscle 1
ADAMTS12: ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 modif 12
ADORA2B : adenosine A2b receptor
ALPK2 : alpha kinase 2

BGN : biglycan

CD1 : cluster de différenciation 1
CD2 : cluster de différenciation 2
CDK : cycline dependant kinase
CDKN1A : cyclin dependant kinase inhibitor 1A
CDH11 : cadherin 11
CKM : creatine kinase type M
COMP : cartilage oligomerci matric protein
COL1A1: collagen type 1 alpha chain
COL5A1 : collagen type 5 alpha chain
COL10A1: collagen type X alpha 1 chain
CRISPLD2 : cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2

ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase

FAP : fibroblast activation protein alpha

HER-2 : human epidermal growth factor recpetor 2

KIAA1199 : CEMIP: cell migration inducing hyaluronidase 1

LIPG: endothelial lipase
LUM : lumican

MMP2: matrix metallopeptidase 2

MYBPC 1 et2: myosin binding protein C 1, 2
MYH1,2,7,8: mutY DNA glyocsylase 1,2,7 , 8
MYL1: myosin light chain 1
MYLPF: myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle
MYOC : myocilin

NF1: neurofibromin 1

P4HA3: prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3
P21 : CDKN1
P53: tumor protein P53
PD-1: programmed cell death 1
PD-L1: programmed cell death 1 ligand 1
PDGFRA: patelet derived growth factor receptor alpha
POU4F1 : POU class 4 homeobox 1
PTEN : phosphatase and TENsin homolog

RB1: RB transcriptional coexpressor 1

SCG2 : secretogranin II
SMARCA4: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a , member 4
SMARB1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SS18: nBAF crhomatin remodeling complex subunit
SSX1: SSX family member 1

WNT

ZN

Introduction

Dérivé du grec ancien, Σάρκωμα, ou sarcoma signifie excroissance de chair. Les sarcomes sont des tumeurs développées aux dépens des tissus mésenchymateux de soutien de l'organisme. Ces tumeurs malignes sont rares et représentent 2/100.000 nouveaux cas par an (Bauer et al. 2001). Il s'agit d'un groupe hétérogène de tumeurs généralement agressives associées à un mauvais pronostic tant au niveau local que général (Honoré et al. 2015).

A. Généralités sur les sarcomes

Les sarcomes des tissus mous (STM) sont une famille très hétérogène de cancers avec de nombreux sous types histologiques et qui présentent une évolution clinique distincte. Ces tumeurs peuvent affecter l'ensemble des tissus conjonctifs de l'organisme comprenant les muscles striés, les cellules adipeuses, les vaisseaux sanguins, le tissu musculaire lisse, les franges synoviales .... Nous nous intéresserons ici principalement aux tumeurs des parties molles et laisserons ainsi de côté les sarcomes osseux (ostéosarcome ou chondrosarcome en particulier). Selon le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé (OMS), on distingue 12 grandes lignes de différenciation histologiques comprenant au total plus de 150 entités distinctes (Jo et Fletcher 2014).

Table 1 – Lignes de différenciation des tumeurs mésenchymateuses des parties molles. Table adaptée de Fletcher et al (Jo et Fletcher 2014)

Tumeurs	Sous-types
Adipocytaires	13
Fibroblastiques/myofibroblastiques	32
Fibrohistiocytaires	5
Musculaires lisses	2
Périvasculaires	3
Musculaires striées	5
Vasculaires	13
Chondro-osseuses	2
Stromales gastro-intestinales	1

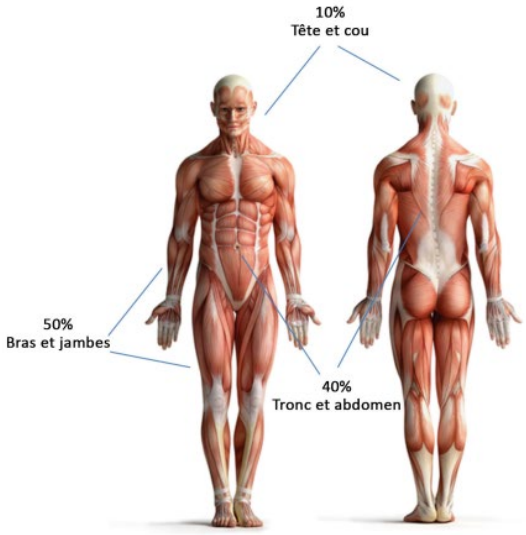
Des gaines nerveuses	14
A differenciation incertaine	22
Indifférenciées	1

Quelques principes généraux ont été appliqués dans cette nouvelle classification :

- Il existe 4 niveaux d'agressivité au sein des tumeurs conjonctives selon l'OMS :
    - Les lésions bénignes dont la quasi-totalité des cas sont diagnostiqués après exérèse chirurgicale qui permet le plus souvent une rémission complète des patients.
    - Les tumeurs à potentiel de récidive locale,
    - Les tumeurs à potentiel métastatique faible,
    - Et les sarcomes, tumeurs à potentiel métastatique élevé.

La classification ICD-O est en accord avec ces potentiels évolutifs. Ces tumeurs posent un réel défi clinique, tant sur le diagnostic que sur la prise en charge thérapeutique (Casali et al. 2018). En France, 4000 nouveaux cas de sarcomes des tissus mous sont diagnostiqués par an, avec un pic de prévalence chez les personnes de plus de 60 ans (Ducimetière et al. 2010; Honoré et al. 2015). Ils représentent moins de 1% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers en France chez l'adulte, et font donc parti des tumeurs rares. Ces tumeurs sont principalement localisées au niveau des membres (majoritairement au niveau des membres inférieurs) puis du tronc (Figure 1).

Figure 1. Classification anatomique des sarcomes (issue du guide des sarcomes basé sur les recommandations de l'ESMO) (Casali et al. 2018)



Les sarcomes des tissus mous sont des tumeurs généralement agressives, avec un risque de rechute locale inhérent à la localisation, à la chirurgie initiale, et à l'histotype. Le risque de rechute métastatique est majoritairement pulmonaire. Certains histotypes particuliers comme les liposarcomes myxoides peuvent présenter des localisations métastatiques au niveau des séreuses, au niveau vertébral, nécessitant alors un bilan plus complet que les autres sarcomes. L'examen de référence est dans ce cas précis l'IRM corps entier associé au scanner thoracique.

Les sarcomes surviennent le plus souvent de manière sporadique. Cependant certains facteurs de risques ont été identifiés tels que :

- Certaines maladies génétiques très rares : rétinoblastome (mutation *RB1*), syndrome de Werner, maladie de Recklinghausen (mutation *NF1 ou NF2*) ou syndrome de Li-Fraumeni (mutation *P53* (Correa 2016))
- L'exposition à des radiations ionisantes (radiothérapie, (Patel 2000)) à des toxiques (chlorure de vinyle, dioxides) ou à des virus (herpès, VIH – Kaposi)
- Le lymphœdème chronique (Farzaliyev et al. 2020) qui est un facteur de risque de survenue d'angiosarcome, parfois lui-même d'origine génétique dans le cadre du syndrome de Stewart-Treves.

Le diagnostic de STM se réfère à la classification histologique publiée par l'OMS, qui repose sur l'observation de la lignée de différenciation tumorale (Jo et Fletcher 2014). Plusieurs sous-types histologiques peuvent correspondre à une même lignée de différenciation. Certaines

caractéristiques cliniques associées à l'aspect macroscopique et microscopique permettent d'orienter vers un diagnostic précis. Des techniques complémentaires sont parfois nécessaires, permettant de mettre en évidence certains marqueurs diagnostiques, que ce soit par immunohistochimie (IHC), par hybridation par fluorescence in situ (FISH) ou l'hybridation génomique comparative (CGH-array).

Lorsqu'une anomalie moléculaire caractéristique d'une entité a été identifiée, la définition de cette entité est à la fois histologique et moléculaire. La présence d'une amplification de *MDM2* permet, associé à l'analyse morphologique de porter le diagnostic de liposarcome.

Grade FNCLCC

Au sein des sarcomes, il existe une hétérogénéité du risque évolutif avec différents grades d'agressivité histologiques et cliniques. Les principaux facteurs cliniques corrélés à l'agressivité tumorale sont l'âge, la qualité de la résection chirurgicale (Blay reference a inserer ?), la localisation de la tumeur (superficielle profonde ou superficielle et profonde) et sa taille (en général < 5cm, de 5 à 10 cm puis > 10cm). Le facteur histopronostique international de référence estle grade histologique établi par la Fédération Française des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC ;(Trojani et al. 1984; Coindre 2006). Celui-ci est construit sur trois critères comprenant la différenciation tumorale, l'index mitotique et la nécrose tumorale (Table 1).

Grade histologique de la FNCLCC	
Score	Description
Différenciation tumorale	
1	Sarcome ressemblant à un tissu normal
2	Sarcome à diagnostic histologique certain
3	Synovialosarcomes, sarcomes épithélioides, à cellules claires, alvéolaires des parties

	molles, rhabdomyosarcomes embryonnaires, sarcomes indifférenciés et sarcomes pour lesquels le type histologique est incertain
Index mitotique	
1	0-9 mitoses / 10 champs
2	10-19 mitoses / 10 champs
3	• 19 mitoses / 10 champs
Nécrose tumorale	
0	Pas de nécrose
1	< 50 % nécrose tumorale
2	50 % nécrose tumorale

Table 1. Grade FNCLCC avec score combiné issus des publications du Pr JM Coindre.

Le score de ces trois critères permet de distinguer trois groupes de tumeurs d'agressivité significativement différentes. Le grade 1 est défini par un score entre 2 et 3 et fait référence à des tumeurs de bon pronostic. Le grade 2 est défini par un score de 4 ou de 5. Il s'agit d'un grade intermédiaire, pour lequel le pronostic évolutif est moins certain (potentiel métastatique possible). Les tumeurs de grade 3 sont définis par un score de 6 à 8 et fait référence à un risque d'évolution métastatique élevé (Figure 2). L'application du grade FNCLCC est décrit initialement sur les pièces opératoires en analysant à la fois la zone centrale et la zone périphérique de la tumeur. Celui-ci est cependant moins reproductible sur des micro-biopsies et/ou sur des patients ayant bénéficié de chimiothérapie ou radiothérapie néoadjuvante (J. M. Coindre et al. 1986; 2001). Par ailleurs, le grade n'est pas utilisé dans certains sarcomes comme les sarcomes d'Ewing, les sarcomes épithélioides, les tumeurs

malignes rhabdoides qui sont par définition de haut grade.

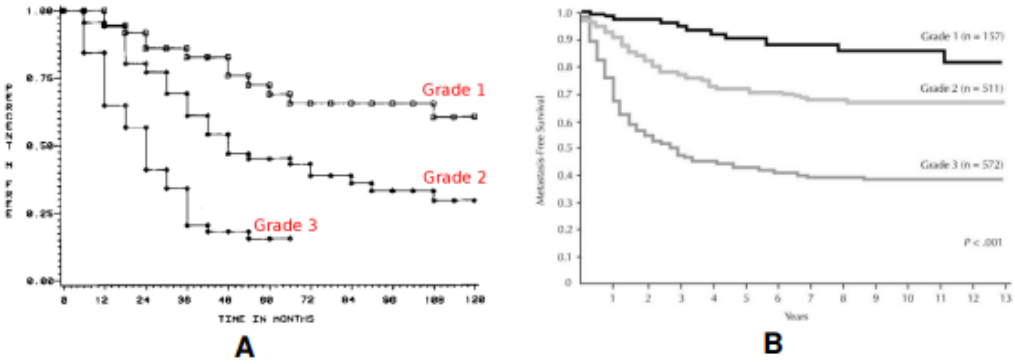


Figure 2 : valeur pronostique du grade FNCLL. A première évaluation pronostique sur une cohorte de 155 patients (adaptée de (Trojani et al. 1984)) et B évaluation pronostique sur une cohorte de 1240 patients (adaptée de (J.-M. Coindre 2006) . Ces analyses présentent des survies sans métastases (en ordonnée) au cours du temps (abscisse) significativement différentes selon le grade FNCLCC.

Traitements

La première étape de la prise en charge de ce type de maladie rare repose sur le diagnostic. Celui-ci passe par la réalisation d'une imagerie et d'une biopsie au trocart rétractable (ESMO/European Sarcoma Network Working Group 2014) . Une biopsie à visée diagnostique doit être réalisée systématiquement avant tout geste chirurgical. Celle-ci est le plus souvent réalisée par le radiologue sous contrôle de l'imagerie et permet ainsi d'éviter les biopsies chirurgicales qui risquent l'essaimage de la maladie à la peau. La biopsie au trocart est fiable et permet de porter le diagnostic de sarcome dans la majorité des cas, si le matériel est suffisant et représentatif. En effet, la détermination de la gravité et donc du grade peut être sous-estimée par un problème d'échantillonnage notamment sur la composante nécrotique. Cette information manquante ou sous-estimée peut être restaurée par l'analyse IRM de la tumeur (Crombé et al. 2019) et aboutît alors à la constitution d'un "grade de consensus pluridisciplinaire" (Eberhard Stoeckle et al. 2009).

En raison de la très grande hétérogénéité de ces tumeurs, une double lecture des cas est systématiquement recommandée dans l'un des centres experts du groupe sarcome français (GSF) grâce au réseau de Références en Pathologie des Sarcomes des tissus mous et des viscères (https://rreps.sarcomabcb.org ; Perrier et al., 2018). Le risque d'erreur diagnostic lors de la première lecture est estimé entre 10 et 25% (Arbiser, Folpe, et Weiss 2001; Ray-

Coquard et al. 2012). Cette relecture permet de relever certains diagnostics d'une catégorie vers une autre dans quasiment 40% des cas. Elle permet également l'enregistrement de toutes ces tumeurs rares dans une base de données nationale, la Conticabase. Cette base de données est une richesse que nous envie d'ailleurs bien d'autres pays et spécialités.

Une fois le diagnostic de sarcome porté, la prise en charge doit être discutée en amont de la chirurgie pour permettre de faire intervenir si besoin les différents acteurs médicaux présents à la réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) : oncologue ou radiothérapeute. Les principales recommandations sont données par les rapports réguliers de l'European Society for Medical Oncology (ESMO, (Casali et al. 2018)). Différentes situations peuvent se présenter, soit la maladie est localisée, soit le malade est en situation métastatique, soit la tumeur est opérable et soit elle ne l'est pas.

Le bilan de la maladie générale passe ce jour par la réalisation d'un scanner thoracique injecté à la recherche de localisations pulmonaires secondaires. L'appréciation de l'opérabilité fait plutôt appel à l'IRM (pour les membres et paroi du tronc) afin d'apprécier les rapports avec les éléments nobles environnants qui sont les facteurs limitants de la chirurgie conservatrice. La visualisation et la discussion des cas en RCP permettent de proposer aux patients, qui présentent des tumeurs de haut garde ou infiltrantes, de bénéficier de traitement préopératoire (chimiothérapie, radiothérapie ou radio chimiothérapie concomitante) dans le but de réduire la taille tumorale et/ ou d'aider à une meilleure délimitation de celle-ci (Grabellus et al. 2013). Les traitements néo adjuvants en permettant l'épaississement de la capsule péritumorale, augmentent les possibilités de chirurgie d'exérèse conservatrice. A l'aide d'une chirurgie bien plannifiée, la chirurgie du sarcome permet un contrôle local dans 90% des cas (Eberhard Stoeckle et al. 2009; Alessandro Gronchi et al. 2010; Sylvie Bonvalot et al. 2017). De même l'évolution de la chirurgie actuelle vise une récupération fonctionnelle maximale.

Les recommandations thérapeutiques sont résumées dans cette Figure 3 issue de l'ESMO

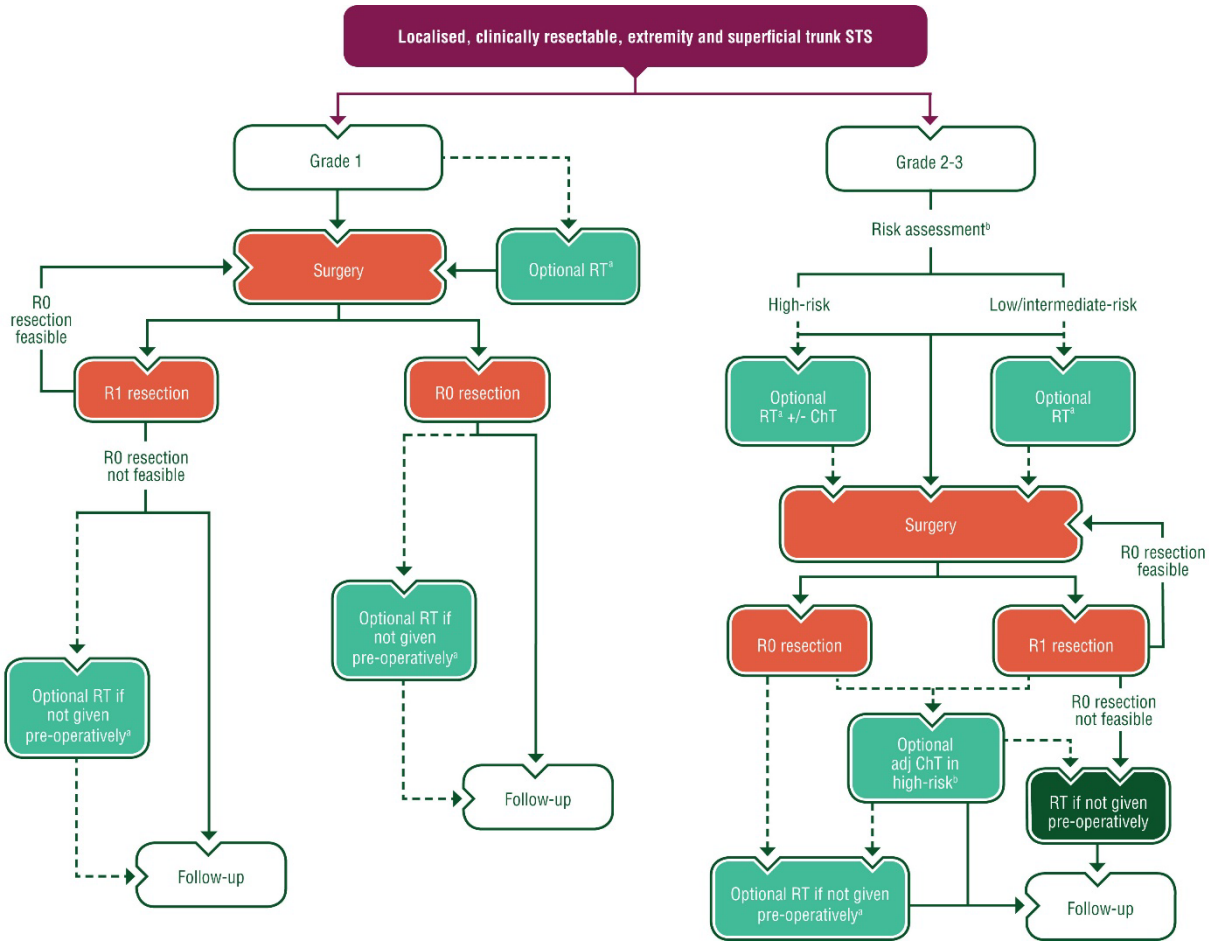


Figure 3: recommandations de prise en charge des STS localisés et résécables. La première branche décisionnelle correspond au grade FNCLCC, actuel facteur pronostique de référence dans les STS. MDT= multidisciplinary team= réunion de concertation multidisciplinaire, RT: radiothérapie, ChT: chimiothérapie. Issue de Gronchi 2021 (A. Gronchi et al. 2021).

La chirurgie

La chirurgie est le seul traitement curatif dans la prise en charge des sarcomes des tissus mous. Celle-ci est une chirurgie conservatrice avec à la fois un objectif oncologique mais également un objectif de fonction qui est associé à la qualité de vie dans l'après cancer. En effet l'évolution de la chirurgie des sarcomes est passé de l'amputation, à la chirurgie pluri-compartimentale vers la chirurgie compartimentale puis vers la chirurgie conservatrice. Même en cas de chirurgie radicale (amputation de membre), environ 30 % des patients voient se développer des métastases, qui conduisent au décès dans la majorité des cas (S. Bonvalot et al. 2006; Billingsley et al. 1999).

A ce jour, le taux d'amputation au niveau des membres est réduit à environ 2 % (Eberhard Stoeckle et al. 2009). La chirurgie est donc spécifique, spécialisée, et doit prendre en compte la connaissance des différents histotypes et du grade de la tumeur. La technique chirurgicale est l'exérèse monobloc plannifiée, c'est à dire l'exérèse d'un tenant de la tumeur et des marges de tissu sain sans voir la tumeur ni l'ouvrir dans le tissu sain avoisinant. La voie d'abord est placée directement en regard de la tumeur de façon longitudinale dans l'axe des membres et dans l'axe des fibres musculaires pour le tronc. L'extension tumorale se fait de façon centrifuge le long des trajets musculaires et nécessite donc une exérèse large dans le sens longitudinal. L'extension locorégionale correspondant au "T3" du stade TNM (classification peu usitée) est rare dans les sarcomes des tissus mous. Il s'agit de l'atteinte vasculaire, nerveuse et/ ou osseuse de contiguïté. En grande majorité des cas, ces structures peuvent être conservées mais nécessitent alors l'exérèse du périoste sous-jacent en regard et des fascias les entourant. En cas de contact ou d'engainement du pédicule vasculaire par la tumeur, il n'y a pas d'avantage à sacrifier ce pédicule plutôt que le disséquer (Poultsides et al. 2015). L'atteinte ganglionnaire est rare dans les STM et le curage ou *picking* type ganglion sentinelle n'est pas systématique.

La qualité de la marge chirurgicale est exprimée selon la définition proposée par l'UICC (union internationale contre le cancer) avec

R0 : exérèse in sano;

R1 : reliquat microscopique de la maladie ;

R2 : reliquat macroscopique de la maladie (E. Stoeckle et al. 2008).

Selon les recommandations du réseau de cliniciens NETSARC, l'intervention génère un compte rendu standardisé mentionnant le rappel clinique et l'indication opératoire, les traitements néoadjuvants, les gestes réalisés et différents items contribuant à évaluer la qualité de l'exérèse (cf Figure 4).

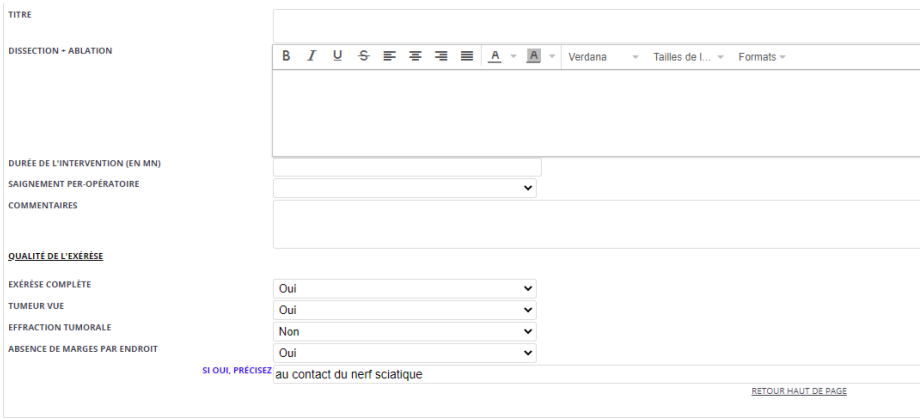


Figure 4: exemple de compte rendu opératoire standardisé. Les items nécessaires pour apprécier les marges : tumeur vue et effraction tumorale ainsi que les éléments nobles au contact (exemple ici du nerf sciatique qui va correspondre à la marge R1).

A noter que la détermination de la marge finale sera appréciée en réunion de concertation pluridisciplinaire en confrontant les données opératoires (appréciation des limites du chirurgien) aux données de la pathologie. Attention, le chirurgien peut avoir tendance à confondre l'importance des masses musculaires réséqués avec la qualité de la marge qui sera de type R1 si la surface tumorale a été aperçue pendant la chirurgie (E. Stoeckle et al. 2016). De même le pathologiste qui reçoit une pièce qui, nécessairement s'est rétractée doit se méfier de juger trop vite une chirurgie R1. Une description des distances tumorales et de la qualité de la dernière marge sont nécessaires et reportées dans un rapport protocolaire. La marge est donc déterminée lors de la RCP et ces données structurées générées alimentent directement nos bases de données. Cette façon collégiale d'apprécier la qualité de la chirurgie a été développée par le Groupe Sarcome Français -Groupe d'étude des tumeurs osseuses (GSF-GETO). L'aspect qualitatif de cette marge est fondamental et le taux de contrôle local est beaucoup plus favorable lorsque la chirurgie a été jugée R0 et réalisée en centre expert (E. Stoeckle et al. 2006; Blay et al. 2019). La diffusion des règles chirurgicales initiales et du recours systématique à un centre expert dès l'évocation du sarcome permettront d'éviter des chirurgies itératives, qui finissent par être mutilantes, en dépit de l'absence de bénéfice clair d'une amputation sur la survie globale (S. Bonvalot et al. 2006; Stojadinovic et al. 2001).

La radiothérapie

La radiothérapie est proposée et recommandée en situation néoadjuvante ou adjuvante en laissant l'appréciation de la RCP le juger pour toutes les tumeurs de haut grade dès lors qu'il y a franchissement ou atteinte de l'aponévrose (tumeurs profondes et tumeurs profondes et superficielles) (Toulmonde et al. 2014). Celle-ci est réalisée en complément et donc de manière non exclusive lorsqu'elle s'accompagne d'un geste chirurgical et dans ce cas correspond à une dose totale de 50 Gray à raison d'une séance par jour, 5 jours par semaine pendant 5 semaines. La chirurgie combinée à la radiothérapie permet de maximiser le contrôle local. En revanche, une radiothérapie même associée à la chirurgie ne pourra rattraper une chirurgie de mauvaise qualité (effraction ou chirurgie R2 : avec reliquat macroscopique). Si la radiothérapie est exclusive et s'envisage sans chirurgie alors une dose plus importante totale jusqu'à 59 Gray est réalisée (en fonction de la localisation, des contraintes anatomiques …)

Une étude sur l'hypofractionnement chez les personnes âgées va bientôt démarrer de façon multicentrique (HYPOSARC *« Etude de phase II évaluant la radiothérapie HYPOfractionnée en pré ou postopératoire chez les patients âgés (≥70 ans) ou « fragiles » (≥ 65 ans) porteurs d'un SARCome des tissus mous des membres ou du tronc »).*

La perfusion de membre isolée

Des perfusions de membre isolée peuvent être proposées en France dans des indications de sarcomes localement évolués. Il s'agit d'une véritable circulation extracorporelle réalisée au niveau d'un membre, sous garrot, permettant de passer des doses de chimiothérapie extrêmement toxique seulement au niveau du membre atteint. Depuis 2005, la dose retenue de TNFα est de 1mg associé au Melphalan (S. Bonvalot et al. 2005). Cette technique lourde en termes de logistique et également couteuse en termes de produit relève d'une discussion en RCP et peut être proposée comme alternative à l'amputation ou en prévision de marges insuffisantes sur différents éléments nobles. La chirurgie doit donc être réalisée à l'issue de cette technique.

La chimiothérapie

La chimiothérapie est fortement recommandée pour les tumeurs de haut risque métastatique et vise à traiter de façon préventive la maladie micrométastatique. Elle est

administrée en situation néoadjuvante dans le but de réduire le volume tumoral ou au moins d'arrêter la progression de la tumeur. En effet, certains sarcomes "poussent à vue d'œil". Il parait alors licite de ne pas proposer de chirurgie initiale pour une tumeur à croissance très rapide. Ce sont les tumeurs les plus mitotiques qui bénéficient le plus d'une chimiothérapie. Le standard depuis la publication de Gronchi s 'est reporté sur une association d'anthracyclines et d'ifosfamide (Alessandro Gronchi et al. 2017). L'étude de phase 3 de Gronchi et al sur les sarcomes à haut risque visait à démontrer une efficacité supérieure de la chimiothérapie spécifique (en fonction de l'histotype) vs chimiothérapie standardisée. Elle avait trouvé de façon inattendue une non-supériorité des chimiothérapies spécifiques et une meilleure survie chez les patients ayant bénéficié d'une chimiothérapie type AI qui fait donc maintenant référence (Baldini, Le Cesne, et Trent 2018).

La thérapie ciblée

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (Imatinib) sont utilisés dans les gastro intestinales stromal tumors GIST (Nakano et Takahashi 2018) et dans les dermatofibrosarcomes de Darier Ferand DFS (Penel, El Bedoui, et al. 2018). Certains sarcomes possèdent des altérations génétiques motrices et sont pourtant sans traitement actuel spécifique.

L'immunothérapie

Les sarcomes présentent des réponses hétérogènes aux inhibiteurs des checkpoints immunitaires et moins durable que celles observées dans d'autres modèles tumoraux comme les mélanomes. Une étude prospective récente " PEMBROSARC" coordonnée par Italiano et al, a montré l'efficacité du pembrolizumab chez des patients sélectionnés en situation de sarcomes des tissus mous avancée (NCT02406781). Le critère d'inclusion le plus prédictif était dans cette étude la présence de marqueurs d'activation immunologique (structures lymphoïdes tertiaires ou "TLS") que nous présenterons par la suite.

B. Caractérisation moléculaire des sarcomes

Au-delà du versant histologique, les STM peuvent être définis/ classifiés selon leurs altérations génétiques (Guillou et Aurias 2010; Jo et Fletcher 2014). Grossièrement on oppose les sarcomes à génétique simple et les sarcomes à génétique complexe (Taylor et al. 2011).

Sarcomes à génétique simple

Cette catégorie fait référence aux sarcomes associés à une anomalie génétique driver récurrente, en particulier des translocations, comme le sarcome d'Ewing.

Ces sarcomes présentent des profils génomiques diploïdes peu réarrangés associés à un faible nombre voire l'absence d'altération du nombre de copies des gènes). Ils représentent 30 à 40 % des sarcomes des tissus mous.

Ces sarcomes sont surreprésentés dans les populations pédiatriques et les adultes jeunes. D'un point de vue morphologique, ce sont des sarcomes constitués de petites cellules monomorphes. Divers mécanismes moléculaires peuvent être en jeu à savoir les gènes de fusion, les mutations activatrice ou inhibitrice et les amplifications.

Sarcomes à translocation

Les translocations chromosomiques sont l'évènement génétique le plus fréquemment retrouvé dans les sarcomes à génétique simple. Cette translocation aboutit à la création d'un néo gène de fusion initiant la tumorigénèse. Leur pouvoir oncogène peut résulter de plusieurs mécanismes :

Une activité kinase aberrante dérégulée comme les fusions impliquant ALK dans les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires,

un facteur de transcription chimérique avec nouvelles fonctions dérégulant la prolifération cellulaire comme dans le sarcome d'Ewing

L'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs par "troncation" du gène

Dans le sarcome d'Ewing le gène chimère code un nouveau facteur de transcription dotés de nouvelles fonctions régulatrices

La forme la plus représentative et connue est la translocation récurrente *EWS::FLI* bien connue dans le sarcome d'Ewing (Delattre et al. 1992) entre le chromosome 11 et 22 (Figure 5). La détection de ces translocations peut se faire par hybridation in situ (FISH), par RT-PCR (qui permet la mise en évidence du transcrit chimérique) ou par séquençage ARN haut débit. L'utilisation du RNA sequencing en routine a permis d'identifier de nouvelles entités ou des variants de transcrits de fusion précédemment identifiés comme dans les sarcomes CIC-réarrangés avec la nouvelle fusion *CIC::NUTM1* (François Le Loarer et al. 2019).

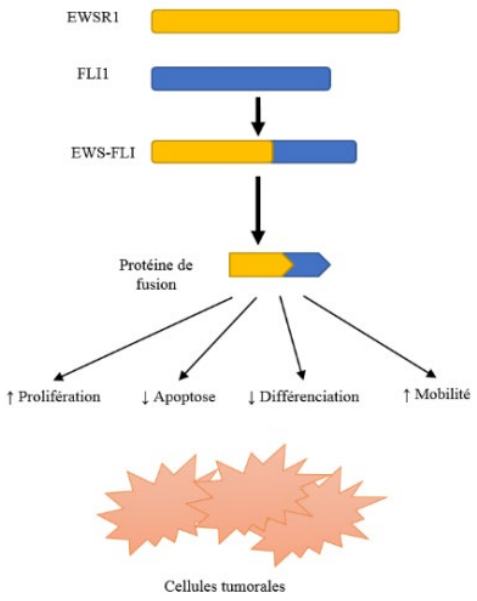


Figure 5 : exemple de fusion *EWS::FLI* responsable du sarcome d'Ewing, induit la création d'un gène chimérique et d'une protéine modifiée qui va agir comme un facteur de croissance sur la transcription des oncogènes favorisant ainsi la survie et la prolifération cellulaire tumorale (présentation

Les dermatofibrosarcomes de Darier et Ferrand (5% des STM) sont des tumeurs superficielles localement invasives et rarement métastasiantes (tumeur à malignité intermédiaire) (Saiag et al. 2015) qui sont associées à des translocations drivers récurrentes (Figure 6 et 7). CLa fusion spécifique la plus fréquente est la fusion COL1A1-PDGFB (Pedeutour et al. 1996). Le diagnostic repose alors sur la mise en évidence de cette fusion par FISH dans les cas difficiles (Figure 8). Il est notable que cette fusion est déséquilibrée s'associant à des anomalies restreintes du nombre de copies des gènes.

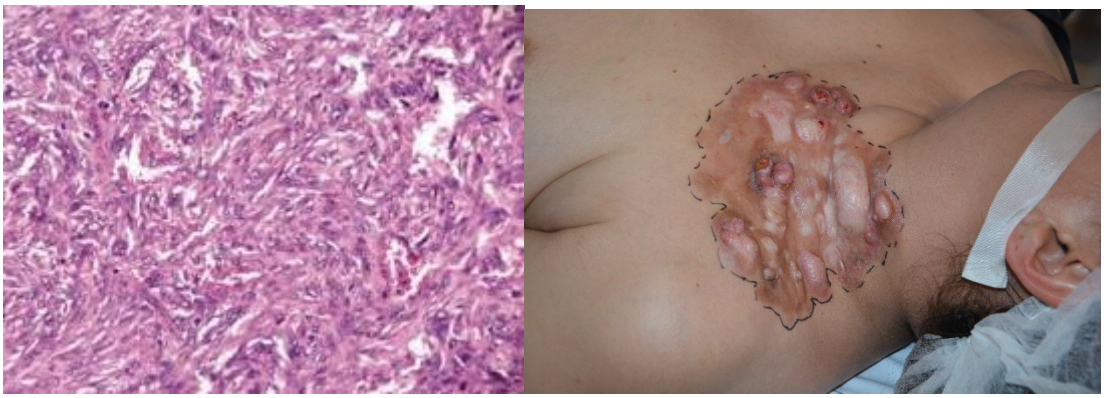


Figure 6 : prolifération tumorale d'architecture storiforme.

Figure 7 : photographie peropératoire d'un cas de DFS évolué

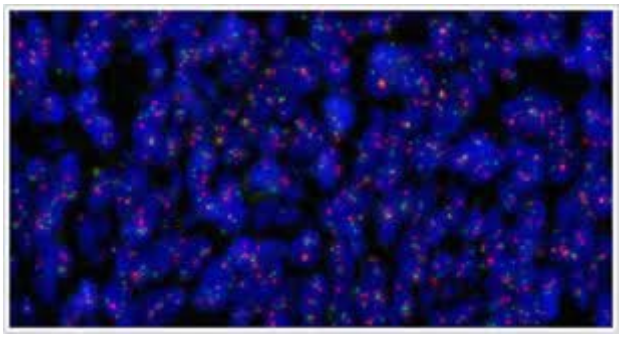


Figure 8 : FISH DFSP

Le synovialosarcome fait aussi partie des sarcomes à translocation sous tendus par la fusion *SS18::SSX1* dans 65% des cas (Clark et al. 1994). Il est plus souvent retrouvé chez l'adulte jeune et la survie semble corrélée à l'âge au diagnostic (meilleure survie chez l'enfant ; (Andrea Ferrari et al. 2004; A. Ferrari et al. 2015)).

Les sarcomes fibromyxoides de bas grade relève d'une translocation t (7;16) conduisant à une gène chimérique *FUS::CREB312.* Ils sont faussement appelés de bas grade alors qu'ils sont à risque de métastases.

Mutations activatrices ou inhibitrices

Une mutation ponctuelle peut survenir dans un oncogène au sein d'une séquence codante et aboutir alors à une activation dérégulée d'un facteur de croissance, une protéine kinase ou autre. Ce type de mutation est retrouvé dans les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) avec la mutation du récepteur à la tyrosine kinase *C-KIT* ou alternativement *PDGRFA* dans 85 % et 5% des cas. A noter que ces mutations sont mutuellement exclusives. Un autre exemple est celui de la fibromatose desmoïde qui présente

une mutation activatrice du gène *CTNNB1* dans 85% des cas. Cette mutation entraine une activation dérégulée de l'activité de la béta-caténine qui active la voie de signalisation Wnt/βcaténine. Celle-ci régule l'adhésion cellulaire et stimule la transcription cellulaire (récepteur tyrosine kinase).

Les mutations inhibitrices affectent les gènes suppresseurs de tumeurs et leur perte de fonction résulte de l'altération des 2 copies du gène. On peut citer l'exemple des tumeurs rhabdoïdes malignes de l'enfant associés à une inactivation du gène suppresseur de tumeurs *SMARCB1* (encore connu sous le nom de *INI1*) Ce gène suppresseur de tumeur est localisé sur le chromosome 22 codant pour une protéine de distribution ubiquitaire appartenant au complexe multiprotéiques BAF (encore appelé SWI/SNF*)* Ce complexe régule la transcription des gènes en remodelant la structure de la chromatine. Cette perte d'expression qui se manifeste si les deux allèles sont touchés est retrouvée de façon caractéristique dans les tumeurs rhabdoïdes malignes et dans 98% des sarcomes épithélioïdes (Francois Le Loarer et al. 2014).

Les tumeurs malignes des gaines périphériques présentent fréquemment une inactivation de *NF1* au niveau somatique, parfois au niveau germinal, s'intégrant dans la maladie de Recklinghausen (Farid et al. 2014). Il s'agit d'une mutation inactivatrice qui affecte les fonctions de la protéine neurofibromine. Ces sarcomes surviennent de façon lente et tardive chez des patients adultes le plus souvent.

Des mutations somatiques de *TP53* peuvent également être retrouvées dans les sarcomes ; elles sont très fréquentes dans les sarcomes à génétique complexe, et sont le plus souvent de nature somatique. Néanmoins les patients porteurs de mutation constitutionnelle de *TP53* (appelé syndrome de Li-Fraumeni) peuvent développer des sarcomes. Ces patients particulièrement à risque de cancers, ne devront pas recevoir de radiothérapie en cas de cancer du fait du sur-risque de sarcome en territoire irradié. Ils nécessitent également un suivi clinique et radiologique particulier (Frebourg et al. 2020).

Les sarcomes avec amplification génomique récurrente

A peu près 15% des sarcomes sont caractérisés la présence d'amplification génomique récurrente impliquant le locus 12q13-15 couvrant entre autres l'oncogène *MDM2.* Cette famille de tumeurs est hétérogène avec trois grands types histologiques associés qui sont les liposarcomes, les ostéosarcomes paraostéaux et les sarcomes intimaux. Le groupe de loin le

plus fréquent est celui des tumeurs adipeuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés et des liposarcomes dédifférenciés (Neuville et al. 2013).

Ces 3 tumeurs sont des liposarcomes partageant en commun l'amplification 12q13 de *MDM2* mais sont chacune associée à un risque évolutif distinct.

Les tumeurs adipeuses atypiques sont volontiers présentes en périphérie, au niveau des membres. Leur prise en charge est chirurgicale, avec une exérèse emportant la capsule péritumorale mais pas nécessairement de larges zones de tissu sain autour. Une désescalade thérapeutique a eu lieu depuis une dizaine d'années et ces tumeurs ne bénéficient plus d'irradiation adjuvante. Le terme de liposarcome bien différencié est aujourd'hui conservé dans les cas de lésion rétropéritonéales ou au niveau du cordon inguinal. Il s'agit de tumeurs de bas grade mais qui peuvent in fine évoluer en sarcomes de plus haut grade. On peut alors voir des zones de dédifférenciation au sein des zones de liposarcome bien différencié. Le liposarcome bien différencié ne possède pas en lui-même un risque métastatique élevé mais est plus pourvoyeur de rechute locale. Les liposarcomes dédifférenciés, sont des tumeurs de haut grade, qui associent les plus souvent deux contingents : un contingent très différencié de haut grade avec un constitué de cellules lipomateuses bien différenciés (lipoma like). Parfois le contingent graisseux est très minoritaire rendant le diagnostic plus difficile, pouvant être confondu avec un sarcome de haut grade type sarcome indifférencié à cellules pléomorphes (UPS). Le diagnostic définitif est important car les pronostics sont distincts, de même que la sensibilité à la chimiothérapie (Penel, Coindre, et al. 2018).

Sur le plan moléculaire L'amplification 12q13 inclue quasi constamment le gène suppresseur *MDM2,* un régulateur négatif de *TP53.* Le *MDM2* est un antagoniste de P53et son amplification conduit alors à l'inhibition du signal de *TP53* (Momand et al. 1992). Par ailleurs son oncogénicité fait également intervenir des mécanismes indépendants de TP53 (Lacroix et al. 2020; 2021).

L'amplification de MDM2 peut être confirmée par FISH ou d'autres techniques comme la CGH-array. Certaines études en cours tentent d'implémenter un algorithme informatique d'analyse de ces tumeurs pour confirmer le diagnostic de liposarcome sans avoir recours aux techniques moléculaires. Ainsi un travail collaboratif a été initié entre Lyon et Bordeaux, en utilisant le machine learning avec pour objectif d'éviter d'avoir recours à une technique complémentaire.

Les sarcomes à génétique complexe

Les sarcomes à génétique complexe représentent plus de la moitié des sarcomes de l'adulte, affectant avec prédilection les adultes de plus de 60 ans. Ils ne présentent pas d'altération pathognomonique récurrente mais un génome aneuploide marqué par des gains et pertes génomiques multiples réparties sur leur génome (Delespaul et al. 2019). Ils sont découpés en différents sous types histologiques selon la lignée de différenciation histologique qu'ils comportent (Ducimetière et al. 2010; Jo et Fletcher 2014). L'anomalie driver initiant leur formation reste inconnue.

Les sarcomes indifférenciés à cellules pléomorphes ne présentent pas de lignée de différenciation. Il s'agit désormais d'un diagnostic d'exclusion et représente ainsi 10% des sarcomes des tissus mous. Ils sont en général de haut grade et agressifs.

Les myxofibrosarcomes présentent à la fois des territoires myxoides et à la fois des territoires fibreux avec des cellules indifférenciés pléomorphes. Ils se rapprochent donc des UPS au niveau morphologique. Ceux-ci sont très souvent extensifs, sous leur forme infiltrante superficiel et profond (atteinte aponévrotique) au niveau des membres.

Les liposarcomes dédifférenciés associent donc un contingent adipocytaire bien différencié plus ou moins important à une zone de dédifférenciation de haut grade. Ceux –ci se développent au niveau du rétropéritoine et plus rarement au niveau des extrémités. La localisation rétropéritonéale s'associe plus volontiers dans les suites à un risque de rechute locale plus important que le risque métastatique.

Les liposarcomes pléomorphes sont plus agressifs que le liposarcome dédifférencié. Le risque de métastase est plus important (Penel, Coindre, et al. 2018).

Les rhabdomyosarcomes pléomorphes présentent une différenciation musculaire striée. Ce sont des tumeurs de haut grade apparentées aux sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS).

Les léiomyosarcomes présentent une différenciation musculaire lisse. Leur localisation est variable, le point de départ peut aussi bien être la veine cave inférieur que les veinules superficielles sous dermiques.

Ces sarcomes à génomique complexe sont caractérisés par un nombre anormal de chromosomes et présentent très souvent des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs comme *RB1, PTEN, TP53* sans pour autant mettre en évidence de mutation récurrente driver.

Jusqu'en 2010, le grade FNCLCC était le meilleur facteur pronostique des sarcomes à génétique complexe. En 2010, la signature CINSARC pour "complexity index in sarcoma", signature transcriptomique de 67 gènes impliqués dans la régulation de la mitose (mitotic checkpoint) et de l'intégrité chromosomique a été rapportée par Chibon et al en 2010 (Chibon et al. 2010). Ce grading moléculaire semble plus prédictive durisque métastatique que le grade histologique, avec l'avantage de classer les patients en 2 catégories de risque : bas *versus* haut risque. Il fallait de toute façon chercher, d'un point de vue moléculaire, à expliquer l'effet pronostique du grade. A noter que l'index mitotique n'est pas le seul facteur important dans l'élaboration de ce risque. Reste à comprendre les mécanismes qui interviennent dans la différenciation et la nécrose. On peut alors parler d''un grade moléculaire qui est complémentaire du grade histologique et qui permet de mieux apprécier la tumeur. La puissance de cette signature a conduit à l'élaboration de deux essais cliniques CIRSARC et Néosarcomics. Le premier est une étude de phase 3 évaluant le bénéfice potentiel d'une chimiothérapie néo adjuvante intensifiée, chez des patients ayant un sarcome des tissus mous opérable, à haut risque de rechute selon la signature CINSARC. Le second étudie la valeur pronostique de la signature CINSARC et association à l'efficacité de la chimiothérapie chez des patients atteints de sarcomes des tissus mous non métastatique.

Facteurs pronostiques des sarcomes des tissus mous

Ce terme de pronostic évoque la présence de facteurs prédictifs influençant la façon dont le cancer va répondre à un traitement. La chirurgie reste ce jour le seul traitement curatif de cette maladie et pourtant ces tumeurs sont capables de récidive même après une chirurgie initiale considérée comme optimale, classée R0 c'est à dire sans reliquat microscopique (estimée à 10% (Eberhard Stoeckle et al. 2009)). Différents facteurs anatomo-cliniques pronostiques de rechute ont été identifiés et sont inhérents à l'aspect du cancer en lui-même, comme la taille tumorale initiale > 5cm (Potter et al. 2013), le grade FNCLCC 3 (J.-M. Coindre 2006) ou la profondeur de la lésion par rapport au fascia. Il est pourtant difficile d'identifier les patients qui, après une prise en charge chirurgicale curative de sarcome, ont un risque élevé de récidive qu'elle soit locale ou à distance. L'identification d'un groupe de patients à risque de rechute pourrait aider le clinicien et le patient. Le patient pourrait bénéficier d'une

chirurgie plus agressive d'emblée associée à une surveillance radio-clinique plus accrue personnalisée en fonction du profil de sa tumeur et de son risque.

Hétérogénéité des tumeurs et des sarcomes

Les tumeurs sont hétérogènes sur les plans morphologiques et moléculaires. Les sarcomes des tissus mous sont souvent à croissance rapide et comportent des zones de remaniement en leur sein en rapport avec la nécrose tumorale ou des phénomènes ischémo-hémorragiques. Ainsi, Nous avons vu précédemment que la microbiopsie peut par exemple sous-estimer le contingent nécrotique de la tumeur par biais d'échantillonnage. Dans cette approche l'imagerie avec l'IRM comme gold standard permet d'appréhender les différences de textures et les contingents solides-liquides au sein d'une même tumeur. Les sarcomes sont également volontiers le territoire de remaniements hémorragiques (A. Gronchi et al. 2021). En sus de l'hétérogénéité de la tumeur, le rapport de la tumeur avec le tissu sain environnant est un élément déterminant de l'agressivité des sarcomes. En raison de la croissance rapide de ces tumeurs, associée à une sécrétion anarchique de facteurs angiogéniques par les tumeurs, la néo formation de vaisseaux matures est altérée, ce qui entraine l'apparition de zones hypoxiques au sein des tumeurs.

Au-delà de l'hétérogénéité architecturale, s'ajoute l'hétérogénéité moléculaire des cellules cancéreuses. Les études de séquençage haut débit des cancers ont montré que l'évolution phylogénétique des tumeurs dérivent d'un clône commun avec des étapes évolutives. Ces étapes sont marquées par l'acquisition de nouvelles altérations qui concourent à la fabrication de sous-clones au sein d'une même tumeur. Il existe une hétérogénéité intratumorale d'origine génétique. La plupart des études disponibles se concentrent sur une zone tumorale représentative mais n'évaluent pas de façon exhaustive ou comparative les différentes zones de tumeurs observées.

Les sarcomes sont considérés comme agressifs d'un point de vue local et général puisque ces tumeurs sont capables de rechute même après chirurgie large complète. La rechute locale est définie par la récidive de la tumeur au niveau du lit de résection initiale

après mise en rémission clinique. Cette définition s'oppose à la poursuite évolutive qui évoque plutôt une chirurgie insuffisante type R2 (reliquat macroscopique) qui entraine nécessairement une poursuite de la maladie à plus ou moins long terme. La rechute locale représente un évènement marquant, décisif pour le patient car elle va requérir une chirurgie plus complexe, souvent la réalisation d'un lambeau libre de couverture, une chimiothérapie adjuvante et l'impossibilité de réitérer une radiothérapie (dose cumulée maximale atteinte). Les sarcomes des tissus mous présentent un taux de rechute locale après chirurgie en centre expert d'environ 10% (E. Stoeckle et al. 2016; Sylvie Bonvalot et al. 2017). Le caractère planifié de la chirurgie et la présence de marges chirurgicales positives entrent en jeu dans le contrôle local. La chirurgie doit être la plus complète possible, donc avec présence de marges carcinologiques satisfaisantes (R0>>>R1) minimales et optimales pour le contrôle local de la maladie. Dans le même temps, l'objectif est de réaliser une chirurgie la plus conservatrice possible, préservant au mieux la fonction du patient. Nous avons élaboré l'hypothèse que la rechute locale, puisqu'elle peut survenir même après une chirurgie large bien menée, pourrait être lié à la présence au sein de l'environnement péritumoral considéré comme remanié ou sain de facteurs causaux. La persistance d'un pool de cellules tumorales n'est pas la seule hypothèse. Pour répondre à cette problématique, notre étude a systématiquement considéré le tissu juxta-tumoral, lieu de la récidive, pour appréhender les mécanismes ou facteurs moléculaires présents dans l'environnement proche de la tumeur. Nous allons nous intéresser aux marges à proprement parler et l'idée va être de définir cette zone de tissu normal et de présenter ses modifications et leur impact sur la rechute. La zone saine péritumorale, marginale, apparait comme une zone de transition, comme un front de progression invisible nécessaire à la tumeur et responsable de la récidive. L'identification de cette nouvelle identité tissulaire de tissu non tumoral mais non sain non plus permettrait d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou de prédire l'évolution locale. Cette cicatrice de tissu péritumoral pourrait soit contenir des cellules tumorales dormants (présence d'un clône primitif) comme on peut le voir dans le glioblastome (Mangiola et al. 2013), soit la cicatrice chronique peut être un champ de cancérisation dans les cancers ORL (Leemans, Braakhuis, et Brakenhoff 2011)(cicatrice dysplasiante), soit le tissu sain péritumoral modifié peut plus ou moins se réactiver (stigmates de la communication avec la tumeur).. Ces différentes hypothèses ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives.

J'ai donc entrepris dans ce projet d'évaluer toutes ces zones d'intérêt potentiels pour évaluer leur informativité sur l'agressivité des sarcomes.

Problématique, Enjeux du projet et questions posées

Jusqu'ici les études se sont focalisées sur les paramètres tumoraux sans prendre en compte les marges tumorales. Ces dernières années, les études ont élargi leurs analyses non plus aux seules cellules tumorales mais aussi au stroma tumoral. Le tissu « marginal » qui constitue l'interface entre le tissu tumoral et le tissu sain est un tissu remanié reste à l'heure actuelle peu étudié dans les sarcomes. L'analyse de l'environnement sain proche de la tumeur pourrait aider à comprendre et à cibler les patients plus à risque de rechute. Une signature moléculaire prédictive de rechute locale a ainsi été mise en évidence dans le carcinome hépatocellulaire (Hoshida et al. 2008) nous amenant à nous intéresser non plus seulement à la tumeur mais bien au tissu environnant celle-ci en distinguant le tissu sain et le tissu remodelé situé immédiatement à son contact. Nous élaborons l'hypothèse que les modifications attendues dans le tissu sain péritumoral, pourraient contribuer à la récidive tumorale. Il s'agit donc de prédire une corrélation entre des modifications morphologiques et moléculaires prédictives de la rechute par analyse du tissu sain juxta tumoral.

C. Résultats

Partie 1. Mise en évidence de l'identité du tissu péritumoral et corrélation avec la rechute

Dans son article de 2006, Hoshida et al (Hoshida et al. 2008) a présenté une étude transcriptomique comparative de tissu hépatique tumoral et de tissu hépatique cicatriciel sain (issus du même patient) à partir de différents modes de conservation. Après validation de ces résultats, ils découvrent de façon fortuite lors de l'analyse, que l'expression de certains gènes du tissu cicatriciel est corrélée au risque de rechute tardive (après deux ans) et mettent ainsi en évidence une réelle signature prédictive de la rechute.

Par la suite, Wu et al en 2012 (Wu et al. 2012) ont réalisé une analyse transcriptomique de tissu tumoral péritumoral sain et sain à distance dans un cas de cancer colorectal. Les résultats nous montrent la présence de gènes différents et de phénomènes d'épissage alternatifs différents entre le tissu tumoral et le tissu sain autour. Les gènes retrouvés surexprimés dans la tumeur sont des gènes impliqués dans les voies de signalisation de la matrice extracellulaire et des processus métaboliques. De plus, certains gènes de l'homéostasie cellulaire sont retrouvés inhibés dans la tumeur.

Enfin, dans l'article de Mangiola et al (Mangiola et al. 2013), l'analyse moléculaire du tissu sain péritumoral autour de cas de glioblastome révèle l'expression de gènes exprimés dans la tumeur, exprimés sous forme d'un gradient dans le tissu péritumoral. Ces gènes, impliqués dans la prolifération et la mobilité cellulaire, la matrice extracellulaire et la réponse immunitaire. En réalisant un clustering non supervisé, ils obtiennent un groupe d'échantillons de tissu péritumoral qui "clusterisent" avec les tumeurs et un avec le tissu sain. Il y a donc deux types de tissu péritumoral identifiés dans cette étude.

Dans une première approche, nous avons donc choisi de comparer de façon prospective le profil moléculaire de sarcomes. Une analyse génomique et transcriptomique de tissu péritumoral sain proche de la tumeur, R1 a été comparée au tissu sain à distance TS et au tissu tumoral T. Le projet a donc permis l'étude de profils génomiques et transcriptomiques,

réalisés à partir de trois prélèvements au sein d'une même pièce opératoire. Une corrélation sera ensuite cherchée entre un profil moléculaire du tissu péritumoral et le phénomène de rechute. Nous avions donc cherché à identifier un groupe de patients avec tissu péritumoral agressif, à risque de rechute et un groupe qui serait plus proche du tissu sain. Ont été analysé le taux de rechute et la survie dans la cohorte en fonction des profils.

Cette étude a fait l'objet d'un article actuellement ou en cours de soumission (la date de soumission sera notifiée au jury et aux rapporteurs) en cours de review au journal CANCERS dont le pdf est reproduit dans les pages suivantes.

Inserer le pdf de l'article soumis

Analysis of the peritumoral tissue unveils cellular changes associated with a high risk of recurrence

Audrey Michot 1,2
Pauline Lagarde
Tom Lesluyes
Elodie Darbo
Agnès Neuville
Jessica Baud 1
Gaëlle Perot
Iris Bonomo 2
Mathilde Maire 2
Maxime Michot
Jean-Michel Coindre 1,2
François Le Loarer 1,2
Frédéric Chibon 4

1 Bordeaux Institute of Oncology, BRIC U1312, INSERM, Université de Bordeaux,

2 Institut Bergonié, Centre de lutte contre le cancer de Bordeaux

4 Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (Oncopôle)

Abstract

Background: The management of soft-tissue sarcoma (STS) relies on a multidisciplinary approach specialized in oncological surgery combined with other adjuvant therapies to achieve optimal local disease control.

Purpose and Results: Genomic and transcriptomic pseudocapsules of 20 prospective sarcomas were analyzed and revealed to be correlated with a higher risk of recurrence after surgery.

Conclusion: A peritumoral environment that has been remodeled and infiltrated by M2 macrophages, and is less expressive of healthy tissue, would pose a significant risk of relapse and require more aggressive treatment strategies.

Keywords:

Soft-tissue sarcoma
Molecular changes
Recurrence
Peritumoral tissue
Peritumoral capsule

Key points

1: Two distinct groups of peritumoral tissue exist

2: The peritumoral tissue at high risk of relapse is more undifferentiated and enriched in M2 macrophages

3: The peritumoral tissue at high risk of relapse is also the most genomically altered corresponding tumors

Abbreviations

ADM-2: aberration detection method
CGH: comparative genomic hybridization
DNA: desoxyribonucleic acid
ECM: extracellular matrix
FNCLCC: fédération française des centres de lutte contre le cancer
GO: gene ontology
HE: hematoxylin and eosin
HT: healthy tissue
LFGM: low grade fibromyxoid sarcoma
LMS: leiomyosarcoma
LPS: liposarcoma
MFS: myxofibrosarcoma
R1: healthy tissue at a distance
RNA: ribonucleic acid
RMS: rhabdomyosarcoma
STS: soft tissue sarcoma
T: tumor
UPS: undifferentiated pleomorphic sarcoma
WHO: world health organization

Figure and table legends

Figure 1: Preoperative drawing. Removal of the piece. Cross-section of a tumor.

Figure 2: Genomic profiles obtained by CGH on 3 areas: T tumor, R1 non tumoral surrounding tissue and HT healthy tissue at distance. Tumor genome was highly rearranged while R1 and HT were flat.

Figure 3: Unsupervised non-hierarchical paired clustering with all probes all entities for all samples. Three groups are designed according to their expression differential.

Figure 4 a and b: Normal striated muscle; Rearranged fibroadipose tissue.

Figure 5 a b: Levels of differential expression of genes involved in muscle system process in our 2 distinct groups. 5a: R1.h group with R1 and HT were superposable and different to T. 5b: R1.t group with R1 was intermediate between HT and T.

Figure 6: CIBERSORT method: signature of an immune infiltrate of each sample. It was reported the differential expression of immune cells of macrophages M2, macrophages M0, monocytes, mast cells resting, B cells memory, T cells CD4 naïve, neutrophils, T cells follicular helper, macrophages M1, T regulators, Natural killer cells resting, T cells CD4 memory activated, dendritic cells resting, dendritic cells activated, T cells gamma delta, B cells naïve, eosinophils, mast cells activated, T cells CD4 memory resting, T cells CD8, NK cells activated in each area. of samples.

Table 1: Patients and tumors characteristics; Age in years; Tumor size in mm; Chemo: chemotherapy; Contouring: tumor margins; LMS: leiomyosarcoma; MFS: myxofibrosarcoma; UPS: undifferentiated sarcoma; LPS: dedifferentiated liposarcoma; LFMB: low-grade fibromyxoid sarcoma; RMS: rhabdomyosarcoma; CR: complete remission; M: metastasis; Follow-up in months; NED: no evolutive disease; AWD: alive with disease; DOD: dead of disease.

Table 2: in blue, GO corresponds with genes UP regulated in **R1 relative to HT. In red,** GO corresponds with DOWN regulated in **R1 relative to HT.**

Table 3: Results of an immune score of principal inflammatory components corresponding to the global clustering presented in Figure 6.

Table 4: Correspondence between our cluster of DGE and immune data of Cibersort in the R1.t group.

Table 5: Correspondence between our cluster of DGE and immune data of Cibersort in the R1.1h group.

Introduction

Soft-tissue sarcomas (STS) are malignant tumors often located in the limbs showing varied mesenchymal differentiations, and clinical presentations (1). The management is based on a multidisciplinary approach. Neoadjuvant therapies depending on tumor FNLCC grade is achieved to control local disease (2,3). Oncological surgery with limb-sparing if it is possible is then performed. Currently, clinicians need more precise prognostic biomarkers to tailor the different use of neoadjuvant treatments based on the patient's risk evolution but also to perform conservative surgery in low-risk patients. A local risk recurrence of 10% is estimated at 5 years after complete excision surgery (4). Local recurrences constitute a major threat in sarcoma patients, eventually leading to amputation or may even be fatal if radical surgery cannot be performed. In contrast, the overall survival (OS) is correlated with the metastatic status and depends on several factors. The major prognostic factors are the patient's age, the tumor size, the tumor depth, the histological tumor grade (assessed with the FNCLCC scheme), the locoregional involvement, the initial surgery and the tumor margins status (5). However, it is crucial to define new biomarkers associated with local or distant recurrence to better differentiate high-risk and low-risk patients and subsequently tailor the standard care of the patient. Interestingly, W.F.Enneking et al described in the 1980s a "reactive zone" surrounding the tumor which is also called the peritumoral "capsule"(6). This area is currently removed by surgical oncologists to improve the local control although little is known about its contribution to disease control. This area is variably composed of a mixture of tumor cells and inflammatory elements susceptible to favor recurrence if the resection passes through it. Nevertheless, the contributions of this reactive zone or of the healthy tissue adjacent to the tumor-on-tumor promotion, progression and recurrence remain largely unknown in STS. So far, biological studies have mainly focused on parameters within the tumor core while the determinants of the margins have been poorly analyzed. Molecular profiling of the reactive capsule might therefore inform margin status and help to identify markers associated with local recurrence. Indeed, although this area is not composed of tumor cells in the majority, it may contain a small subset of infiltrating tumor cells embedded in a fibrous remodeled that is often rich in inflammatory cells (7). These tissue modifications are poorly understood, and often obscured by the study focusing on the tumor bulk. Studies have highlighted the capacity of tumor cells to remodel the surrounding tissue via chemokines and growth factors secreted by recruited inflammatory cells and/or cancer-associated fibroblasts (CAFs). These adjoining cells would participate to the aggressiveness of cancer cells and their ability to remodel adjacent tissue

(8). Importantly, there is no consensual definition of what pseudocapsule tissue is made of: for instance, does the presence of tumor cells evidenced in microscopy preclude from calling it a true pseudocapsule but rather incipient tumor infiltration? Local recurrence may occur through 3 main mechanisms: transformation of pre-cancerous cells, reseeding of the area by persistent tumor cells or an indirect remodeling area. Firstly, some studies have hypothesized that the adjacent peritumoral tissue might contain a primary clone of pre-tumor cells that may subsequently transform and be at the origin of a new tumor (9). In carcinomas, the concept of "field of cancerization" is well known and could likewise apply to soft tissue tumors that arise from mesenchymal cells although the exact cell of origin of sarcomas remains unknown in most sarcoma types (10). So far molecular data are lacking in mesenchymal tissue. Second, the peritumoral tissue may contain infiltrating tumor cells that may later reseed the area. This model has been evidenced in glioblastoma (11). In sarcomas, this hypothesis is supported by evidence of sarcoma cells within the peritumoral "edema" that is akin to the "pseudocapsule" seen in human tumors visualized on imaging (MRI) and present at a distance from the tumor itself (8). The study of the composition of the pseudocapsule in sarcomas may identify adjoining cells (ie CAF and inflammatory cells) whose presence may correlate with a higher risk of recurrence. Finally, a third hypothesis might be considered through indirect remodeling via secreted signals, chemokines and growth factors secreted by recruited inflammatory cells, and/or cancer-associated fibroblasts (CAFs). The importance of this interaction might reflect the tumor's aggressiveness. To tease apart the influence of these different factors, we characterized the pseudocapsule of sarcomas patients at genomic and transcriptomic levels in a prospective series of 20 sarcomas that evidence markers that correlate with a higher risk of recurrence after surgery.

Material and methods

Collection of Samples and patient information

This prospective study included a series of 20 successive adult patients operated on for primary STS of the limbs or trunk walls at the Institut Bergonié between April 2013 and January 2014. All patients included in the study underwent surgery at Institut Bergonié and provided their consent to this study. This study was approved by the ethical committee of our institution.

Pathological assessment

All surgical specimens were studied fresh and after formalin fixation (Figures 1). Three areas were sampled for the purpose of the study defined as follow:

1. The healthy tissue located more than 1 cm away from the tumor is referred to as **HT**.
2. The tissue that comes into direct contact with the tumor, and is free of tumor at the macroscopic level and upon microscopic examination, is considered an R1 margin. The term R1 is used to describe this tissue. Additionally, the composition of the capsule was observed
3. The tissue taken from within the tumor mass is referred to as T.

Microscopically, all tumor specimens were analyzed by two specialized pathologists and

sarcomas were classified according to the latest edition of the World Health Organization (WHO) classification (12). Each area was sampled fresh to collect both frozen tissue and a formalin-fixed paraffin-embedded mirror block. Finally, we performed a mirror analysis on the tissues at the intersection between T and R1, searching for tumor cells in both tissues. All R1 blocks were confirmed to be devoid of tumor cells at microscopic examination. No tumor cells were identified in HT and R1 selected areas.

Nucleic acid isolation

Deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from snap-frozen samples for array-based comparative genomic hybridization (CGH). Genomic DNA was isolated with a standard phenol-chloroform extraction protocol after RNase treatment. Ribonucleic acid (RNA) was extracted for gene expression studies. Total RNAs were extracted from frozen samples with Trizol reagent® (Gibco BRL, Life Technologies) and purified with the RNeasy Min Elute Clean-up Kit® (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer procedure. RNA quality was checked on an Agilent 2100 bioanalyzer® (Agilent Technologies, Massy, France) according to the manufacturer's recommendations.

Array-CGH

DNA was hybridized to 8 x 60K whole-genome Agilent arrays (G4450A) according to the manufacturer's protocol. The ADM-2 algorithm of Agilent Genomic Workbench Lite Edition 6.5.0.18 was used to identify DNA copy number anomalies at the probe level. A gain of copy number was defined as a log 2 ratio > 0.25 and a loss of copy number was defined as a log 2 ratio < - 0.25.

Gene expression

Gene expression analysis was carried out using Agilent Whole human 4 x 44K Genome Oligo Array® (Agilent Technologies) according to the manufacturer protocol. All microarrays were simultaneously normalized using the quantile algorithm. T-tests were performed using Genespring (Agilent Technologies) and P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure. The P-value and Fold change cut-off for gene selection were 0.05 and 2 respectively. Gene ontology (GO) analysis was performed to establish statistical enrichment in GO terms using Gorilla (Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool). Matched supervised (per case) and unsupervised clustering on the entire cohort were performed.

Statistical analysis

Computations and plots, external to Genespring, were performed using R (v3.1.1). In gene expression, from the 41093 probes in Agilent chips, we removed both controls (93) and probes non-associated to known genes (10064). Then, when multiple probes matched a given gene, we computed the interquartile range and kept the highest one for each single gene. In the end, 19595 genes (e.i. probes) were used for advanced statistics (e.g. Kruskal-Wallis, pairwise

Wilcoxon with Benjamini-Hochberg correction for multiple tests).

CIBERSORT

CIBERSORT is an analytical tool developed by Newman et al (13) to provide an estimation of the abundances of member cell types using gene expression data. It is a computational method for quantifying cell fractions from bulk tissue gene expression profiles. All samples are tested, and profiling of inflammatory cells is noted. The value of differential expression of immune cells such as macrophages M2, macrophages M0, monocytes, mast cells resting, B cells memory, T cells CD4 naïve, neutrophils, T cells follicular helper, macrophages M1, T regulators, Natural killer cells resting, T cells CD4 memory activated, dendritic cells resting, dendritic cells activated, T cells gamma delta, B cells naïve, eosinophils, mast cells activated, T cells CD4 memory resting, T cells CD8, NK cells activated was noticed for each sample. CIBERSORT has been applied according to Newman et al.

Results:

Twenty soft tissue sarcoma patients were analyzed whose characteristics are listed in Table 1. The mean age of the patients was 62 years (range 44 to 85). The mean tumor size was 80 mm (range 25 to 170). Most tumors were located on the limbs (85%, n=17/20); most were high-grade and deep-seated (Table 1). Most tumors (17/20= 85%) were pleomorphic sarcomas with highly rearranged genome: 5 leiomyosarcomas (LMS), 4 myxofibrosarcomas (MFS), 7 undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS), 2 liposarcomas (LPS), 1 pleomorphic rhabdomyosarcoma (RMS) and 1 low grade fibro myxoid sarcoma (LGFM). The mean follow-up was 57 months (range 10 – 118), 12 patients had a relapse (60%) including 3 local recurrences (15%) and 10 metastases (50%), and 13 patients died of disease (65%). One patient had simultaneous local recurrence and metastasis (counted as metastasis which is the most indicated event).

Identification of the R1 entity

The genome of all samples was profiled by array-CGH. Tumor genomes showed numerous, mostly non-recurrent rearrangements. In contrast, the genomic profiles of the healthy (HT) and surrounding tissues (R1) were all diploid and did not exhibit copy number alteration (Figure 2). HT and R1 areas were composed of fibrous and/ or inflammatory tissue and were devoid of tumor cells confirmed upon histological analysis of the mirror blocks. The expression profiles of HT and R1 areas were compared, identifying 1345 genes significantly differentially expressed between the 2 areas. **In R1 relative to HT**, 868 genes were upregulated, being composed of genes involved in the synthesis of extracellular matrix (ECM), extracellular matrix remodeling, immune system, inflammatory response, response to stimulus and regulation of cell migration, cell motility or adhesion (Table 2). **In R1 relative to HT**, the 477 downregulated genes are involved in the muscle system process and oxidative metabolism (Table 2).
Then, after identification of the R1 entity, could we distinguish two profiles of R1?

Comparative transcriptomic analysis of R1 areas

The expression profiles of all areas (HT, R1 and T) of all samples (n= 60) were compared by unsupervised paired hierarchical clustering analysis. The profiles clustered in three main clusters are represented in Figure 3. The first group contained all 20 tumor samples (T areas). The second was composed of 15 HT and 8 R1 including 8 paired. Finally, the third cluster was composed of 12 R1 and 5 HT. All these samples had been taken from different sarcomas subtypes including the LMS (all LMS of this series), 2 MFS, 2 UPS, 1 LPS and 1 RMS. The R1 samples were divided into two classes, those clusterised with healthy tissue samples (HT) therefore renamed **R1.h**, while the others were closer to tumor tissue, referred to as **R1.t samples.** The expression profiles of **R1.h** versus **R1.t were compared. R1.h** samples overexpressed, compared to R1.t, 682 genes involved in muscle system, oxidative metabolism (Table 2). In contrast, **R1.t samples were enriched** in 120 genes involved in the synthesis of ECM, metabolism of ECM, lipids and steroids, locomotion, cell motility and immune system process (Table 2). A gradient of expression of genes involved in the muscle system was found between **R1.t**, **R1.h** and **HT.** The differential expression of **R1.h** vs **R1.t** for the main major genes in tumor, surrounding healthy tissue and normal tissue were presented in Figures 4 a and b. These muscular genes are the most differentially expressed (pval, FC) between **R1.h** vs **R1.t**. **R1.h** present an expression in genes involved in the muscle system at the same level in the surrounding healthy tissue and in the distant tissue.

Assessment of GI in tumor samples

The genomic index (GI) was calculated with the array of comparative genomic hybridization (aCGH) profiles of tumors. In the first **R1.h** group, the GI had a mean value of 72 (range 5-192) (Table 3 and 4). In the second **R1.t** group, the GI had a mean value of 165 (range 9-385) higher than **R1.h**.

Comparative histological analysis of R1.h versus R1.t groups

On microscopic examination, the samples of the **R1.h** cluster were made of normal striated muscle in most cases (67%, n=6/12) or normal fibrous and adipose tissue in the others shown in the Figures 5. The samples of group **R1.t** contained inflammatory tissue or fibrous adipose

tissue and did not contain muscle. The modifications seen in the tissue variably included inflammatory infiltrates. Tumor cells were identified neither in the peritumoral (R1) nor in the distant healthy tissue (HT).

Clinical significance of patient's stratification according to their R1 tissue nature

In the **R1.t** group, the patients developed adverse outcomes in a mean time of 19 months, including 6 events (67%, n=6/12), 5 metastasis (41%, n=5/12) and one local recurrence (11%, n=1/12) with 9 deaths (75%, n=9/12). All R1 and HT areas of the LMS of the series clustered together intermingled with the HT and R1 areas of MFS (n=2), 2 UPS, 1 RMS and one LPS. In this group, local recurrence was present in one case or 11%. In the **R1.h** group, the mean time for the first event was 39 months including 4 events (50%, n=4/8) declined in 3 metastasis (37.5%, n=3/8), one local recurrence (12.5%, n=1/8) and one both (12.5%, n=1/8) with 4 deaths (50%, n=4/8). The difference wasn't statistically significant between the two groups (p=0.4, p=0.78, p=0.3 respectively). A Kaplan Meier curve of Overall survival in each group was done (Figure 6).

Comparison of the immune reactions between R1.h and R1.t

Applying the CIBERSORT analysis method, four clusters were distinguished (Figure 7, Table 3). The first cluster Immune1 (I1, n= 10) in the head of Figure 5 contained 8 HT and 2 R1. This group was enriched in the monocytes population. The second cluster Immune 2 (I2, n=5) included 5 T samples enriched in M0 and M2 Macrophages. In this group, 75% of patients (6 samples/8) had developed metastasis and died of disease. The largest third cluster I3, contained 9 T, 14 R1 and 5 HT enriched only in M2 macrophages and a low level of monocytes. Interestingly, it lumped together all the samples from 4 patients of whom 3 were still alive at follow-up. In the last cluster I4, there were 3 T, 4 R1 and 7 HT that displayed a low level of immune infiltration in the different populations.

Comparing the immune profiles of **R1.h** and **R1.t** (Table 4), there was an enrichment in macrophages M2 and M0 in the **R1.t** group although the difference did not reach statistical significance compared to **R1.h** (respectively 0.025 vs 0.022 and 0.015 vs 0.004) . There was also a higher level of mast cells, T CD4+ memory lymphocytes, T CD8+ lymphocytes, and activated NK cells in the **R1.t** group (respectively 0.11 vs 0.078, 0,107 vs 0,0694, 0,063 vs 0,057, 0,098 vs 0,096). In the **R1.h**, there was an enrichment in monocytes, plasma cells and B cells memory compared to **R1.t** although the difference was not statistically significant (0,078 vs 0,11, 0,09 vs 0,013, 0,045 vs 0,0275).

Discussion

The quality of the surgical margin is an important parameter used to guide the clinical management of sarcoma patients (14). Nonetheless, local recurrences may occur even after an optimal surgery is deemed complete (referred to as R0 in the clinics) by both the surgeon and despite the absence of sarcoma infiltration in the surgical margins upon microscopic examination by the pathologists (2). The determinants of risk of local recurrence remain poorly studied and it remains unknown whether they overlap with those of distant relapse

and metastasis. Although optimal clinical management in a tertiary care center improves the overall survival of patients (15). Metastatic evolution and local recurrence mar the evolution of patients after complete surgical resection. Most studies have focused on the biological determinants of tumor cells to predict clinical outcomes. In this study, we tried to identify biological parameters associated with the risk of recurrence in the margins and healthy tissue as some factors may escape the traditional microscopic analysis performed by pathologists. Moreover, it is known that tissues surrounding tumors may contain inflammatory infiltrates reflecting the host's reaction against the tumor. Indeed, we were not able to detect the copy number imbalances of the tumor in the normal tissue analyzed confirming their benign nature even in patients that subsequently developed local recurrences. Moreover, the R1 and HT samples were all devoid of cancer cell infiltration upon microscopic analysis precluding the presence of a minor tumor infiltration not detected by genomic profiling as reported in models of glioblastoma (11).

Interestingly, we were able to identify significant modifications of the expression profiles between HT and R1 samples which is in keeping with the concept of pseudocapsule as a remodeled and modified tissue surrounding the tumor. There is indeed in the surrounding tissue an overexpression of genes involved in extracellular matrix (ECM) synthesis or remodeling. ECM remodeling has been shown to give the tumor cells, the ability to invade normal tissue (16). The R1 zones had an upregulation in transcripts involved in the extracellular matrix and structural organization as well as in genes involved in immune and inflammatory processes. These results confirm that the periphery of the tumor is at the forefront of the interaction of tumor cells with the host. The direct interaction of cancer cells with the immune cells have been demonstrated in many cancer models and correlated with patients' survival (17). The anticancer immune reaction can kill cancer cells though the action of cytotoxic lymphocytes, but this natural reaction can be dampened by cancer cells (18–20). In this study, we evidenced a downregulation of the expression of genes involved in the muscle system process and contraction and in oxido reduction process in the R1 samples compared to HT samples.

It is unknown at which level the surrounding tissue may contribute to the development and sustain primary tumors or may account for subsequent local recurrences. Similar data has been shown in other cancers including lung, head and neck, breast and colorectal carcinomas (21). These studies suggested that molecular modifications may occur in the surrounding tissue even before the development of cancer and may play a role in the initiation and progression of the disease. Two distinct types of R1 samples at the expression level in our study that tended to correlate with distinct clinical outcomes were identified. The importance of this interaction might reflect the tumor's aggressiveness (22). This role of reciprocal communication with tumor cells has been shown to be pivotal in the development and progression of epithelial carcinoma (22).

The **R1.h** group was indeed associated with an up-regulation of 682 genes involved in muscle system and oxidative metabolism compared to **R1.t**. This one was more similar to HT. Even, some HT samples clustered upon transcription analysis with R1 samples, referred to as "R1 like HT samples**".** These samples had a down-regulation of genes involved in the synthesis and metabolism of extracellular matrix, lipids and steroids, locomotion, cell motility and immune

system process compared to **R1.t**. This consideration is also consistent with a trend of a higher level of monocytes, plasma cells and B cells memory. At the histological level, these samples mostly contained normal striated muscle without visible reaction or tumor infiltration. In the **R1.h** group, the GI amounted to a mean value of 72 and correlated with a longer time in the occurrence of adverse events (mean time of 39 months). A high genomic rearranged tumor was also associated with a more aggressive R1 clinically.

In comparison, the samples belonging to the **R1.t** group mostly contained rearranged or inflammatory fibrous and adipose tissue. These samples were more infiltrated by inflammatory cells upon microscopy and there was an enrichment in macrophages on the CIBERSORT analysis. This trend of more infiltrate of macrophages M2 and M0 is associated with a time to event shorter time to occurrence with a mean time of 19 months and a more rearranged tumor (in terms of level of genomic alterations).

Interestingly other groups have shown that the presence of macrophages M2 in tumors is associated with a poor prognosis due to their immunosuppressive property (18–20). The **R1.t** is associated with a higher level of mast cells, T CD4+ lymphocytes memory, T CD8+ lymphocytes and activated NK in keeping with the microscopic analysis of the samples on the slide as found also in osteosarcoma (23). This **R1.t** group which seems seemed to include patients with adverse outcomes more aggressively presents an immune response rather with lineage T and a more inflammatory environment at the histological level. It is known that cytotoxic reaction with CD8 +and NK cells triggers cancer cell deaths and may secondarily amplify the antitumor immune response (17).

These preliminary results need to be confirmed on a larger cohort with the same longer clinical follow-up. Our study suggests that prognostic factors might be inferred from the study of the peritumor capsule.

Conclusion

In conclusion, we have highlighted that certain biological properties of the peritumoral tissue can provide information about the patient's risk of recurrence. A peritumoral area that is remodeled, infiltrated by M2 macrophages, and low in the expression of healthy tissue may be at greater risk of relapse. Identifying patients who are at risk of recurrence can help to tailor their management.

References

1. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. févr 2013;49(3):684-95.

2. Stoeckle E, Coindre JM, Kind M, Kantor G, Bui BN. Evaluating surgery quality in soft tissue sarcoma. Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer. 2009;179:229-42.

3. Gronchi A, Palmerini E, Quagliuolo V, Martin Broto J, Lopez Pousa A, Grignani G, et al. Neoadjuvant Chemotherapy in High-Risk Soft Tissue Sarcomas: Final Results of a Randomized Trial From Italian (ISG), Spanish (GEIS), French (FSG), and Polish (PSG) Sarcoma Groups. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 juill 2020;38(19):2178-86.

4. Maretty-Nielsen K, Aggerholm-Pedersen N, Safwat A, Jørgensen PH, Hansen BH, Baerentzen S, et al. Prognostic factors for local recurrence and mortality in adult soft tissue sarcoma of the extremities and trunk wall: a cohort study of 922 consecutive patients. Acta Orthop. juin 2014;85(3):323-32.

5. Austin JL, Temple WJ, Puloski S, Schachar NS, Oddone Paolucci E, Kurien E, et al. Outcomes of surgical treatment alone in patients with superficial soft tissue sarcoma regardless of size or grade. J Surg Oncol. janv 2016;113(1):108-13.

6. Enneking WF, Spanier SS, Malawer MM. The effect of the Anatomic setting on the results of surgical procedures for soft parts sarcoma of the thigh. Cancer. 1 mars 1981;47(5):1005-22.

7. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, et al. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. Cancer Cell. 11 avr 2016;29(4):587-601.

8. White LM, Wunder JS, Bell RS, O'Sullivan B, Catton C, Ferguson P, et al. Histologic assessment of peritumoral edema in soft tissue sarcoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1 avr 2005;61(5):1439-45.

9. Fridman A, Tainsky M. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. Oncogene. 9 oct 2008;27(46):10.1038/onc.2008.213.

10. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res. 15 avr 2003;63(8):1727-30.

11. Mangiola A, Saulnier N, De Bonis P, Orteschi D, Sica G, Lama G, et al. Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. PloS One. 2013;8(3):e57145.

12. Jo VY, Fletcher CDM. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. Pathology (Phila). févr 2014;46(2):95-104.

13. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. Nat Methods. mai 2015;12(5):453-7.

14. Stoeckle E, Italiano A, Stock N, Kind M, Kantor G, Coindre JM, et al. [Surgical margins in soft tissue sarcoma]. Bull Cancer (Paris). déc 2008;95(12):1199-204.

15. Blay JY, 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 1 juill 2019;30(7):1143-53.

16. Mueller BM. Different roles for plasminogen activators and metalloproteinases in melanoma metastasis. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;213 (Pt 1):65-80.

17. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 21 déc 2011;480(7378):480-9.

18. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. BMC Cancer. 23 juill 2012;12:306.

19. Sugimoto M, Mitsunaga S, Yoshikawa K, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, et al. Prognostic impact of M2 macrophages at neural invasion in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. juill 2014;50(11):1900-8.

20. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 juill 2009;27(20):3330-7.

21. Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. Nat Rev Cancer. janv 2018;18(1):19-32.

22. Polanska UM, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells. J Cell Physiol. août 2013;228(8):1651-7.

23. Liu R, Hu Y, Liu T, Wang Y. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of osteosarcoma cancer. BMC Cancer. 18 déc 2021;21(1):1345.

Acknowledgements

AM and FC received grants from Fondation Bergonié, Fondation pour la recherche médicale, Soroptimists International Union Française, Fondation ARC, Université Bordeaux 2 Segalen.

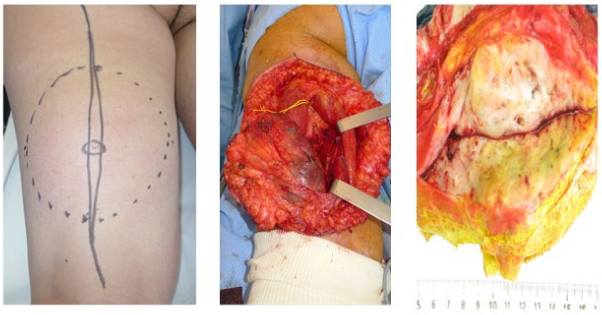


Figure 2

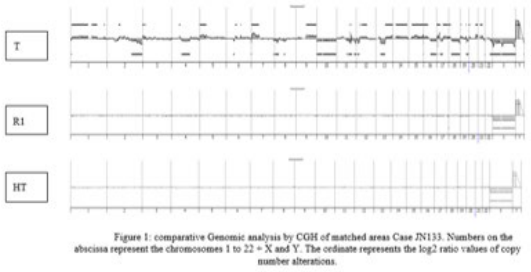
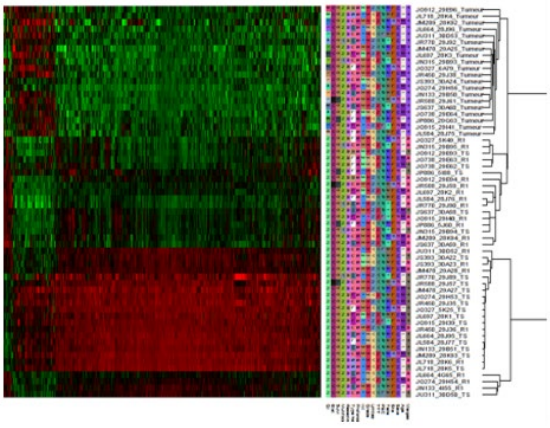


Figure 1: comparative Genomic analysis by CGH of matched areas Case JN133. Numbers on the abscissa represent the chromosomes 1 to 22 + X and Y. The ordinate represents the log2 ratio values of copy number alterations.

Figure 3



Figures 4



Figures 5



Figure 6

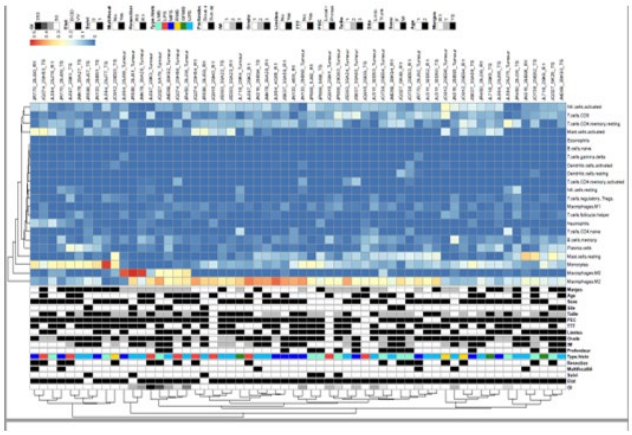


Figure 7

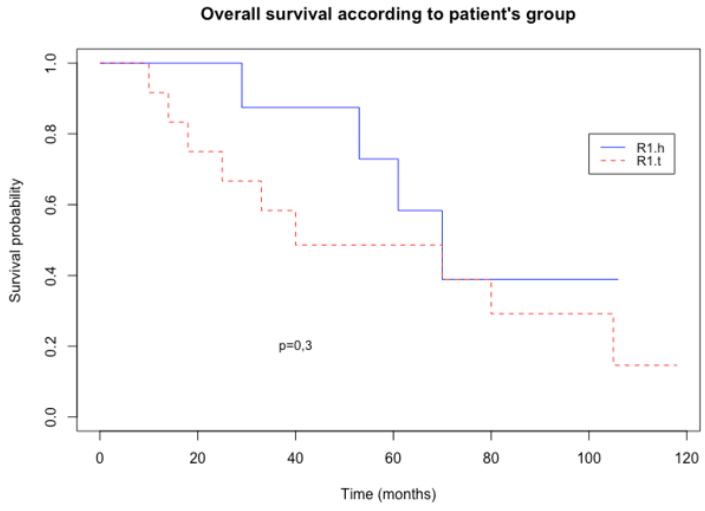
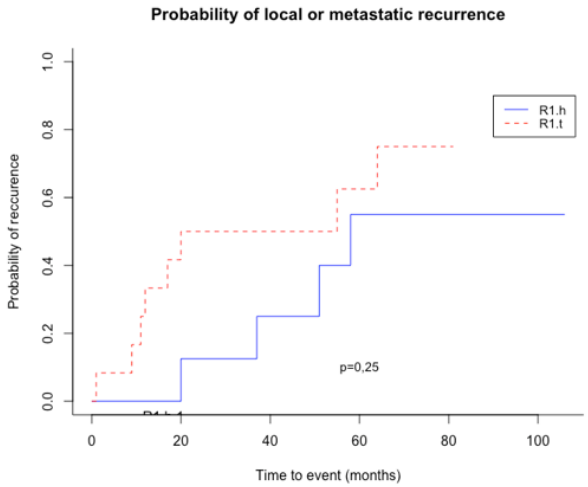


Figure 8



Case ID	Age	Size	Location	Tumor Grade	Extension	Type	Margin status	Evolution	Time to event	Follow up	Vital Status
1	61	100	Limb	2	Deep	LMS	R0	M	55	105	DOD
2	53	80	Trunk	3	Supf	LMS	R0	M	12	14	DOD
3	85	55	Limb	3	Supf	LMS	R1	CR		80	Dead
4	62	70	Limb	3	Supf	LMS	R0	M	1	118	AWD
5	72	11	Limb	1	Deep	LMS	R0	CR		36	NED
6	57	80	Limb	2	Deep	MFS	R0	CR		97	NED
7	46	130	Limb	3	Deep	MFS	R0	M	37	70	DOD
8	59	25	Limb	3	Deep	MFS	R1	LR	17	33	DOD
9	66	25	Limb	3	Supf	MFS	R0	M	20	25	DOD
10	71	65	Trunk	3	Supf	UPS	R0	M	11	18	DOD
11	65	75	Limb	3	Deep	UPS	R0	LRM	58	61	DOD
12	54	25	Limb	3	Deep	UPS	R0	CR		81	NED
13	59	170	Trunk	3	Deep	UPS	R0	M	9	10	DOD
14	75	60	Limb	3	Deep	UPS	R0	CR		65	NED
15	58	100	Limb	2	Deep	UPS	R0	M	20	29	DOD
16	60	110	Limb	3	Deep	UPS	R0	CR		106	NED
17	76	150	Limb	3	Deep	LPS	R1	M	64	70	DOD
18	44	100	Limb	3	Deep	SFMB	R0	CR		44	NED
19	52	80	Limb	3	Deep	RMS	R1	CR		40	Dead
20	75	100	Limb	2	Deep	LPS	R1	LR	51	53	DOD

age in years	size in mm		grade FNCLCC	type of sarcoma (cf abbreviations)	R0 complete microscopic exerese R1 in contact at microscopic level	M metastasis CR complete remission LR local recurrence	time in months	Follow up in months	DOD dead of disease; Dead of other cause; NED no evolutive disease; AWD alive with disease

Table 1

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)
GO:0030198	extracellular matrix organization	4.76E-29	5.91E-25	4.28 (16751,356,868,79)
GO:0043062	extracellular structure organization	5.82E-29	3.61E-25	4.27 (16751,357,868,79)
GO:0002376	immune system process	5.44E-19	2.25E-15	2.01 (16751,1586,868,165)
GO:0006954	inflammatory response	8.22E-15	6.81E-12	3.12 (16751,359,868,58)
GO:0003012	muscle system process	5.5E-14	6.82E-10	4.99 (16751,225,477,32)
GO:0006936	muscle contraction	5.89E-13	3.66E-9	5.26 (16751,187,477,28)
GO:0055114	oxidation-reduction process	3.98E-8	4.95E-5	

Table 2

	M2	M0	Monocytes	Mast.cells.resting	Plasma.cells	B.cells.memory	T.cells.CD4.naive	Neutrophils	T.cells.follicular.helper	M1	Tregs	NK.cells.resting	T.cells.CD4.memory.activated	Dendritic.cells.resting	Dendritic.cells.activated	T.cells.gamma.delta	B.cells.naive	Eosinophils	Mast.cells.activated	T.cells.CD4.memory.resting	T.cells.CD8	NK.cells.activated	GI
	0,07	0,01	0,32		0,01	0,005		0,12		0,00	0,01										0,00		
JR770	2430	4124	0189		5749	35867	0,0084	8394	0,01331	1382	2968				0,007966				0,24539	0,0150986	6860	0,1322	N
_R1	822	871	911	0	279	3	6844	379	6686	255	643	0	0	0	272	0	0	0	5292	59	203	95615	A
	0,05		0,20		0,02			0,09		0,03											0,03		
JQ274	2666		6615		0227	0,011		9333	0,04044	7689					0,006049				0,27626	0,0596544	9456	0,1501	N
_TS	167	0	918	0	272	44062	0	742	4726	594	0	0	0	0	236	0	0	0	5502	67	93	55826	A
	0,16	0,06	0,27		0,00			0,16													0,00		
JL584	0023	9997	9319		5627	0,001		2833		9,00									0,17636	0,1017571	9891	0,0315	N
_R1	808	246	958	0	553	74887	0	943	0	E-04	0	0	0	0	0	0	0	0	3963	84	991	63506	A
	0,03	0,07	0,30		0,05	0,125		0,06				0,067									0,04		
JR770	5846	2069	1184		6344	12922		8390				33247			0,006076				0,09725	0,1045644	9134	0,0166	N
_TS	109	769	452	0	173	9	0	555	0	0	0	9	0	0	408	0	0	0	3772	21	429	74203	A
	0,09		0,27		0,23	0,018		0,04			0,09	0,047									0,05		
JL697	3750		3476	0,0114	4173	72873		1739	0,02790		2567	83804			0,014328					0,0550232	3334	0,0356	N
_TS	494	0	343	84737	356	4	0	118	8236	0	209	5	0	0	396	0	0	0	0	54	893	47185	A
	0,10		0,27		0,20					0,00		0,024					0,00				0,03		
JM47	9753		5743	0,0664	1164				0,07611	3451		77911			0,004143		5377		0,03438	0,0878714	4142	0,0766	N
8_TS	203	0	083	75112	959	0	0	0	0595	739	0	9	0	0	695	0	513	0	6662	96	181	00644	A
	0,18		0,29		0,13	0,040		0,03		0,00	0,01										0,01		
JR588	6933		2296		7647	86825	0,0476	4144	0,02333	3523	4940								0,11983		2971	0,0850	N
_TS	736	0	34	0	147	8	87762	024	98	593	788	0	0	0	8,00E-04	0	0	0	0447	0	121	62052	A
	0,16		0,35		0,11	0,094		0,00													0,03		
JN133	3774		0484	0,0317	0254	84255		8897							0,004376				0,06920	0,1092537	0666	0,0264	N
_TS	052	0	979	82343	837	6	0	084	0	0	0	0	0	0	275	0	0	0	6865	59	23	6102	A

		0,02	0,51		0,02	0,053					0,05										0,02	
JL584		3839	4650		7040	45094	0,0247		0,00556		3626				0,011204				0,08707	0,0446497	4093	0,1300	N
_TS	0	736	311	0	514	6	15599	0	167	0	111	0	0	0	851	0	0	0	0401	71	832	9626	A
	0,01	0,08	0,31		0,00	0,013		0,00			0,03										0,04	
JO912	6140	2749	1066	0,2565	1313	61994		1010	0,00538		5659				0,038730				0,03889	0,1124020	6979	0,0395	N
_TS	521	947	623	09216	185	6	0	802	3106	0	661	0	0	0	274	0	0	0	7421	44	27	37985	A
JL664	0,04	0,49	0,03			0,049				0,01	0,02										0,16	
_Tum	1977	2906	2494	0,0164		70848			0,04425	1340	2937				0,007148	0,04642					3459	0,0709	1
eur	21	856	976	07287	0	6	0	0	7907	067	976	0	0	0	579	1762	0	0	0	0	51	39385	7
JR588	0,35	0,53	0,00			0,015																	1
_Tum	6027	3422	2748			32517	0,0038												0,03904	0,0346346		0,0149	1
eur	658	275	008	0	0	5	33875	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6411	26	0	61972	4
JM47	0,18	0,51			0,03	0,103		0,03			0,01	0,017											1
8_Tu	5134	3775			9009	49189	0,0293	6070	0,01084		9557	22953	0,01161921	0,00345		0,00749			0,01560	0,0073327			5
meur	283	624	0	0	549	2	84979	56	3074	0	96	8	8	1546	0	4464	0	0	4569	44	0	0	8
JL697	0,34	0,11			0,02	0,069		0,02		0,01	0,00										0,14		3
_Tum	6246	9095			9786	06788		5964	0,03077	0779	9047	0,029	0,01470561						0,17126		4070		8
eur	533	358	0	0	803	6	0	992	9958	361	122	18709	5	0	0	0	0	0	8644	0	637	0	5
JQ327	0,41	0,26				0,005		0,00		0,01	0,00												2
_Tum	1946	9015				58616	0,0208	2978	0,07122	7838	1144								0,12097			0,0784	7
eur	1	599	0	0	0	4	43986	761	4612	963	298	0	0	0	0	0	0	0	856	0	0	42958	7
JM28	0,27	0,26			0,10	0,093		0,00		0,01	0,04												1
9_Tu	1601	5385		0,0377	1484	02927	0,0170	5217	0,02022	8640	8475								0,03652	0,0088298		0,0757	3
meur	389	682	0	8118	201	5	32957	464	2482	336	718	0	0	0	0	0	0	0	7705	95	0	71716	4
JQ274	0,30	0,28	0,02			0,043				0,03											0,02		
_Tum	1976	7257	7406		4,00	93969				7943			0,08171485						0,05419	0,1039061	0265	0,0409	4
eur	551	013	507	0	E-04	5	0	0	0	624	0	0	5	0	0	0	0	0	425	59	934	89721	9

JR450	0,31	0,33	0,02		0,00	0,020		0,01		0,02											0,12		1
_Tum	7876	0073	0604		4513	21471		1475	0,00447	7351	0,00									0,04700		4633	0,0907	9
eur	709	562	504	0	054	7	0	861	4526	277	1	0	0	0	0	0	0	0	6351	0	904	96253	2
	0,41		0,04		0,02	0,029		0,00		0,02											0,02		
JQ274	9707		5569		2381	07300		4854	0,02760	3783									0,21518	0,0738176	7637	0,1103	N
_R1	079	0	678	0	014	8	0	89	6557	681	0	0	0	0	0	0	0	0	3019	18	283	86174	A
	0,36		0,11		0,00			0,00		0,04											0,01		
JR588	3800		8611		1474	0,006		2022	0,01511	7267									0,24655	0,0987913	6870	0,0826	N
_R1	881	0	46	0	317	81853	0	908	2806	683	0	0	0	0	0	0	0	0	5086	84	943	74001	A
	0,36		0,15			0,019		0,04		0,00	0,00										0,02		
JQ915	5615		6311			14484		8505	0,00237	6106	1205								0,15243	0,1064509	7547	0,1143	N
_R1	659	0	379	0	0	9	0	45	6601	641	916	0	0	0	0	0	0	0	1495	9	828	03192	A
	0,31		0,07		0,05	0,007				0,02											0,07		
JS393	8623		4417	0,0457	3326	50098			0,01635	5835									0,13089	0,0903383	8177	0,1587	N
_TS	245	0	474	74447	313	3	0	0	8017	495	0	0	0	0	0	0	0	0	4879	58	63	53158	A
	0,33		0,08		0,02	0,029				0,01											0,06		
JS393	0187		9222		9124	77795				7059						0,007731			0,20898	0,0833774	3947	0,1401	N
_R1	568	0	324	0	704	4	0	0	4,00E-04	231	0	0	0	0	463	0	0	0	6944	44	722	95982	A
JL718	0,37		0,07		0,00	0,012				0,00	0,05	0,068											
_Tum	0352		9566	0,0389	6623	27889	0,1459			5755	2170	94640		0,00296						0,0945912		0,1211	
eur	739	0	155	58616	238	8	49875	0	7,00E-04	648	574	5	0	8818	0	0	0	0	0	5	0	37211	5
	0,45		0,06		0,01	0,025				0,02											0,05		
JL697	7091		4035	0,0237	0077	92508		9,00	0,00506	6246									0,08508	0,1174903	8249	0,1261	N
_R1	918	0	241	56617	771	7	0	E-04	0048	716	0	0	0	0	0	0	0	0	7038	36	567	12439	A
	0,42		0,10		0,03	0,039															0,08		
JN315	4340		5277	0,1246	1727	21065														0,0720400	2964	0,1197	N
_TS	669	0	472	80577	326	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54	172	59075	A

	0,41		0,05		0,05					0,02								0,00				0,04	
JM47	7102		9727	0,1223	4596				0,01260	0133								4261		0,03285	0,0781233	5831	0,1523	N
8_R1	553	0	748	69409	052	0	0	0	9424	457	0	0	0	0	0	0	932	0	5258	81	471	89315	A
	0,47		0,08		0,01	0,057				0,01	0,01										0,03		
JL664	8738		4845	0,1040	0588	73674			0,02492	0208	0110				0,007896					0,1010028	0207	0,0796	N
_R1	751	0	71	81531	194	9	0	0	0761	252	582	0	0	0	901	0	0	0	0	37	949	61782	A
	0,42	0,03	0,04		0,00	0,037				0,05											0,06		
JS637	6587	3522	6446	0,0853	6493	12741			0,00299	7926						0,00607				0,1217207	4505	0,1112	N
_R1	587	78	5	70538	447	2	0	0	4188	229	0	0	0	0	0	4782	0	0	0	47	796	29994	A
	0,40		0,17		0,01	0,057				0,00	0,01												
JN133	9618		5027	0,1155	8841	78305	0,0557			5518	5673									0,1139050		0,0323	N
_R1	378	0	668	30455	845	3	21902	0	0	557	675	0	0	0	0	0	0	0	0	61	0	79406	A
JN133	0,42		0,24		0,00	0,029															0,05		1
_Tum	8393		9184	0,0693	5047	91072						0,027			0,030854					0,0304442	8490		3
eur	47	0	695	87284	239	4	0	0	0	0	0	72518	0,07056217	0	844	0	0	0	0	93	102	0	8
	0,28		0,27		0,01	0,001				0,04	0,00							0,00			0,09		
JP886	4576		1861	0,0070	1951	29720	0,0104		0,00111	4206	4130							3369	0,01341	0,0938357	0315	0,1623	N
_R1	764	0	71	65703	628	8	70826	0	6019	06	772	0	0	0	0	0	0	781	5806	38	627	86357	A
	0,22		0,23		0,00	0,013		0,06		0,01											0,05		
JP886	2176		4000	0,1599	4142	48372		3732	0,00829	3630										0,1158405	3101	0,1116	N
_TS	349	0	13	3978	026	1	0	701	6784	413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	929	55603	A
JQ915	0,27		0,16		0,00	0,118				0,04	0,02							0,00			0,07		1
_Tum	1261		1486	0,0582	8758	86841			0,03070	6805	0942			0,00911				3695		0,1100457	3471	0,0865	0
eur	313	0	426	76019	079	5	0	0	6828	611	935	0	0	4062	0	0	0	873	0	11	701	67027	9
JP886	0,25		0,13		0,00	0,028				0,06	0,03										0,19		
_Tum	8086		3481	0,0178	8369	30167			0,00231	7080	9512			0,00515						0,1308356	9061	0,1099	6
eur	95	0	349	12423	444	7	0	0	7289	251	929	0	0	2682	0	0	0	0	0	56	561	8779	5

JS393	0,41		0,11		0,00	0,008				0,01											0,16		
_Tum	1615		5232	0,1109	5716	33348				6050			0,05443231							0,0372287	0733	0,0796	1
eur	564	0	668	76744	844	5	0	0	0	391	0	0	3	0	0	0	0	0	0	83	243	79964	6
JS637	0,26		0,09		0,01	0,045				0,01											0,20		
_Tum	1313		8479	0,1384	3834	16170				9508			0,11276766	0,00461	0,005195						6540	0,0940	9
eur	465	0	705	98404	177	8	0	0	0	675	0	0	2	5951	308	0	0	0	0	0	008	84938	7
	0,24		0,12		0,11	0,094		0,03		0,00	0,01										0,06		
JQ915	9125		9790	0,0828	5768	30626	0,0458	0431	0,01315	9223	0062									0,0371788	5935	0,1163	N
_TS	198	0	461	81053	085	6	14431	224	4077	531	266	0	0	0	0	0	0	0	0	45	42	29142	A
JU311	0,26		0,08		0,04	0,121				0,07	0,04										0,02		1
_Tum	5948		4742	0,1485	9070	02818	0,0723		0,00451	1142	8175										1053	0,1134	2
eur	051	0	686	02227	381	6	30146	0	446	347	131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	563	92822	7
JO738	0,27	0,14	0,06		0,01	0,057		0,01		0,02											0,06		
_Tum	0789	3457	2964	0,1426	7841	87091		0732	0,00566	7437									0,00214	0,0938875	3918	0,1006	4
eur	264	371	701	53226	278	8	0	125	6325	164	0	0	0	0	0	0	0	0	1138	19	722	40247	9
	0,21	0,02	0,08		0,04	0,064		0,00		0,04											0,12		
JM28	7196	0448	2008	0,1441	1878	30153		5562		9204										0,1445204	8842	0,1012	N
9_R1	73	809	008	85423	201	8	0	018	0	579	0	0	0	6,00E-04	0	0	0	0	0	61	575	53296	A
	0,34		0,01		0,00			0,00		0,00	0,02										0,07		
JQ327	2451		4140	0,1662	5068	0,044		3309		7711	6351			0,10617						0,1561897	1201	0,0564	N
_R1	565	0	321	66773	251	67797	0	286	0	78	599	0	0	1741	0	0	0	0	0	18	615	59381	A
	0,24		0,11		0,00					0,00											0,10		
JO738	9240		3009	0,1764	5454		0,0617		0,03135	2239				0,05541	0,060388					0,0836477	5921	0,0325	N
_R1	906	0	311	00955	507	0	8094	0	0657	3	0	0	0,02264036	264	963	0	0	0	0	39	903	11818	A
JR770	0,33		0,09		0,01	0,034				0,05	0,00										0,15		
_Tum	0215		3047	0,1617	6820	75711				1812	1273			0,01448		0,03743				0,0104014	5102	0,0929	4
eur	976	0	202	03637	996	7	0	0	0	988	682	0	0	6928	0	1705	0	0	0	08	365	45996	1

	0,28		0,11		0,08	0,039				0,02												0,11		
JU311	2688		2852	0,1954	0657	20319				0279											0,0626439	8906	0,0873	N
_R1	656	0	728	25271	136	2	0	0	0	187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	02	422	43506	A	
	0,35		0,14		0,03	0,020				0,01	0,00										0,11			
JU311	4018		2648	0,2096	0064	50912			0,00490	9553	9227									0,0350578	3688	0,0606	N	
_TS	162	0	979	74092	48	3	0	0	5662	845	957	0	0	0	0	0	0	0	0	63	463	51374	A	
JO912	0,12		0,09			0,003														0,23				
_Tum	8977		0770			05372			0,07781						0,015712				0,18625		6174	0,2612		
eur	645	0	449	0	0	9	0	0	9231	0	0	0	0	0	498	0	0	0	1085	0	622	4074	9	
JN315	0,08	0,03	0,13		0,01	0,210				0,06	0,05										0,04		1	
_Tum	9853	6770	3879		6740	58559			0,05867	8423	0297								0,02888	0,0625741	1664	0,2016	1	
eur	899	099	031	0	435	5	0	0	9504	491	694	0	0	0	0	0	0	0	8989	3	228	42906	0	
	0,09		0,18		0,05	0,043				0,00	0,00										0,06			
JO912	8011		8062	0,0261	1447	27850				9676	4685				0,002517				0,15256	0,1929724	7213	0,1633	N	
_R1	189	0	252	95337	179	5	0	0	0	616	323	0	0	0	874	0	0	0	4727	03	552	75042	A	
	0,09		0,24		0,01	0,021		0,04		0,03											0,11			
JS637	8368		7809		0091	25720		0589		8908									0,08974	0,1610055	4042	0,1781	N	
_TS	115	0	411	0	31	3	0	61	0	298	0	0	0	0	0	0	0	0	5935	28	294	82296	A	
	0,20		0,19		0,10						0,02										0,07			
JR450	1526		6513	0,0276	6951	0,036			0,01478		2425				0,010226				0,09069	0,0613426	5005	0,1564	N	
_R1	271	0	609	93644	582	39615	0	0	3821	0	008	0	0	0	202	0	0	0	366	42	314	42098	A	
	0,15		0,16		0,08	0,059				0,00	0,01										0,08			
JL718	1613		1215		6647	18911			0,01309	7790	7122								0,17809	0,1013630	7361	0,1364	N	
_TS	507	0	305	0	158	7	0	0	2781	857	425	0	0	0	1,00E-04	0	0	0	4407	91	353	55759	A	
	0,08		0,16		0,15	0,055		0,02		0,03											0,04			
JL664	8409		8974		3105	06503		6614	0,03316	3137					0,003861				0,15972	0,0661941	8534	0,1632	N	
_TS	164	0	358	0	164	5	0	103	9468	497	0	0	0	0	309	0	0	0	6295	85	633	08788	A	

JL584	0,16	0,01	0,14		0,01	0,042					0,03	0,060						0,00					
_Tum	7077	9792	0010	0,0806	0158	84366	0,1801				4783	66300		0,00571				3854		0,2456198		0,0086	6
eur	109	426	325	43999	49	2	46332	0	0	0	112	2	0	1793	0	0	0	558	0	39	0	95352	1
	0,15		0,08		0,11					0,04	0,04	0,147					0,00				0,02		
JR450	3298		6535	0,1457	5782				0,06782	4736	9697	88063					4170			0,1633704	0903		N
_TS	507	0	138	9862	154	0	0	0	6198	325	202	2	0	0	0	0	964	0	0	07	854	0	A
	0,23	0,03	0,05			0,085				0,00	0,01										0,05		
JN315	4234	3569	5964	0,3699		25279	0,0520		0,01458	6171	0575			0,00969						0,0155240	6757	0,0556	N
_R1	572	363	938	79174	0	7	17408	0	4618	827	3	0	0	6566	0	0	0	0	0	18	341	72079	A
	0,22		0,05		0,02	0,047				0,01											0,07		
JO738	6615		0348	0,3348	0484	23513		4,00	0,02451	7451				0,03542	0,002083					0,1130035	1486	0,0561	N
_TS	141	0	746	05218	305	4	0	E-04	8014	763	0	0	0	4986	568	0	0	0	0	82	19	22625	A
	0,19	0,00	0,21		0,11	0,088					0,02										0,09		
JL718	7819	5610	4195	0,1644	0754	54592	0,0205				5416										2385	0,0802	N
_R1	472	092	894	74761	296	3	47865	0	0	0	471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	536	49689	A
	0,16		0,14		0,14	0,046				0,00	0,01										0,10		
JQ327	7278		8670	0,2706	8380	32042			0,01233	5829	3759										3329	0,0834	N
_TS	117	0	287	16517	306	2	0	0	4798	137	224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	076	82117	A
	0,19		0,11		0,14	0,075				0,00											0,06		
JM28	6979		1573	0,1958	6566	47868			0,03289	7379	6,00									0,0682652	6877	0,0975	N
9_TS	576	0	544	25086	927	4	0	0	5319	653	E-04	0	0	0	0	0	0	0	0	43	494	14517	A

Table 3

R1.t	M2	M0	Monocytes	Mast.cells.resting	Plasma.cells	B.cells.memory	T.cells.CD4.naive	Neutrophils	T.cells.follicular.helper	M1	Tregs	NK.cells.resting	T.cells.CD4.memory.activ
JQ327_R1	0,342	0	0,0141	0,17	0,0051	0,045	0	0,003	0	0,01	0,03	0	0
JN315_R1	0,234	0,034	0,056	0,37	0	0,085	0,05	0	0,015	0,01	0,01	0	0
JO912_TS	0,016	0,083	0,3111	0,26	0,0013	0,014	0	0,001	0,005	0	0,04	0	0
JO738_R1	0,249	0	0,113	0,18	0,0055	0	0,06	0	0,031	0	0	0	0,023
JO738_TS	0,227	0	0,0503	0,33	0,0205	0,047	0	######	0,025	0,02	0	0	0
JP886_TS	0,222	0	0,234	0,16	0,0041	0,013	0	0,064	0,008	0,01	0	0	0
JO912_R1	0,098	0	0,1881	0,03	0,0514	0,043	0	0	0	0,01	0	0	0
JR588_R1	0,364	0	0,1186	0	0,0015	0,007	0	0,002	0,015	0,05	0	0	0
JL697_R1	0,457	0	0,064	0,02	0,0101	0,026	0	######	0,005	0,03	0	0	0
JL584_R1	0,16	0,07	0,2793	0	0,0056	0,002	0	0,163	0	####	0	0	0
JR770_R1	0,072	0,014	0,3202	0	0,0157	0,005	0,01	0,128	0,013	0	0,01	0	0
JS637_TS	0,098	0	0,2478	0	0,0101	0,021	0	0,041	0	0,04	0	0	0
JQ915_R1	0,366	0	0,1563	0	0	0,019	0	0,049	0,002	0,01	0	0	0
JP886_R1	0,285	0	0,2719	0,01	0,012	0,001	0,01	0	0,001	0,04	0	0	0
JN315_TS	0,424	0	0,1053	0,12	0,0317	0,039	0	0	0	0	0	0	0
JM289_R1	0,217	0,02	0,082	0,14	0,0419	0,064	0	0,006	0	0,05	0	0	0
JS637_R1	0,427	0,034	0,0464	0,09	0,0065	0,037	0	0	0,003	0,06	0	0	0

R1.h	M2	M0	Monocytes	Mast.cells.resting	Plasma.cells	B.cells.memory	T.cells.CD4.naive	Neutrophils	T.cells.follicular.helper	M1	Tregs	NK.cells.resting	T.cells.CD4.memory.activ
JU311_R1	0,283	0	0,1129	0,2	0,0807	0,039	0	0	0	0,02	0	0	0
JS393_TS	0,319	0	0,0744	0,05	0,0533	0,008	0	0	0,016	0,03	0	0	0
JS393_R1	0,33	0	0,0892	0	0,0291	0,03	0	0	######	0,02	0	0	0
JM478_R1	0,417	0	0,0597	0,12	0,0546	0	0	0	0,013	0,02	0	0	0
JR770_TS	0,036	0,072	0,3012	0	0,0563	0,125	0	0,068	0	0	0	0,07	0

JM478_TS	0,11	0	0,2757	0,07	0,2012	0	0	0	0,076	0	0	0,02	0
JR588_TS	0,187	0	0,2923	0	0,1376	0,041	0,05	0,034	0,023	0	0,01	0	0
JQ274_TS	0,053	0	0,2066	0	0,0202	0,011	0	0,099	0,04	0,04	0	0	0
JR450_TS	0,153	0	0,0865	0,15	0,1158	0	0	0	0,068	0,04	0,05	0,15	0
JQ327_TS	0,167	0	0,1487	0,27	0,1484	0,046	0	0	0,012	0,01	0,01	0	0
JL697_TS	0,094	0	0,2735	0,01	0,2342	0,019	0	0,042	0,028	0	0,09	0,05	0
JQ915_TS	0,249	0	0,1298	0,08	0,1158	0,094	0,05	0,03	0,013	0,01	0,01	0	0
JR450_R1	0,202	0	0,1965	0,03	0,107	0,036	0	0	0,015	0	0,02	0	0
JL664_TS	0,088	0	0,169	0	0,1531	0,055	0	0,027	0,033	0,03	0	0	0
JL584_TS	0	0,024	0,5147	0	0,027	0,053	0,02	0	0,006	0	0,05	0	0
JLN133_TS	0,164	0	0,3505	0,03	0,1103	0,095	0	0,009	0	0	0	0	0
JM289_TS	0,197	0	0,1116	0,2	0,1466	0,075	0	0	0,033	0,01	#####	0	0
JL718_R1	0,198	0,006	0,2142	0,16	0,1108	0,089	0,02	0	0	0	0,03	0	0
JL718_TS	0,152	0	0,1612	0	0,0866	0,059	0	0	0,013	0,01	0,02	0	0
JL664_R1	0,479	0	0,0848	0,1	0,0106	0,058	0	0	0,025	0,01	0,01	0	0
JQ274_R1	0,42	0	0,0456	0	0,0224	0,029	0	0,005	0,028	0,02	0	0	0
JN133_R1	0,41	0	0,175	0,12	0,0188	0,058	0,06	0	0	0,01	0,02	0	0
JU311_TS	0,354	0	0,1426	0,21	0,0301	0,021	0	0	0,005	0,02	0,01	0	0

Table 4

Apport de cette première étude

Ces résultats relatent la première étude moléculaire de la capsule péritumorale dans les sarcomes des tissus mous. Cette analyse porte sur un faible nombre de cas mais évoque la possibilité d'identifier un profil à risque de rechute. Il est difficile de se focaliser uniquement sur le risque de rechute locale dans une pathologie ou ce risque est estimé à 10%. Nous avons eu la chance de pouvoir attendre un recul suffisant pour permettre d'observer des évènements. Il existe effectivement dans notre groupe R1.t plus d'évènements, et de façon plus rapide. Comme nous l'avons vu ce groupe est également associé à une tendance à l'infiltration plus importante en macrophages M0 et M2, ainsi que d'autres acteurs de la réponse immunitaire comme les cellules mastocytaires, les lymphocytes T CD4 mémoire, les LT CD8 et les cellules NK activées.

Ces données sont intéressantes et méritent d'être testées sur une cohorte plus importante.

Une publication très récente par Kim (Kim et al. 2023) présente des résultats très intéressants sur l'analyse transcriptomique du tissu adjacent non tumoral dans ces cas de carcinome colorectal. Il est présenté que cette analyse transcriptomique et la composition des cellules immunitaires sont de meilleurs prédicteurs de survie et de rechute que la tumeur primaire.

Partie 2 : Identification de critères morphologiques de rechute dans les sarcomes des tissus mous

Identification de critères morphologiques de rechute

La classification morphologique des sarcomes fournit des éléments pronostics en particulier grâce au grade histologique FNCLCC. Néanmoins certains patients ont des évolutions contrastant avec le grade évalué et le grade intermédiaire constitue une situation d'incertitude pour les équipes cliniques rendant parfois la décision thérapeutique complexe. D'autres marqueurs complémentaires sont donc nécessaires afin de mieux stratifier le risque évolutif des patients.

Partie 2.A les Structures lymphoides tertiaires

Identification de biomarqueurs immunologiques dans l'environnement péritumoral prédictif du risque de rechute locale

Ou Valeur pronostique des structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans les sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc opérés d'emblée

Rationnel de l'étude

La prescription d'une chimiothérapie néoadjuvante doit se discuter dans les sarcomes à fort potentiel métastatique. Ces chimiothérapies conventionnelles s'avèrent relativement peu efficaces et non pérennes sur le long terme. L'alternative vers l'immunothérapie parait alors tout à fait séduisante, d'autant plus que les effets secondaires sont moindres et que la

réaction immunitaire antitumorale peut permettre d'envisager la guérison complète de la maladie.

Nous allons exposer les grandes voies immunitaires évoquées dans la carcinogénèse. L'interaction du système immunitaire avec les cellules cancéreuses de façon générale est schématisée par l'i*mmuno editing* avec différentes étapes clés que sont l'élimination, l'équilibre et le phénomène d'échappement (Figure 9). SI le système immunitaire fonctionne normalement, les systèmes immuns inné et adaptatif vont pouvoir coopérer afin de reconnaitre et surtout de détruire les cellules tumorales, quel que soit sa phase de développement. La phase d'équilibre évoque plutôt la sélection de clônes cellulaires qui ont résisté à la phase d'élimination. Pendant cette phase la tumeur est stable. Enfin, vient la phase d'échappement, au cours de laquelle la tumeur prend le dessus et évolue de manière non contrôlée jusqu'à une tumeur cliniquement décelable. Pour initier l'immunité, les cellules dendritiques (CD) doivent obtenir des échantillons d'antigènes dérivés de la tumeur, qui peuvent être ingérés in situ ou délivrés de manière exogène dans le cadre d'un vaccin (Mellman, Coukos, et Dranoff 2011; Spalato-Ceruso et al. 2022). La présentation antigénique de la tumeur peut être déficiente car la tumeur peut inhiber l'expression de certains peptides dominants. Les tumeurs peuvent également réguler leur expression de molécules CMH de classe I ou leur expression d'antigènes tumoraux cibles en proposant des peptides plutôt récessifs. A la phase d'équilibre, les CD favorisent la tolérance par les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui s'opposerait à une réponse antitumorale.

De plus, les tumeurs peuvent libérer des molécules immunosuppressives, telles que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui consomme du tryptophane et limite la fonction des lymphocytes T (Munn et Mellor 2016).

Des études au niveau cellulaire ont montré une immunogénicité relativement élevée dans certains sous-types de sarcomes, ce qui permet à certains types de sarcomes de répondre à l'immunothérapie. Cependant, le sarcome étant une maladie hétérogène, il est essentiel de pouvoir identifier ceux qui vont pouvoir bénéficier de ce type de thérapeutique. Les lymphocytes infiltrant la tumeur ou TILS et plus particulièrement la présence de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ intratumoraux ont montré une corrélation avec la survie des patients (Galon et al. 2006; Fridman et al. 2012). La présence de taux élevé de macrophages M2 pourrait également être corrélé à un mauvais pronostic du fait de propriétés

immunosuppressives sur l'environnement péritumoral (Michot in press (Medrek et al. 2012; Sugimoto et al. 2014; Jensen et al. 2009).

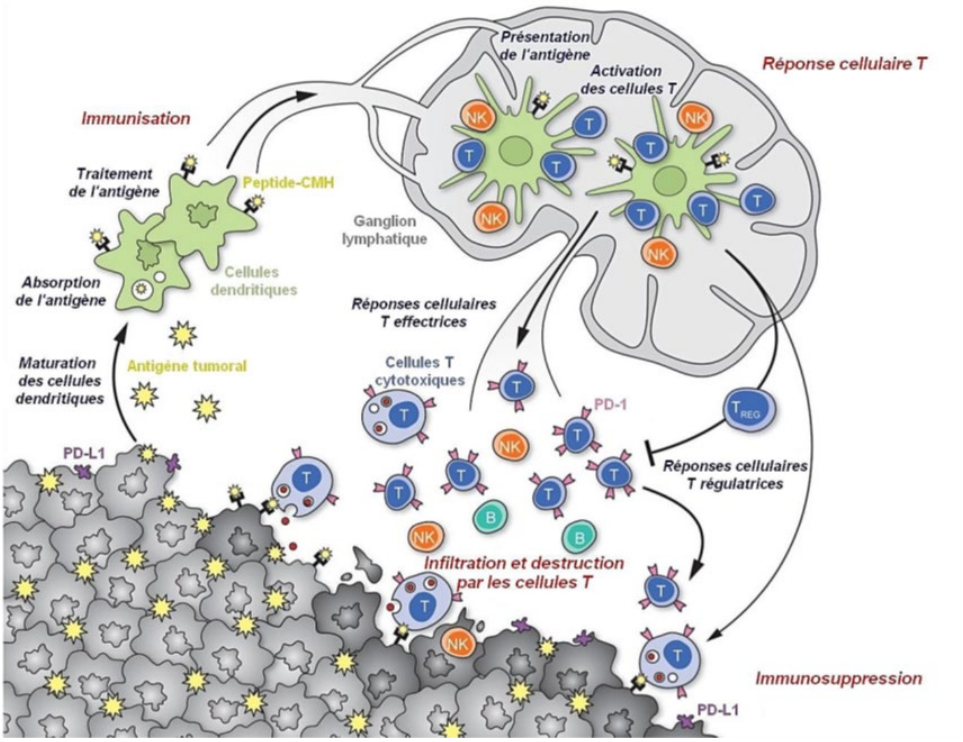


Figure 9. Cycle de l'immunité antitumorale

Adaptation de Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 21 déc 2011;480(7378):4809. PMID: 22193102

Enfin, la réponse antitumorale adaptative va avoir lieu dans les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions lymphatiques. Ainsi la technique du ganglion sentinelle va permettre un *staging* de la maladie globale comme dans le cancer du sein pour permettre l'adaptation des différents traitements adjuvants. Les organes lymphoïdes secondaires comprennent aussi la rate, les amygdales et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Les lymphocytes B et les lymphocytes T naïfs et mémoire vont reconnaitre les CD présentant les antigènes tumoraux. Ceux–ci vont alors cheminer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires *via* le sang et vont pouvoir être présentés aux lymphocytes CD4+ et CD8+. Une réaction cytotoxique *via* les lymphocytes CD8+ cytotoxiques et les lymphocytes Natural Killer (NK) va alors être déclenchée. Cette réaction va elle-même être amplifiée et permettre le relargage de nouveaux peptides tumoraux. Certaines études récentes ont montré que ce type de

réponse peut avoir lieu directement au sein de la tumeur ou à son contact direct. Dans ce cas les lymphocytes B centraux se positionnent en amas cellulaire avec une couronne de lymphocytes T mêlés à des CD matures leur donnant un aspect proche des organes lymphoïdes secondaires et alors nommé structures lymphoïdes tertiaires (Petitprez et al. 2020). Il existe un critère de nombre (>50) permettant de classer cette structure en mature c'est à dire en centre germinatif. Dans les autres cas plus douteux, une IHC est nécessaire afin de classer celle-ci en fonction de son *pattern* à savoir cellule isolée, maille unique ou mailles multiples, du moins au plus organisé. Ces structures ont été décrites au sein de la prolifération tumorale (équivalent de notre tumeur centrale), à la marge d'invasion (équivalent de notre tumeur périphérique) et ou dans le tissu sain péritumoral (équivalent de notre marge R1) (Vanhersecke et al. 2023; Petitprez et al. 2020; Cabrita et al. 2020; Helmink et al. 2020). La structure et la forme des TLS sont représentés sur les figures 10, 11 et 12 issues des travaux et publications de Vanhersecke (Vanhersecke et al. 2023; 2021).

Des études récentes ont montré que le mode de réaction de l'hôte constituait un facteur important pour le pronostic de la tumeur et sa réponse aux traitements en particulier à l'immunothérapie. Nous avons récemment montré que les structures lymphoïdes tertiaires matures (TLS pour Tertiary Lymphoid Structures) retrouvées immédiatement en périphérie de la tumeur était le facteur prédictif le plus important pour la réponse à l'immunothérapie en situation avancée pour différents cancers. Il a été rapporté que la présence des TLS était associée à un pronostic favorable dans différents carcinomes et mélanomes (Galon et al. 2006; Cabrita et al. 2020).

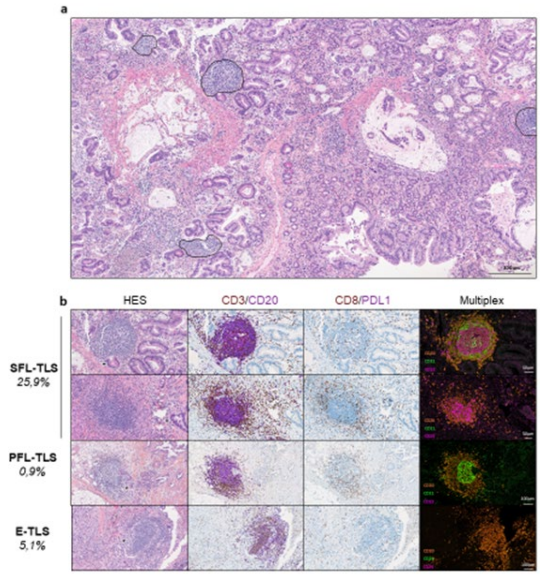


Figure 10 : Évaluation de la présence de TLS et de leur stade de maturation dans les tumeurs. Visualisation de la structure lymphoïde tertiaire sur les lames HES. Contrôle par double marquage CD3-CD20 en immunohistochimie. Absence de marquage CD8-PDL1. Visualisation de la forme du TLS en multiplex qui ressemble à un organe lymphoïde secondaire avec sa forme en couronne.

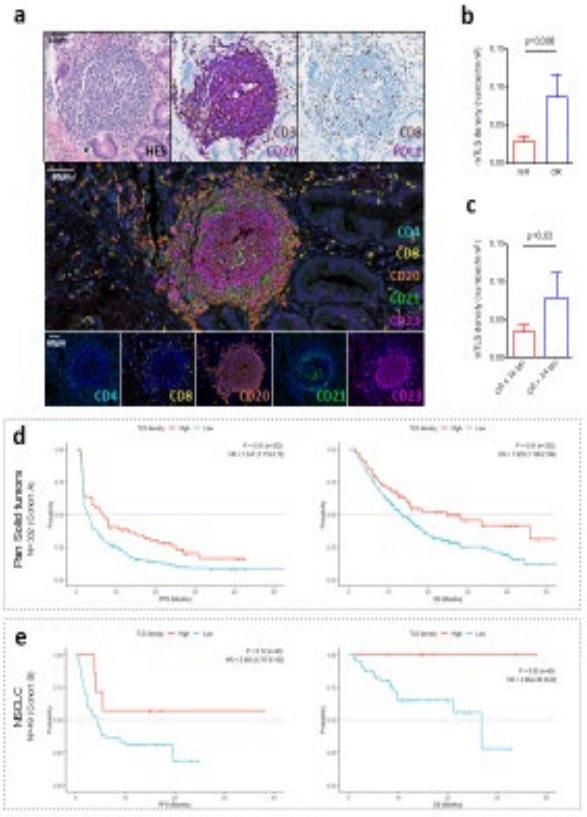


Figure 11 : cf Standardized Pathology Screening of Mature Tertiary Lymphoid Structures in Cancers, issue de Vanhersecke L et al

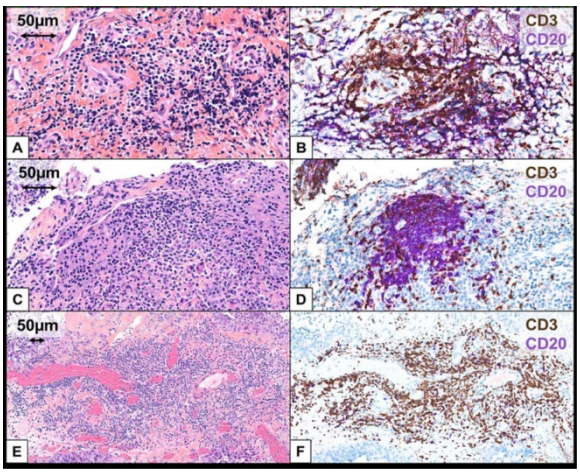


Figure 12 : Double marquage en immunohistochimie permettant de poser le diagnostic de structures lymphoïdes tertiaires lorsqu'il existe un doute en HES issue de Vanhersecke et al.

Nous proposons ici de tester la valeur pronostique des TLS dans une série de 220 sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc opérés d'emblée à l'Institut Bergonié pour la tumeur primaire non antérieurement traitée. Cette évaluation se fera par les deux pathologistes (François Le Loarer et Lucile Vanhersecke) qui ont publié l'article sur les TLS et réponse à l'immunothérapie (Vanhersecke et al. 2021). La méthode consiste en une relecture histologique des cas avec si besoin un immunomarquage avec les anti-CD20 et CD23 afin de s'assurer du caractère mature des TLS. Une étude pronostique sera effectuée afin de tester la valeur respective des paramètres suivants : âge et sexe du patient, taille, localisation et profondeur de la tumeur, type et sous-type histologique, grade histologique de la tumeur et présence de TLS matures pour la survie globale, la survie sans récidive locale et survie sans métastase.

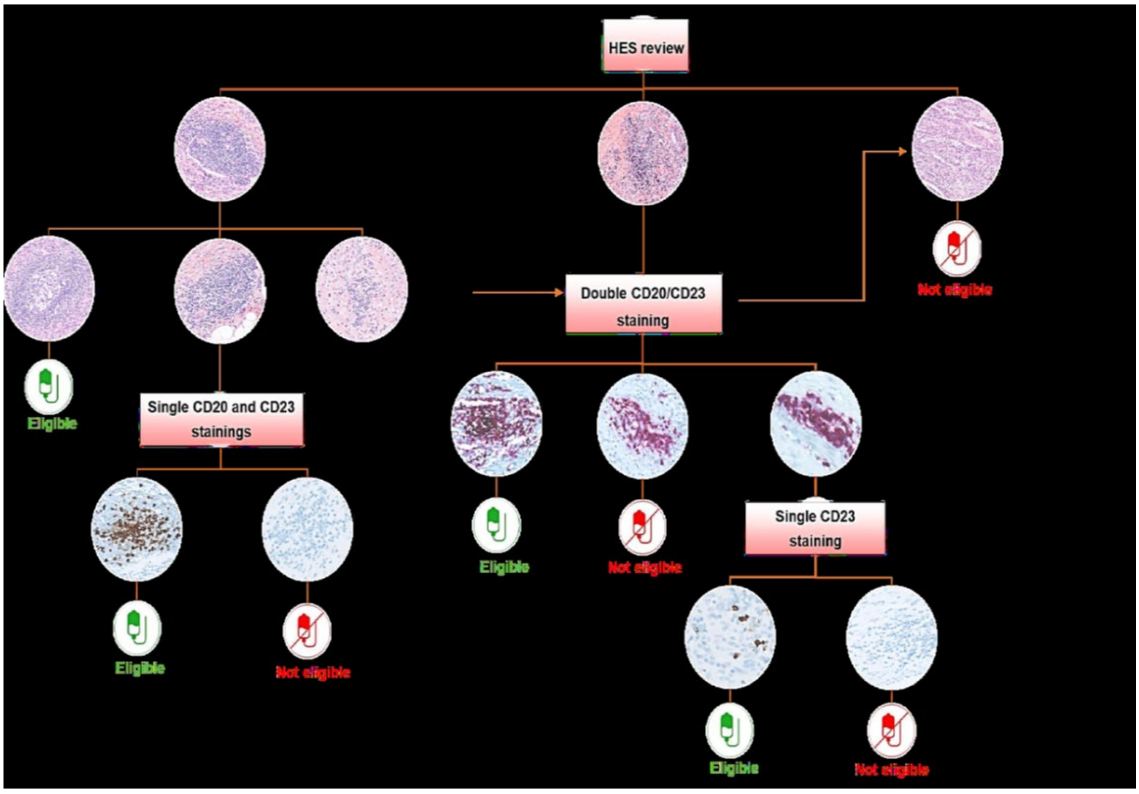


Figure 13 : algorithme décisionnel à la recherche de structures lymphoïdes tertiaires. Issu de Vanhersecke et al. Nous démarrons par l'analyse de la lame HES. Soit il existe un centre germinatif et on peut s'arrêter là, soit il s'agit d'une structure lymphoide tertiaire potentiellement mature et on réaliser alors une immunohistochimie avec marquage CD20 et CD23. Ces deux marqueurs doivent être positifs avec formation de mailles (comme un réseau de cellules) pour être notés matures.

Méthodologie détaillée

Objectif principal

Étudier la valeur pronostique du statut TLS et de sa localisation sur le devenir des patients dans les sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc opérés d'emblée.

Objectifs secondaires

Au sein des patients avec sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc opérés d'emblée et identifiés TLS+ : identifier la valeur pronostique des caractéristiques intrinsèques au statut TLS+ (maturité, localisation, pattern).

Analyse statistique

1. Analyses descriptives

Flow-chart des patients représentant les populations éligibles et éligibles TLS+.

Les caractéristiques des patients au diagnostic seront décrites par population (éligible et éligible-TLS+).

Les variables suivantes seront décrites :

- Variables socio-démographiques :
  - Sexe,
  - Âge au diagnostic (< 50 et > 50 ans)
  - Devenir du patient = perdu de vue, statut vital = vivant ou décédé (cause du décès)
- Variables cliniques :
  - Site de la tumeur (3 modalités)
    - membre inférieur,
    - membre supérieur,
    - paroi du tronc.
  - Profondeur de la tumeur = superficielle / profonde / superficielle et profonde
  - Taille de la tumeur (mm) < 5 cm, de 5 à 10 et > 10 cm
- Variables anatomopathologiques :
  - Grade FNCLCC de la tumeur : 1,2,3
  - Multifocalité oui ou non
  - Histotype = LMS, DD/pleom LPS, Myxoid LPS, MPNST, Myxofibro, Synovial, Vascular, UPS, Other
  - Marges chirurgicales : R0, R1
  - Type de R1-TS (adipeux ou muscle)
  - Classe moléculaire (simple vs complexe)
  - Type invasion (bien limité, infiltrant1, infiltrant 2)
- Variables intrinsèques au statut TLS+ (décrites uniquement pour les patients TLS+) :
  - Maturité : mature, immature ou cellule isolée, pas de TLS
  - Localisation : TS, R1, TP, TC
  - Pattern : Centre germinatif ou maille

Les données de survie seront décrites par population (éligible et éligible-TLS+):

- Recul médian,
- Statut vital : vivant / décédé,
- Rechute loco-régionale : oui / non,
- Rechute métastatique : oui / non,
- 1er évènement observé : rechute loco-régionale / métastase / décès,
- Survies médianes : globale, sans rechute loco-régionale, sans rechute métastatique.

Les variables qualitatives seront décrites en termes d'effectifs et de pourcentages.

Les variables quantitatives seront décrites à partir de statistiques descriptives (moyenne et écart-type, ou, valeurs extrêmes, quartile et médiane).

Le recul médian sera calculé à l'aide de la méthode Kaplan-Meier inversé.

Les critères de survie seront analysés à l'aide de la méthode Kaplan-Meier. Les taux de survie médians seront rapportés avec un intervalle de confiance de 95%.

Analyses explicatives

Dans la population éligible : les facteurs pronostiques de survie seront recherchés. Les facteurs pronostiques candidats sont les suivants :

- Age
- Sexe
- Site de la tumeur,
- Profondeur,
- Taille
- Extension locorégionale = T3 = Envahissement osseux ou vasculo-nerveux
- Grade,
- Multifocalité,
- Histotype subcategory (LMS, DD/pleom LPS, Myxoid LPS, MPNST, Myxofibro, Synovial, Vascular, UPS, Other)
- Type de chirurgie
- Marges
- Type de R1 TS
- Radiothérapie
- Chimiothérapie
- Classe moléculaire (simple, complexe)
- Type d'invasion (bien limité, infiltrant 1, infiltrant 2)
- TLS (m, i, no)

Dans la population éligible TLS+ : les facteurs pronostiques de survie seront recherchés. Les facteurs pronostiques candidats sont les mêmes que pour la population éligible, auxquels s'ajouteront les variables intrinsèques au statut TLS+ :

- Maturité (immature ou mature)
- Localisation (TS, R1, TP, TC)
- Pattern (centre germinatif, maille, cellule isolée)

Modèles de survie :

- Pour la survie globale : à partir d'un modèle de Cox à risques non proportionnels.
- Pour la survie sans rechute locale et la survie sans méta : à partir d'un modèle prenant en compte les risques compétitifs (si moins de 10%, un modèle de Cox sera retenu).
- Stratégie de sélection des variables pour les modèles multivariés finaux :

Toutes les variables avec des valeurs $p < 0,20$ en univarié seront considérées éligibles pour le modèle multivarié.

Un modèle multivarié sera construit en sélectionnant les variables significatives à $p < 0,05$ par une stratégie manuelle pas à pas descendante permettant de tenir compte des phénomènes de modification d'effet ou de confusion (Moons et al. 2012).

Nous vérifierons à chaque étape que le retrait d'une variable ne provoque pas de changements importants dans l'estimation des autres paramètres. En partant du modèle complet avec toutes les variables, celles-ci seront éliminées une à une, en partant de celle dont la p-value est la plus élevée jusqu'à ce qu'il ne reste que les variables significatives au seuil choisi $p < 0,05$.

Les interactions cliniquement pertinentes seront testées. Celles-ci seront testées séparément dans le modèle multivarié comportant les effets principaux. Les interactions significatives au seuil $p < 0,05$ seront conservées et introduites ensemble dans le modèle multivarié.

Les premières analyses ont opposé les TLS dits matures avec centres germinatifs, mailles et cellules isolées positives CD20-CD23 versus l'absence de TLS et ceux qui sont dit immatures car non retrouvés en immunohistochimie.

Une seconde analyse a été réalisée en opposant les « TLS fully matures » : CG (centre germinatif) et maille vs les « TLS not fully matures » associant alors les no TLS, les I TLS et les cellules isolées.

Il s'agit bien d'un continuum entre ces différents stades de réaction immune visibles au sein de la tumeur et au sein du tissu péritumoral direct.

Résumé de l'étude TLS

>> Compte tenu du rôle de l'immunité dans le pronostic de nombreux cancers nous avons souhaité réaliser une évaluation systématique de l'infiltrat immunitaire associé à une série rétrospective de sarcomes

Ce premier volet morphologique va se focaliser sur l'infiltrat immunitaire associé aux sarcomes. Nous savons que les structures lymphoïdes tertiaires (TLS) sont un des facteurs prédictifs de réponse à l'immunothérapie mais aussi un facteur pronostic positif dans les

tumeurs infiltrées par ces structures (Vanhersecke et al. 2021; Brunet et al. 2022). Il s'agit d'agrégats de cellules B et de cellules folliculaires qui reproduisent des structures ganglionnaires et qui fonctionnent comme de véritables organes lymphoïdes pour diriger et organiser la réaction immunitaire antitumorale. Nous allons étudier de façon spécifique la réaction immunitaire située au front d'invasion de la tumeur et dans les tissus sains juxta tumoraux. Leur rôle évoqué dans les cancers solides est celle de la génération de réponse anti tumorale protectrice. Cette entité est bien connue et a déjà été décrite dans la plupart des cancers en étant associée à de meilleurs pronostics (Petitprez et al. 2020). Nous proposons ainsi la recherche systématique de présence de TLS sur lames HES dans la zone saine péritumorale et tumorale périphérique, pour permettre ensuite de la corréler avec la rechute. Il s'agit donc d'évaluer la présence de structures lymphoïdes tertiaires comme marqueur pronostique de la rechute.

Tertiary Lymphoid Structure localization as a major prognostic factor in primary soft-tissue sarcoma?

Audrey Michot and Lucile Vanhersecke
Derek Dinart
Rihab Azmani
Aurélien Bourdon
Valérie Vélasco
Carine Bellera
Iris Bonomo
Maelys Sauzeau
Raul Perret
Jean-Michel Coindre
François Le Loarer

Abstract

Background: Soft-tissue sarcoma are heterogenous group of tumors with variable and poor prognosis.

Purpose: We purpose to test the prognostic value of the presence, maturity and semi quantitative analysis of TLS in bulk tumor and surrounding healthy tissue in a retrospective study of 220 cases from Institut Bergonié.

Results: We reported different Kaplan Meier curves in terms of OS in mTLS+ vs mTLS-. The following factors remained associated with TTLRP in the multivariate setting: score 2+/3+. Being 2+/3+ and fully mature increase the risk of locoregional progression by a factor of 3.01 (95% CI 1.45;6.24) compared to not.

Conclusion: TLS could be the warning signal to tell us watch out, I'm going to relapse. These results could assist clinicians to select patients for adjuvant immunotherapies and provide a more individualize strategies for patient with STS.

Keywords: biomarker ; prognostic factor ; tertiary lymphoid structures (TLS) ; tumor microenvironment ; soft-tissue sarcoma (STS)

Summary / Translational relevance

Abbreviations

FNCLCC: fédération national des centres de lutte contre le cancer
IHC: immunohistochemistry
ICI immune checkpoint inhibitors
OS: overall survival
TLS; tertiary lymphoid structures : mTLS+ fully mature TLS ; mTLS- not fully mature TLS
TTDP: time to distant progression
TTLP: time to local progression
STS: soft tissue sarcoma

Introduction

Soft-tissue sarcoma (STS) are a rare and heterogenous group of tumors affecting adults and known to be of poor and variable prognosis (1). At diagnosis, prognostic value is mostly given by the histological grade, tumor size and depth (2–5). In their localized and non-metastatic form, limbs and trunk wall sarcomas are standardly treated by wide surgical excision (6) . Despite complete surgical resection of localized disease, 40-50% of patients develop local recurrence or metastasis within 5 years (2,7,8). Adjunction of chemotherapy proves beneficial in STS with a high metastatic potential group (9). when adjunction of radiotherapy optimizes the local control of disease. Nowadays, metastatic potential is still assessed by the histological FNCLCC grade. A grade 3 or a grade 2 reclassified is associated with a worse prognosis. It has been shown that a grade 2 could be reclassified in grade 3 if there is necrosis on MRI or using a nomogram, such as the Sarculator which associates the age of the patient, the grade, the histological subtype and the tumor size (3,10,11). The local recurrence which marks a crucial point in the management of the patient (which surgery will be necessarily more complex and often in an irradiated area) requires a better assessment of the risk.

Recent studies have shown that the reaction mode of the host is also a significant prognostic factor as well as its response to treatment particularly, to immunotherapy. It has been highlighted that mature tertiary lymphoid structures (mTLS) found within the tumor or in the vicinity of the tumor were the strongest predictive factor of response to immunotherapy in advanced cancers (12). Tertiary lymphoid structures (TLS) have been identified in several solid tumor and are associated with better survival when they are present in the tumor microenvironment (13–16). It has been reported that the presence of TLS was associated with a better prognosis in various carcinomas and melanomas (17,18). The aim of this study is to set the prognostic value of TLS in patients who had limbs and trunk wall STS surgery first at one center and to test it at a new predictive biomarker. 220 primarily soft tissue sarcomas were reviewed for the presence of TLS to assess their impact on overall survival (OS), Time to local progression (TTLP) and Time to distant progression (TTDP).

In summary, given the incidence and mortality, the detection, risk assessment and survival prognostic analyses are essential for improving the care of patient.

Material and methods

Patients

This study was based on data retrieved retrospectively from the national clinico-biological sarcoma database (SarcomaBCB, https://conticabase.sarcomabcb.org) between January 1990 and December 2020. The inclusion criteria were age ≥18 years, primary soft tissue sarcoma of limbs or trunk wall, histologically proven malignant tumor, and patients treated by primary surgical resection in Bergonié Institute (Bordeaux). Patients treated before surgery and radio-induced sarcomas were excluded. The study was conducted following the ethical principles and the Bergonié Institute's review board

Sample selection and pathological assessment of Tertiary Lymphoid Structure (TLS) status

All cases were retrieved from the archives of the Pathology department of Bergonié Institute.

The pathological assessment workflow is summarized in Supplementary Figure 2. All hematoxylin eosin and saffron (HES) slides were blindly analyzed by a pathologist (L.V.) for lymphoid aggregates that may correspond to TLS. For each sample, the pathologist had to sequentially score the following parameters: (1) the presence of TLS on the basis of HES (categorized as 0: absence of TLS; 1: presence of lymphoid aggregates requiring an immunohistochemical study for ascertain TLS presence; 3: mTLS displaying germinal center on HES slide) (Figure or Supplementary Figure 3, (2) localization of the lymphoid structures (categorized as TC: in the tumor center, TP: at the periphery of the tumor, i.e. in contact with the tumor invasion front; R1: beyond the tumor invasion front up to 1 cm from the tumor; TS: in non-tumoral tissue beyond 1 cm of the tumor) (Figure 4) and (3) a semi-quantitative TLS density score based on the average number of lymphoid aggregates per slide, estimated on all slides analyzed (categorized as 1+: less than 1 lymphoid aggregate per slide; 2+: 1 to 3 lymphoid aggregates per slide; 3+: more than 3 lymphoid aggregates per slide) (Figure or Supplementary Figure 5. Preferential location of lymphoid aggregates was noted for each case (i.e. TC, TP, R1 or TS). When lymphoid aggregates without germinal center were spotted in the samples, a representative block was selected to perform CD20 and CD23 immunohistochemical stainings on serial sections to assess TLS status and TLS maturity according to the pathological screening method previously validated [Vanhersecke et al, Lab invest]. Applying these criteria, samples were classified as TLS positive or TLS negative. TLS were subsequently classified as 0: immature TLS (iTLS), 1: mature TLS (mTLS) with only isolated CD23 follicular dendritic cells (FDC) or 2: mTLS displaying a meshwork of CD23 FDC (Figure or Supplementary Figure 6). Finally, these categories have been grouped into two main groups: (i) not fully mature TLS (nfmTLS, including samples without TLS, iTLS and mTLS with only scattered CD23 FDC and (ii) fully mature TLS (fmTLS, gathering mTLS with germinal center visible on HES staining, and mTLS displaying a meshwork of CD23 follicular dendritic cells). Localization of mTLS in the sample was assessed (i.e. TC, TP, R1 or TS).

Immunohistochemistry stainings:

Stainings were performed on 3-µm paraffin slides with the procedure U ultraView DAB or U optiview DAB IHC v6 on Benchmark Ultra Ventana. Details are summarized in Supplementary Table 1. Single CD20 (clone L26) IHC staining was performed with a predilute (760-2531-Roche/Ventana) antibody using Kit UltraView Universal DAB (Ventana) with following conditions (CC1(64'); 36' incubation). Single

CD23 (clone SP23) IHC staining was performed with a predilute (790-4408-Roche/Ventana) antibody using kit Optiview Universal DAB (Ventana) with following conditions (CC1(64'); 36' incubation).

Statistics and multivariate analysis

The following variables have been investigated as prognostic factors for survival on the eligible population (n=219). Data were collected and updated with age (median and < 50 years), gender, tumor size (< 5cm vs [5-10] vs > 10cm), site and depth of tumor, locoregional extension (T3), FNCLCC grade, multifocality, histological subcategory, surgical margins, type of healthy surrounding tissue, adjuvant treatments, molecular class, type of tumor invasion, TLS status , semi-quantitative score and preferential location of TLS. Then were reported all the data of global eligible population and declined in the fully mature TLS population and in not fully mature TLS population. Univariate analysis with the overlying criteria for Overall survival (OS), Time to local progression (TTLP), Time to distant progression (TTDP) were performed.
Multivariate analysis including the overlying criteria of the univariate study were performed.

Results

All cases (n= 220) were retrieved from the archives of the Pathology department of Institut Bergonié. Specimens between 1992 and 2008 were fixed in Bouin Hollande's solution (n=77). Samples between 2008 and 2020 (n=143) were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues.One patient with a delay between diagnosis and metastasis at 0 day was excluded. Among these 219 patients, 12.7 % had a local recurrence, 30% had metastases and 32.7 % died at the time of evaluation. Patient's demographics and corresponding clinical data were reported in the Table 1. A total of 44% of this serie was mTLS+ (n=96/219). The median age was 66 years in the mTLS+ and 62 years in the mTLS-. 84% of the dedifferentiated liposarcoma (LPS DD;n=12/19) were mTLS+, as well as 85% of the undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS; n=45/53), 84% of the myxofibrosarcoma (MFS, n=22/26) and lower in the others (leiomyosarcoma=LMS, low grade fibromyxoid sarcoma=LGFS, myxoid liposarcoma = LPS M, synovial sarcoma = SS and other). This repartition was significatively different. We noticed in mTLS+, a higher median size of tumor of 82.5 mm, with more deep-and-superficial disease and more grade 3 and 2. In fact, there were more systemic treatment in this group mTLS+. Metastatic rate was no different while was reported twice of local recurrence in mTLS+. The majority of mTLS+ (n=112/147, 76%) were in complex genomic sarcoma. When we focus on the TLS, 37% of mTLS+ were with the higher semi-quantitative score (3+) with 93% (n=140/150) in the R1 area. 27% (n=41/150) showed up with a germinal center. There were 82 (37.4%) patients in the population that are fully mature and have a TLS density score of 2+ and 3+. In the not fully mature population, the pattern included 54 (43.9%) isolated cells.

We observed a difference of overall survival between the fully mature population mTLS+ and the not fully mature population in the Figure 7.

The factors associated with **OS** in the univariate setting were age, tumour size, locoregional extension, grade of tumour, histotype, R margin, chemotherapy and molecular class. The results of the univariate and multivariate analyses are detailed below in Table 7 and 8. Being a patient over 50 years increase the risk of death by a factor of 4.18 [95%CI 2.16; 8.11] compared to a patient under 50 years.

Patient with a tumor size > 10cm have a risk of death 4.75 [95%CI 2.03 ;11.13] greater than those with a tumor size < 5 cm. The variable tumor size is globally significant with a p-value <.001. The variable age shows some interaction with time. Indeed, the hazard ratio seems to increase with time, which means that average risk between a patient over than 50 years and under than 50 years increase

with longer follow-up. When we considered age with a cutoff at 65 years no interaction with time was found. Results involving the variable histotype (subcategory) must be taken with cautious. We were not able to compute the hazard ratio related to the subgroup 'Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma' due to the low sample size and the absence of deaths.

We studied in the following the factors associated with **OS** in a multivariate setting. We included in the analysis all variables evaluated previously (except age with a cutoff at 65). We selected the factors associated with **OS** using the backward elimination approach. A nominal significance level of 0.05 was chosen. The following factors remained associated with **OS** in the multivariate setting: age, tumour size, histotype, R margin and chemotherapy (Table 8).

Then, it was searched the interaction of parameters with **TTDP.TTDP i**s defined as the time interval between the date of original diagnosis and the date of first metastasis**. TTDP** was censored at the date of death or last information**.**The factors associated with **TTDP** in the univariate setting are age, tumour size, grade of tumour, R margin and molecular class (Table 9). Being a patient over 50 years increase the risk of distant progression by a factor of 2.62 [95%CI 1.38; 4.98] compared to a patient under 50 years. The variable age shows some interaction with time. Indeed, the hazard ratio seems to increase with time, which means that average risk between a patient over than 50 years and under than 50 years increase with longer follow-up. When we considered age with a cutoff at 65 years no interaction with time was found. We studied in the following the factors associated with **TTDP** in a multivariate setting (Table 10). We included in the analysis all variables evaluated previously (except age with a cutoff at 65). We selected the factors associated with **TTDP** using the backward elimination approach. A nominal significance level of 0.05 was chosen. The following factors remained associated with **TTDP** in the multivariate setting: age, tumour size, histotype and, R margin. The following factors remained associated with **TTDP** in the multivariate setting when accounting for age (+/- 65 yo): age (+/- 65yo), tumour size and histotype.

Time-to-locoregional progression **(TTLRP)** was defined as the time interval between the date of original diagnosis and the date of first loco-regional event. **TTLRP** was censored at the date of death or last information.The factors associated with **TTLRP** in the univariate setting are age, grade of tumor, R margin, radiotherapy, molecular class, TLS status, score 2+/3+ and score 3+. Being a patient over 50 years increase the risk of locoregional progression by a factor of 2.89 [95%CI 1.11; 7.55] compared to a patient under 50 years. We studied in the following the factors associated with TTLRP in a multivariate setting (Table 11). We included in the analysis all variables evaluated previously (except age with a cutoff at 65). We selected the factors associated with **TTLRP** using the backward elimination approach. A nominal significance level of 0.05 was chosen. The following factors remained associated with **TTLRP** in the multivariate setting: score 2+/3+. Being 2+/3+ and fully mature increase the risk of locoregional progression by a factor of 3.01 (95% CI 1.45;6.24) compared to not.

Discussion

Particularly, due to the heterogeneity and high metastatic rate of soft-tissue sarcoma, treatment methods were very limited apart from surgery at the initial stage and the outcome was often unfavorable. The optimal chance for curing localized STS is based on wide resection surgery. Given that most STS patients succumb to this disease within 5 years, there is an apparent need for better systemic therapy including novel molecularly targeted therapies (19).

Over the past 20 years, research have shown that the immune system plays a double role by controlling the emergence of cancers but also by promoting their development and be an active part of

progression. The crucial role of the immune system in the fight against cancer is now widely demonstrated, thanks to the identification of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) having both an effector function and helper to memory in primary tumors (18). The introduction and development of immunotherapies have revolutionized the therapeutic approach to advanced stage cancer such as melanoma (17). Treatments blocking immune checkpoints mainly target the CD8+ cytotoxic T cell pathway (20). However, a minority of them receive benefit from immune checkpoint inhibitors (ICI). Many immune parameters have been studied. Recently, B cells localized in so-called tertiary lymphoid structures (TLS) may also play a crucial role in tumor immune microenvironment . They showed that the presence of mature TLS was associated with higher rates of objective response, progression-free survival, and overall survival regardless of PD-L1 and CD8+ T cell density (12). Moreover, it has been shown that the presence of TLS was associated with a better prognosis, especially an improvement in overall survival in several solid tumors (21) as well as types of sarcomas such as liposarcomas, leiomyosarcomas, synovialosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas (22,23). However, in the study by Petitprez et al (22) the presence of TLS was assessed in only 93 cases of sarcomas whose clinical and therapeutic status is otherwise unknown and not on the entire tumor. Two concepts could be mentioned. Firstly, a single mature TLS in the entire piece could be sufficient to provide the innate immune reaction. It demonstrates or show that the host manages can react against its tumor. In this case, a biopsy can very often be missed and therefore not be the reflect of the immune stage. It wouldn't be effective as the adaptive antitumor response if only one is mature.

it seems fundamental to propose a detailed analysis of the "entire" tumor in order not to misunderstand the status of the immune response. We also think that if only one is mature and isolated then it probably does not have the same meaning as if the TLS were present in a very significant way.

First , we are surprised to note that 44 % of our population was mature TLS. We expected lower rate because sarcomas are generally considered immune "cold" tumors, with a low level of immune infiltration (24). Currently, only a small fraction of sarcoma patients benefit from immunotherapy, supposedly due to a general lack of somatically mutated antigens (neoantigens) and spontaneous T cell immunity in most cancers (25). Then, we found in a more expected way a majority of TLS in LPSDD, UPS and MFS. This distribution was significatively different (p= 0.0558) and lower in LPSM, LMS, SS and other. Our population was little different with older patients in mTLS+ group, higher size of tumor (82.5 mm vs 75 mm) and more agressive disease with a higher level of grade FNCLCC 3 and 2. We found a majority of genomic complex sarcoma which is in agreement of other studies as Oost in 2021. Genomic complex sarcoma (SGC) are highly heterogeneous and imbalanced entities. They are characterized by a significant genetic acceleration. This process is defined by the accumulation of new genetic alterations over time (26). These various genetic alterations could be perceived by the immune system via various mechanisms. Mutations in the coding genome could trigger T cell immunity when neoepitopes undergo antigen presentation in the context of the Human Leukocyte Antigen (HLA) system (27). In response to these neo tumor antigens, signaling cascades will take place. Mature dendritic cells will be able to capture these neoantigens and bring them to secondary lymphoid organs and trigger a cytotoxic reaction. This reaction will itself lead to the synthesis of pro-inflammatory cytokines and apopotosis will again allow the release of neo tumor antigens.The link between antigen presentation and response to T cell checkpoint blockade immunotherapies is well-established, as demonstrated by the exceptional responses to this type of immunotherapy in cancers with high mutation burden, such as non-small cell lung cancer and melanoma (28). Although intra-tumoral T cells are clearly associated with superior oncologic outcomes, it is also established that tumor-infiltrating T cells are characterized by a spectrum of dysfunction which frequently permits immune escape and tumor progression (29–31).

Then, we have demonstrated that this immune reaction takes place at the periphery of the tumor and we find a preferential localization in 93% in the R1. This notion is fundamental and may be unvisible in a core needle standard biopsy. The tumor microenvironment plays a key role in sarcoma progression and therapeutic response (32–34). One third of mTLS+ was is directly positive with the presence of a mature germinal center on the HES slide. And one third was fully mature and 2+/3+ in our semi-quantitative analysis.

Secondly, we will focus on the different endpoints as OS, TTDP and TTLR. For instance, Petitprez et al found that the presence of TLS in soft tissue sarcoma was associated with improved overall survival and progression-free survival, as well as increased levels of infiltrating CD8+ T cells and activated dendritic cells. In our study, we found a difference of overall survival in the five first years (which disappears afterwards?). There was no difference in mTLS+ vs mTLS- in terms of TTDP.
High density of CD20+ lymphocytes in STS with wide resection margins is an independent positive prognostic indicator for these patients. Further research is needed to define if CD20+ cells can modify tumors in a way that reduces disease progression and metastatic potential (19). Increasing numbers of CD4+ ($P = 0.008$) and CD20+ lymphocytes in tumor ($P = 0.006$) correlated significantly with an improved disease-free survival in patients with wide resection margins.

A difference was found in the TTLR between mTLS+ and mTLS-. Being 2+/3+ and fully mature increase the risk of locoregional progression by a factor of 3.01 (95% CI 1.45;6.24) compared to not. In the study of Smolle, higher levels of PD-L1, PD-1, and any TIL phenotype were found in myxofibrosarcoma as compared to leiomyosarcoma (all $p < 0.05$). The presence of regulatory T cells (Tregs) was associated with increased LR risk ($p = 0.006$), irrespective of margins (35). These observations could coexist. The study suggests that the presence of TLS in the peritumoral region may reflect a systemic anti-tumor immune response, rather than just a local immune response within the tumor itself. It could mean that when the tumor presents a specific antitumor reaction with the presence of TLS, then the patient requires in addition to quality surgery, an adjuvant immunotherapy to reduce the risk of local relapse. However, further research is needed to confirm these findings and understand the mechanisms underlying the association between peritumoral TLS and improved outcomes in soft tissue sarcoma.

Conclusion

It is crucial to determine new prognostic factors to personnalize and adapt the patient treatment. Being 2+/3+ and fully mature increase the risk of locoregional progression by a factor of 3.01 (95% CI 1.45;6.24) compared to not.

In case of independent prognostic value of TLS, it should be consider assessing TLS routinely to help us with the adjuvant therapy decision.

We can also associate this criterion with the standard histological FNLCC grade to give an immunohistological grade.

Figures et Legends

Figure 1 : Flow-chart of the distribution of the study populations ; Fully mature population : eligible patients with a mature TLS status (germinal center or mesh cell) ; Not fully mature population : eligible patients without a mature TLS status (immature TLS or No TLS or isolated cell)

Figure 2: Overall survival for fully and not full mature populations

Figure 3: Cause-specific survival for fully and not full mature populations

Figure 4: Time to metastasis for fully and not full mature populations

Figure 5: Time to metastasis for fully and not full mature populations

Table 1 : Demographic situation – qualitative variables. *Test whether there is a significant relationship between a categorical variable and membership in the fully mature population or fully mature population.[±]Interpretation: a p-value of 0.7278> 0.05 means that the distribution of the sex is independent of the population (Sex is not associated with TLS status).Description of primary tumour characteristics – qualitative variables; tumour management with surgery;Systemic treatment, Radiotherapy; Description of metastases and local relapses; Description of the anatomopathology results. Age (<50 vs >=50 and < 65 vs >=65), Sex (Female vs Male), Site of tumour (lower limb vs trunk wall vs upper limb), Depth (deep vs superficial vs Superficial and deep), Size (< 5cm vs [5-10] vs > 10cm), Locoregional extension (T3 vs No T3), Grade (1 vs 2 vs 3), Multifocality (Yes vs No), Histotype subcategory (Dedifferentiated liposarcoma vs Leiomyosarcoma vs Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma vs Myxofibrosarcoma vs Myxoid/round cell liposarcoma vs Other vs Synovial sarcoma vs Undifferentiated sarcoma), Margins (R0 vs R1), Type R1 TS (Adipose vs Muscle), Radiotherapy (second vs Third vs No), Chemotherapy (Adjuvant vs No), Molecular class (simple vs complex), Type of invasion (well defined vs infiltrative 1 vs infiltrative 2), TLS (germinal center + mesh, vs immature + no TLS + isolated cell), Semi quantitative score (3+ vs 1+, 2+ and no).

Table 2: Description of the TLS status.

Table 3: Semi-quantitative TLS density score per population.

Table 4: Categorization of semi-quantitative TLS density score per population

Table 5: Description of the inherent variable of the fully mature population

Table 6: Description of the vital status and follow-up; Description of the first event to occur

Table 7: Prognostic factors associated with OS in univariate analysis

Table 8: Prognostic factors associated with OS in multivariate analysis

Table 9: Prognostic factors associated with TTDP in univariate analysis

Table 10: Prognostic factors associated with TTDP in multivariate analysis

Table 11: Prognostic factors associated with TTLRP in univariate analysis

Table 12: Prognostic factors associated with TTLRP in multivariate analysis

References

1. Penel N, Coindre JM, Giraud A, Terrier P, Ranchere-Vince D, Collin F, et al. Presentation and outcome of frequent and rare sarcoma histologic subtypes: A study of 10,262 patients with localized visceral/soft tissue sarcoma managed in reference centers. Cancer. 15 mars 2018;124(6):1179-87.

2. 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 1 oct 2018;29(Suppl 4):iv51-67.

3. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. Int J Cancer. 15 janv 1984;33(1):37-42.

4. Callegaro D, Miceli R, Bonvalot S, Ferguson P, Strauss DC, Levy A, et al. Development and external validation of two nomograms to predict overall survival and occurrence of distant metastases in adults after surgical resection of localised soft-tissue sarcomas of the extremities: a retrospective analysis. Lancet Oncol. mai 2016;17(5):671-80.

5. Coindre JM, Terrier P, Guillou L, Le Doussal V, Collin F, Ranchère D, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. Cancer. 15 mai 2001;91(10):1914-26.

6. Gronchi A, Miah AB, Dei Tos AP, Abecassis N, Bajpai J, Bauer S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up☆. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. nov 2021;32(11):1348-65.

7. Weitz J, Antonescu CR, Brennan MF. Localized extremity soft tissue sarcoma: improved knowledge with unchanged survival over time. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 15 juill 2003;21(14):2719-25.

8. Zagars GK, Ballo MT, Pisters PWT, Pollock RE, Patel SR, Benjamin RS, et al. Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy: an analysis of 1225 patients. Cancer. 15 mai 2003;97(10):2530-43.

9. Gronchi A, De Paoli A, Dani C, Merlo DF, Quagliuolo V, Grignani G, et al. Preoperative chemo-radiation therapy for localised retroperitoneal sarcoma: a phase I-II study from the Italian Sarcoma Group. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. mars 2014;50(4):784-92.

10. Crombé A, Marcellin PJ, Buy X, Stoeckle E, Brouste V, Italiano A, et al. Soft-Tissue Sarcomas: Assessment of MRI Features Correlating with Histologic Grade and Patient Outcome. Radiology. juin 2019;291(3):710-21.

11. Squires MH, Ethun CG, Donahue EE, Benbow JH, Anderson CJ, Jagosky MH, et al. Extremity Soft Tissue Sarcoma: A Multi-Institutional Validation of Prognostic Nomograms. Ann Surg Oncol. mai 2022;29(5):3291-301.

12. Vanhersecke L, Brunet M, Guégan JP, Rey C, Bougouin A, Cousin S, et al. Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression. Nat Cancer. août 2021;2(8):794-802.

13. Sautès-Fridman C, Verneau J, Sun CM, Moreira M, Chen TWW, Meylan M, et al. Tertiary Lymphoid Structures and B cells: Clinical impact and therapeutic modulation in cancer. Semin Immunol. avr 2020;48:101406.

14. Ladányi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liszkay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. Cancer Immunol Immunother CII. déc 2011;60(12):1729-38.

15. Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, et al. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 avr 2014;20(8):2147-58.

16. Messina JL, Fenstermacher DA, Eschrich S, Qu X, Berglund AE, Lloyd MC, et al. 12-Chemokine gene signature identifies lymph node-like structures in melanoma: potential for patient selection for immunotherapy? Sci Rep. 2012;2:765.

17. Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma. Lancet Lond Engl. 11 sept 2021;398(10304):1002-14.

18. Galon J, Bruni D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. Immunity. 14 janv 2020;52(1):55-81.

19. Sorbye SW, Kilvaer T, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, et al. Prognostic impact of lymphocytes in soft tissue sarcomas. PloS One. 27 janv 2011;6(1):e14611.

20. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. Nat Rev Immunol. nov 2020;20(11):651-68.

21. N J, J T, Sl N, Gt B. Tertiary lymphoid structures and B lymphocytes in cancer prognosis and response to immunotherapies. Oncoimmunology. 29 mars 2021;10(1):1900508.

22. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TWW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. Nature. janv 2020;577(7791):556-60.

23. Roulleaux Dugage M, Nassif EF, Italiano A, Bahleda R. Improving Immunotherapy Efficacy in Soft-Tissue Sarcomas: A Biomarker Driven and Histotype Tailored Review. Front Immunol. 2021;12:775761.

24. Weng W, Yu L, Li Z, Tan C, Lv J, Lao IW, et al. The immune subtypes and landscape of sarcomas. BMC Immunol. 24 sept 2022;23(1):46.

25. van Oost S, Meijer DM, Kuijjer ML, Bovée JVMG, de Miranda NFCC. Linking Immunity with Genomics in Sarcomas: Is Genomic Complexity an Immunogenic Trigger? Biomedicines. 19 août 2021;9(8):1048.

26. Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome. Nat Rev Genet. nov 2012;13(11):795-806.

27. Jhunjhunwala S, Hammer C, Delamarre L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. Nat Rev Cancer. mai 2021;21(5):298-312.

28. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. Nat Genet. févr 2019;51(2):202-6.

29. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med. 16 janv 2003;348(3):203-13.

30. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. Nat Rev Cancer. nov 2020;20(11):662-80.

31. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. Cancer Cell. 9 avr 2018;33(4):547-62.

32. D'Angelo SP, Tap WD, Schwartz GK, Carvajal RD. Sarcoma immunotherapy: past approaches and future directions. Sarcoma. 2014;2014:391967.

33. Wilky BA, Goldberg JM. Immunotherapy in sarcoma: a new frontier. Discov Med. avr 2014;17(94):201-6.

34. Wustrack RL, Shao E, Sheridan J, Zimel M, Cho SJ, Horvai AE, et al. Tumor morphology and location associate with immune cell composition in pleomorphic sarcoma. Cancer Immunol Immunother CII. oct 2021;70(10):3031-40.

35. Smolle MA, Herbsthofer L, Granegger B, Goda M, Brcic I, Bergovec M, et al. T-regulatory cells predict clinical outcome in soft tissue sarcoma patients: a clinico-pathological study. Br J Cancer. août 2021;125(5):717-24.

Supplementary data

The following variables have been investigated as prognostic factors for OS on the eligible population (n=219):

- Age (<50 vs >=50 and < 65 vs >=65)
- Sex (Female vs Male)
- Site of tumour (lower limb vs trunk wall vs upper limb),
- Depth (deep vs superficial vs Superficial and deep),
- Size (< 5cm vs [5-10] vs > 10cm)
- Locoregional extension (T3 vs No T3)
- Grade (1 vs 2 vs 3),
- Multifocality (Yes vs No),
- Histotype subcategory (Dedifferentiated liposarcoma vs Leiomyosarcoma vs Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma vs Myxofibrosarcoma vs Myxoid/round cell liposarcoma vs Other vs Synovial sarcoma vs Undifferentiated sarcoma)
- Margins (R0 vs R1)
- Type R1 TS (Adipose vs Muscle)
- Radiotherapy (second vs Third vs No)
- Chemotherapy (Adjuvant vs No)
- Molecular class (simple vs complex)
- Type of invasion (well defined vs infiltrative 1 vs infiltrative 2)
- TLS (germinal center + mesh, vs immature + no TLS + isolated cell)
- Semi quantitative score (3+ vs 1+, 2+ and no)

Figure 1

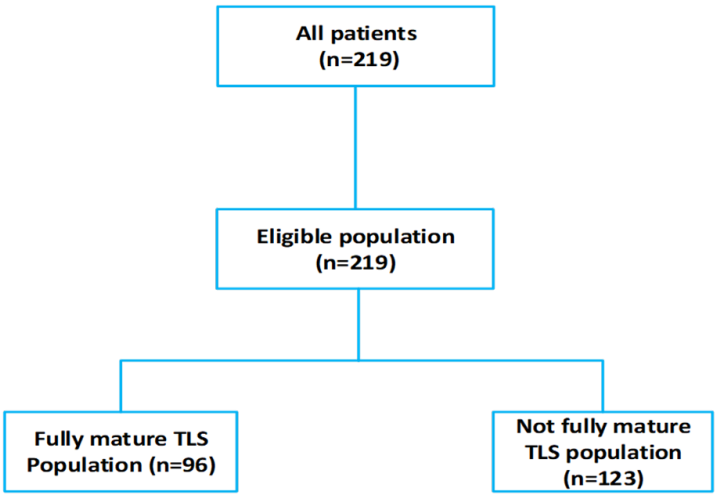

All patients
(n=219)
Eligible population
(n=219)
Fully mature TLS
Population (n=96)
Not fully mature
TLS population
(n=123)

Figure 2

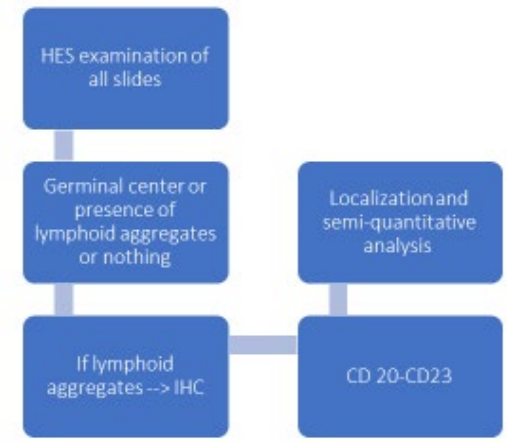


Figure 7

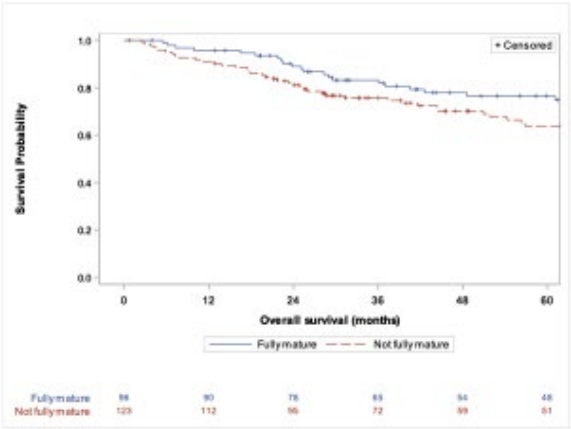


Figure 8

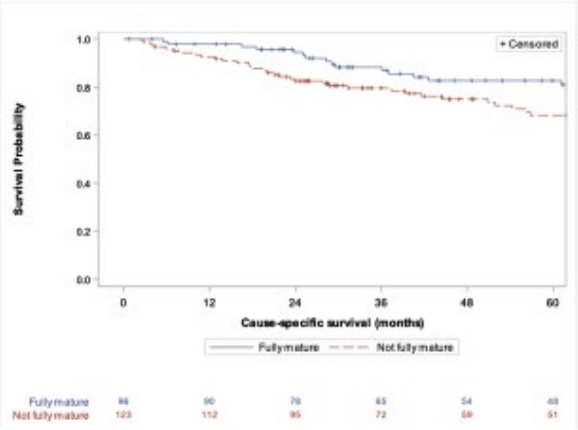


Figure 9

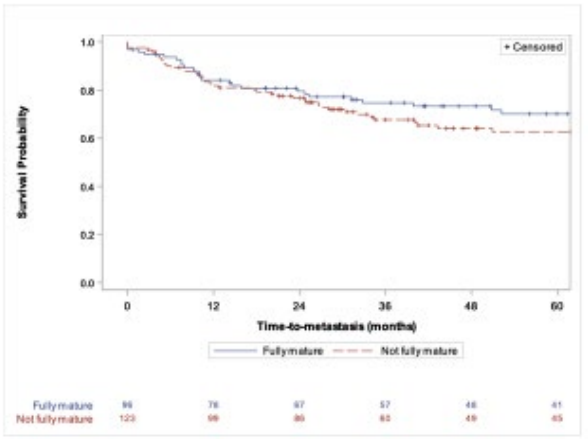
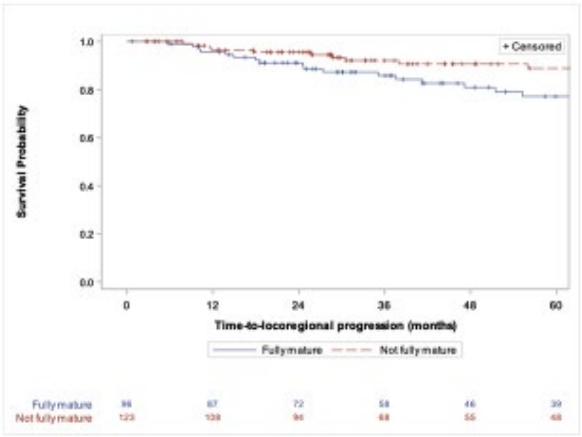


Figure 10



	Eligible population (N=219)		Fully mature TLS (N=96)		Not fully mature TLS (N=123)		P-value (Chi-square test)*
	N	%	N	%	N	%	
Sex							0.7278±
Female	101	46.1	43	44.8	58	47.2	
Male	118	53.9	53	55.2	65	52.8	
Age at diagnosis (category)							0.2066
>= 50 yo at diagnosis	157	71.7	73	76.0	84	68.3	
< 50 yo at diagnosis	62	28.3	23	24.0	39	31.7	
Age at diagnosis (2nd category)							0.2788
>= 65 yo at diagnosis	105	47.9	50	52.1	55	44.7	
< 65 yo at diagnosis	114	52.1	46	47.9	68	55.3	
Histotype (sub-category)							0.0558
Dedifferentiated liposarcoma	19	8.7	12	12.5	7	5.7	
Leiomyosarcoma	29	13.2	9	9.4	20	16.3	
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma	14	6.4	4	4.2	10	8.1	
Myxofibrosarcoma	26	11.9	12	12.5	14	11.4	
Myxoid/round cell liposarcoma	28	12.8	7	7.3	21	17.1	
Other	39	17.8	17	17.7	22	17.9	
Synovial sarcoma	11	5.0	5	5.2	6	4.9	
Undifferentiated sarcoma	53	24.2	30	31.3	23	18.7	
Site of tumour (category)							0.2388
Distal	129	58.9	51	53.1	78	63.4	
Proximal	25	11.4	11	11.5	14	11.4	
Paroi du tronc	65	29.7	34	35.4	31	25.2	
Site of tumour (sub-category)							**0.0351**
Lower limb	137	62.6	52	54.2	85	69.1	
Trunk wall	57	26.0	28	29.2	29	23.6	
Upper limb	25	11.4	16	16.7	9	7.3	
Depth of tumour							**0.0144**
Deep	144	65.8	53	55.2	91	74.0	
Superficial	22	10.0	13	13.5	9	7.3	
Superficial and deep	53	24.2	30	31.3	23	18.7	
Loco-regional extension							0.9243
T3	21	9.6	9	9.4	12	9.8	
No T3	198	90.4	87	90.6	111	90.2	
Multifocal tumour							0.6307

No		196	89.5	87	90.6	109	88.6	
Yes		23	10.5	9	9.4	14	11.4	
Grade of tumour								0.1295
	1	43	19.6	13	13.5	30	24.4	
	2	76	34.7	35	36.5	41	33.3	
	3	100	45.7	48	50.0	52	42.3	
Margin R								0.4564
R0		118	53.9	49	51.0	69	56.1	
R1		101	46.1	47	49.0	54	43.9	
Complete remission after treatment								0.8736
No		19	8.7	8	8.3	11	8.9	
Yes		200	91.3	88	91.7	112	91.1	
Systemic treatment								0.1646
No		180	82.2	75	78.1	105	85.4	
Yes		39	17.8	21	21.9	18	14.6	
If systemic treatment ='Yes'								
Chemotherapy of tumour								
Adjuvant		39	100.0	21	100.0	18	100.0	
Radiotherapy of tumour								**0.0371**
No		49	22.4	29	30.2	20	16.3	
Second		151	68.9	58	60.4	93	75.6	
Third		19	8.7	9	9.4	10	8.1	
Has metastasis								0.8707
false		147	67.1	65	67.7	82	66.7	
true		72	32.9	31	32.3	41	33.3	
Number of local recurrence								**0.0021**
0		187	85.4	74	77.1	113	91.9	
>0		32	14.6	22	22.9	10	8.1	
Molecular class								**0.0131**
Simple		72	32.9	23	24.0	49	39.8	
Complex		147	67.1	73	76.0	74	60.2	
Type R1/TS								0.2313
Adipose		95	43.4	46	47.9	49	39.8	
Muscle		124	56.6	50	52.1	74	60.2	
Type Invasion								0.1020
bien limité		104	47.5	41	42.7	63	51.2	
infiltrant1		78	35.6	33	34.4	45	36.6	
infiltrant2		37	16.9	22	22.9	15	12.2	

Table 1

	Eligible population (N=219)		Fully mature TLS (N=96)		Not fully mature TLS (N=123)	
	N	%	N	%	N	%
TLS presence in HES						
No	35	16.0	0	0.0	35	28.5
Yes	184	84.0	96	100.0	88	71.5
If TLS presence in HES='Yes' then Semi-quantitative TLS density score (1+;2+;3+)						
1	65	35.3	14	14.6	51	58.0
2	62	33.7	35	36.5	27	30.7
3	57	31.0	47	49.0	10	11.4
If TLS presence in HES='Yes' then TLS preferential area in HES						
R1	103	56.0	50	52.1	53	60.2
TC	51	27.7	34	35.4	17	19.3
TP	26	14.1	10	10.4	16	18.2
TS	3	1.6	1	1.0	2	2.3
Missing	1	0.5	1	1.0	0	0.0
Topography TC						
No	108	49.3	29	30.2	79	64.2
Yes	111	50.7	67	69.8	44	35.8
Topography TP						
No	100	45.7	21	21.9	79	64.2
Yes	119	54.3	75	78.1	44	35.8
Topography R1						
No	54	24.7	4	4.2	50	40.7
Yes	165	75.3	92	95.8	73	59.3
Topography TS (1cm)						
No	184	84.0	79	82.3	105	85.4
Yes	35	16.0	17	17.7	18	14.6
TLS presence in IHC						
No	88	40.2	36	37.5	52	42.3
Yes	131	59.8	60	62.5	71	57.7
IHC maturity						
No	17	13.0	0	0.0	17	100.0
Yes	114	87.0	114	100.0	0	0.0
(mTLS) localisation						
R1	41	18.7	16	16.7	25	20.3
R1 TP TS	2	0.9	0	0.0	2	1.6
R1 TS	2	0.9	1	1.0	1	0.8
TC TP	8	3.7	3	3.1	5	4.1
TC	15	6.8	3	3.1	12	9.8
TC R1	4	1.8	2	2.1	2	1.6

TC TP R1	30	13.7	23	24.0	7	5.7
TP	2	0.9	0	0.0	2	1.6
TP R1	18	8.2	11	11.5	7	5.7
TS	3	1.4	1	1.0	2	1.6
No	94	42.9	36	37.5	58	47.2
No TLS						
No	165	75.3	96	100.0	69	56.1
Yes	54	24.7	0	0.0	54	43.9
Mature TLS						
No	118	53.9	0	0.0	118	95.9
Yes	101	46.1	96	100.0	5	4.1
Immature TLS						
No	155	70.8	96	100.0	59	48.0
Yes	64	29.2	0	0.0	64	52.0
Total	219	100.0	96	100.0	123	100.0

Table 2

	i TLS		**Isolated cell**		**Mesh cell**		**Germinal center**	
Semi-quantitative TLS density score (1+;2+;3+)	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
1	37	57.8	27	50.0	13	21.7	2	5.0
2	20	31.3	19	35.2	24	40.0	12	30.0
3	7	10.9	8	14.8	23	38.3	26	65.0
Total	64	100.0	54	100.0	60	100.0	40	100.0

Table 3

	Eligible population (N=219)		**Fully mature TLS (N=96)**	
	N	**%**	**N**	**%**
Fully mature with score 2+/3+				
No	137	62.6	14	14.6
Yes	82	37.4	82	85.4
Fully mature with score 3+				
No	172	78.5	49	51.0
Yes	47	21.5	47	49.0
Total	219	100.0	96	100.0

Table 4

	Fully mature TLS (N=96)	
	N	**%**
Germinal center		
No	56	58.3
Yes	40	41.7
If germinal center='Yes' then Location CG		
R1	18	45.0
TC	8	20.0
TC R1	1	2.5
TC TP	2	5.0
TC TP R1	1	2.5
TP	9	22.5
TP R1	1	2.5
Pattern*		
isolée	0	0.0
maille	60	62.5
NA	36	37.5
Total	96	100.0

Table 5

	Eligible population (N=219)		Fully mature TLS (N=96)		Not fully mature TLS (N=123)	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Lost of follow-up						
No	217	99.1	96	100.0	121	98.4
Yes	2	0.9	0	0.0	2	1.6
Vital status						
Alive	133	60.7	60	62.5	73	59.3
Dead	86	39.3	36	37.5	50	40.7
Cause of death						
Dead of other cause	19	22.1	9	25.0	10	20.0
Dead of this cancer	60	69.8	22	61.1	38	76.0
Unknown	7	8.1	5	13.9	2	4.0
First event to occur						
Local relapse	24	11.0	16	16.7	8	6.5
Metastasis	63	28.8	27	28.1	36	29.3
Death	18	8.2	6	6.3	12	9.8
No event	114	52.1	47	49.0	67	54.5
Total	219	100.0	96	100.0	123	100.0

Table 6

Baseline factors		Hazard Ratio (HR)	HR Lower Conf. Limit	HR Upper Conf. Limit	Pvalue (chi-2)
Age (First category)					
< 50 yo at diagnosis			1		
>= 50 yo at diagnosis		4.18	2.16	8.11	**<.001**
Age (Second category)					
< 65 yo at diagnosis			1		
>= 65 yo at diagnosis		4.54	2.82	7.31	**<.001**
Sex					
Female			1		
Male		0.95	0.62	1.45	0.811
Tumour site					0.802
Lower limb			1		
Trunk wall		1.16	0.71	1.91	0.555
Upper limb		0.94	0.46	1.90	0.860
Depth of tumour					0.423
Deep			1		
Superficial		0.67	0.27	1.66	0.384
Superficial and deep		1.25	0.75	2.08	0.396
Tumour size					**<.001**
< 5 cm			1		
5 to 10 cm		1.84	0.77	4.40	0.168
>10 cm		4.75	2.03	11.13	<.001
Locoregional extension					
No T3			1		
T3		2.03	1.14	3.60	**0.016**
Grade of tumour					**0.001**
	1		1		
	2	2.23	0.97	5.15	0.059
	3	3.83	1.74	8.43	<.001
Multifocality					
No			1		
Yes		1.06	0.58	1.96	0.846
Histotype					**0.042**
Undifferentiated sarcoma			1		
Dedifferentiated liposarcoma		1.02	0.46	2.27	0.957
Leiomyosarcoma		1.70	0.93	3.09	0.084
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma		.	.	.	.
Myxofibrosarcoma		0.80	0.39	1.68	0.561

Myxoid/round cell liposarcoma		0.18	0.05	0.59	0.005
Other		1.04	0.55	1.94	0.911
Synovial sarcoma		0.98	0.38	2.57	0.969
Margin					
R0			1		
R1		2.70	1.73	4.24	**<.001**
Type R1/TS					
Adipose			1		
Muscle		1.15	0.74	1.78	0.548
Radiotherapy					0.068
No			1		
Second		1.06	0.61	1.84	0.826
Third		0.32	0.11	0.97	0.043
Chemotherapy					
No			1		
Adjuvant		0.55	0.31	0.98	**0.041**
Molecular class					
Simple			1		
Complex		3.21	1.78	5.79	**<.001**
Type d'invasion					0.302
Bien limité			1		
Infiltrant 1		1.40	0.88	2.22	0.155
Infiltrant 2		0.97	0.52	1.83	0.933
TLS status					
Immature/No/Isolée			1		
Mature (maille/Centre germinatif)		0.85	0.55	1.31	0.466
Semi quantitative TLS density score					0.215
	3		1		
	1	1.40	0.80	2.47	0.242
	2	1.39	0.79	2.45	0.247
NA		0.69	0.31	1.56	0.373
Semi density score 2+/3+ and Fully mature					
No			1		
Yes		0.84	0.54	1.30	0.426
Semi density score 3+ and Fully mature					
No			1		
Yes		0.80	0.47	1.37	0.423

Table 7

Baseline factors	**Hazard Ratio (HR)**	**HR Lower Conf. Limit**	**HR Upper Conf. Limit**	**Pvalue**

				(chi-2)
Age (First category)				
< 50 yo at diagnosis	1			
>= 50 yo at diagnosis	3.38	1.59	7.20	**0.002**
Tumour size				**<.001**
< 5 cm	1			
5 to 10 cm	2.28	0.94	5.53	0.068
>10 cm	6.13	2.53	14.85	<.001
Histotype				**<.001**
Undifferentiated sarcoma	1			
Dedifferentiated liposarcoma	0.57	0.25	1.30	0.183
Leiomyosarcoma	2.36	1.27	4.39	0.006
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma	.	.	.	.
Myxofibrosarcoma	0.57	0.27	1.20	0.140
Myxoid/round cell liposarcoma	0.20	0.06	0.68	0.010
Other	1.49	0.77	2.87	0.231
Synovial sarcoma	3.29	1.09	9.88	0.034
Margin				
R0	1			
R1	2.10	1.32	3.35	**0.002**
Chemotherapy				
No	1			
Adjuvant	0.46	0.26	0.83	**0.011**

Table 8

Baseline factors	**Hazard Ratio (HR)**	**HR Lower Conf. Limit**	**HR Upper Conf. Limit**	**Pvalue (chi-2)**
Age (First category)				
< 50 yo at diagnosis	1			
>= 50 yo at diagnosis	2.62	1.38	4.98	**0.003**
Age (Second category)				
< 65 yo at diagnosis	1			
>= 65 yo at diagnosis	2.35	1.45	3.80	**<.001**
Sex				
Female	1			
Male	1.10	0.69	1.75	0.687
Tumour site				0.864
Lower limb	1			
Trunk wall	0.93	0.54	1.62	0.800
Upper limb	0.81	0.37	1.79	0.605

Depth of tumour					0.325
Deep		1			
Superficial		0.55		0.20	1.52	0.247
Superficial and deep		1.23		0.72	2.10	0.439
Tumour size					**<.001**
< 5 cm		1			
5 to 10 cm		2.18		0.84	5.61	0.108
>10 cm		4.43		1.74	11.28	0.002
Locoregional extension					
No T3		1			
T3		1.71		0.87	3.33	0.117
Grade of tumour					**0.002**
	1		1		
	2	1.34		0.59	3.06	0.488
	3	2.86		1.35	6.07	0.006
Multifocality					
No		1			
Yes		0.80		0.37	1.74	0.570
Histotype					0.062
Undifferentiated sarcoma		1			
Dedifferentiated liposarcoma		0.96		0.38	2.44	0.935
Leiomyosarcoma		2.08		1.05	4.12	0.036
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma		.		.	.	.
Myxofibrosarcoma		0.71		0.28	1.80	0.470
Myxoid/round cell liposarcoma		0.48		0.18	1.30	0.148
Other		1.65		0.84	3.23	0.145
Synovial sarcoma		1.56		0.57	4.22	0.386
Margin					
R0		1			
R1		2.13		1.33	3.43	**0.002**
Type R1/TS					
Adipose		1			
Muscle		0.99		0.62	1.58	0.951
Radiotherapy					0.280
No		1			
Second		1.17		0.64	2.13	0.621
Third		0.52		0.17	1.59	0.251
Chemotherapy					
No		1			
Adjuvant		0.69		0.37	1.29	0.248
Molecular class					

Simple		1			
Complex	1.87		1.07	3.26	**0.027**
Type d'invasion					0.432
Bien limité		1			
Infiltrant 1	1.11		0.67	1.82	0.695
Infiltrant 2	0.67		0.32	1.40	0.286
TLS status					
Immature/No/Isolée		1			
Mature (maille/Centre germinatif)	0.92		0.58	1.47	0.736
Semi quantitative TLS density score					0.389
3		1			
1	1.38		0.74	2.58	0.318
2	1.37		0.74	2.56	0.318
NA	0.77		0.33	1.78	0.541
Semi density score 2+/3+ and Fully mature					
No		1			
Yes	0.95		0.59	1.53	0.822
Semi density score 3+ and Fully mature					
No		1			
Yes	0.82		0.46	1.47	0.509

Table 9

Baseline factors	**Hazard Ratio (HR)**	**HR Lower Conf. Limit**	**HR Upper Conf. Limit**	**Pvalue (chi-2)**
Age (First category)				
< 50 yo at diagnosis		1		
>= 50 yo at diagnosis	2.27	1.08	4.77	**0.030**
Tumour size				**<.001**
< 5 cm		1		
5 to 10 cm	2.46	0.91	6.67	0.077
>10 cm	5.71	2.09	15.56	<.001
Histotype				**0.002**
Undifferentiated sarcoma		1		
Dedifferentiated liposarcoma	0.65	0.25	1.68	0.375
Leiomyosarcoma	2.11	1.06	4.22	0.034
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma	.	.	.	.
Myxofibrosarcoma	0.61	0.24	1.56	0.303
Myxoid/round cell liposarcoma	0.52	0.19	1.46	0.218
Other	2.10	1.05	4.20	0.036
Synovial sarcoma	4.48	1.41	14.23	0.011

Margin				
R0	1			
R1	1.70	1.04	2.77	**0.034**

Table 10

Baseline factors	**Hazard Ratio (HR)**	**HR Lower Conf. Limit**	**HR Upper Conf. Limit**	**Pvalue (chi-2)**
Age (First category)				
< 50 yo at diagnosis	1			
>= 50 yo at diagnosis	2.89	1.11	7.55	**0.030**
Age (Second category)				
< 65 yo at diagnosis	1			
>= 65 yo at diagnosis	2.88	1.39	5.95	**0.004**
Sex				
Female	1			
Male	1.71	0.82	3.54	0.152
Tumour site				0.257
Lower limb	1			
Trunk wall	1.51	0.67	3.40	0.316
Upper limb	2.09	0.82	5.30	0.122
Depth of tumour				0.326
Deep	1			
Superficial	2.10	0.78	5.64	0.141
Superficial and deep	1.31	0.55	3.12	0.542
Tumour size				0.257
< 5 cm	1			
5 to 10 cm	0.77	0.31	1.87	0.557
>10 cm	0.76	0.28	2.04	0.582
Locoregional extension				
No T3	1			
T3	1.88	0.73	4.89	0.194
Grade of tumour				**0.045**
1	1			
2	3.21	0.70	14.67	0.132
3	5.47	1.28	23.41	0.022
Multifocality				
No	1			
Yes	1.71	0.70	4.15	0.240
Histotype				0.211
Undifferentiated sarcoma	1			

Dedifferentiated liposarcoma	0.80	0.26	2.42	0.692
Leiomyosarcoma	0.14	0.02	1.06	0.057
Low grade fibromyxoid sarcoma/Sclerosing epithelioid fibrosarcoma	.	.	.	.
Myxofibrosarcoma	0.70	0.25	1.93	0.494
Myxoid/round cell liposarcoma	0.10	0.01	0.73	0.024
Other	0.52	0.19	1.44	0.210
Synovial sarcoma	0.30	0.04	2.29	0.246
Margin				
R0	1			
R1	2.06	1.01	4.17	**0.046**
Type R1/TS				
Adipose	1			
Muscle	0.87	0.43	1.75	0.688
Radiotherapy				**0.027**
No	1			
Second	0.40	0.19	0.85	0.017
Third	0.23	0.05	1.03	0.055
Chemotherapy				
No	1			
Adjuvant	0.84	0.36	1.96	0.680
Molecular class				
Simple	1			
Complex	4.24	1.48	12.10	**0.007**
Type d'invasion				0.078
Bien limité	1			
Infiltrant 1	2.33	1.03	5.26	0.042
Infiltrant 2	2.45	0.96	6.22	0.060
TLS status				
Immature/No/Isolée	1			
Mature (maille/Centre germinatif)	2.69	1.27	5.68	**0.009**
				0.215
Semi quantitative TLS density score				0.132
3	1			
1	0.35	0.12	0.96	0.042
2	0.68	0.30	1.53	0.349
NA	0.36	0.10	1.24	0.104
Semi density score 2+/3+ and Fully mature				
No	1			
Yes	3.01	1.45	6.24	**0.003**
Semi density score 3+ and Fully mature				
No	1			
Yes	2.78	1.38	5.59	**0.004**

Table 11

Baseline factors	Hazard Ratio (HR)	HR Lower Conf. Limit	HR Upper Conf. Limit	Pvalue (chi-2)
Semi density score 2+/3+ and Fully mature				
No	1			
Yes	3.01	1.45	6.24	**0.003**

Table 12

Certaines figures sont encore en cours d'extraction ce jour

Apport de ce travail

Cette étude morphologique a permis une analyse complète à la fois de la tumeur et de son environnement proche dans des cas, rappelons-le, de sarcomes non primo-traités. Cette notion paraît importante à prendre en compte. En effet, il paraît logique de penser que n'importe quel traitement néoadjuvant, que ce soit de la chimiothérapie ou de la radiothérapie, ait un effet sur la réponse de l'hôte à sa tumeur ajouté à l'effet antitumoral direct. Cette réaction peut être bénéfique ou pas, mais toujours est-il que pour une meilleure compréhension de ces mécanismes, cette série paraît plus pure.

L'analyse complète a mis en évidence un taux de tumeurs présentant des structures lymphoïdes tertiaires matures plus élevé qu'attendu. En effet les sarcomes sont réputés pour être immunologiquement inertes ou froids alors que nous observons *in fine* quasiment 50% des cas avec fmTLS+. 30 % présenteront directement un centre germinatif et un nombre élevé de TLS par lame (analyse semi-quantitative 3+). Nous avons également montré que cette réaction immunitaire était visible dans 93% du temps dans le tissu sain péritumoral. Cette notion n'est certainement pas prise en compte lors de la réalisation de microbiopsie tumorale qui vise avant tout la tumeur !

Il existe une différence de survie à 5 ans entre la population fmTLS+ et la TLS-.

Nous avons aussi pu mettre en évidence une corrélation entre la présence de fmTLS+ et le risque de rechute locale. Cette corrélation doit être discutée avec prudence du fait du nombre

relativement faible d'événement. Cependant, il se peut que la présence de ces TLS soit un signal d'alerte et que les patients avec TLS sur leurs marges de résection puissent nécessiter un traitement par immunothérapie en adjuvant ?

Perspectives : Nous allons chercher une corrélation entre l'analyse morphologique TLS et les résultats de l'analyse transcriptomique permettant de calculer un score immun selon la signature Fridman (cf partie transcriptomique). En effet depuis la publication de Petitprez, on peut mettre en évidence trois groupes de tumeurs : les tumeurs immunologiquement pauvres (peu de cellules immunitaires et peu de vaisseaux sanguins), les tumeurs fortement vascularisées et les tumeurs immunologiquement riches. C'est dans cette dernière sous population que, des agrégats peuvent être observés, ou structures lymphoïdes tertiaires. Ce sont dans ces structures que la réponse immunitaire antitumorale est initiée, suggérant très clairement que les lymphocytes B jouent un rôle clé dans cette réponse.

Partie 2.B DEEP LEARNING

Le second volet morphologique de ce travail s'intéresse à l'apport du deep learning dans l'analyse de lames histologiques. Les techniques de l'intelligence artificielle et en particulier le deep learning sont en expansion dans le domaine biomédical en s'inspirant du modèle biologique de réseaux neuronaux. La numérisation de lames histologiques par scanner associées à des algorithmes de deep learning cherche à mettre en évidence de régions d'intérêt (tuiles) de façon non supervisée par le pathologiste, associées à l'évènement de rechute. Il s'agit d'une étude exploratoire ciblée sur les sarcomes des tissus mous avec une cohorte plus grande que celle du premier axe de travail (220 patients x 4 zones = 880 lames virtuelles annotées). Les résultats préliminaires évoquaient que l'information zone tumorale + tissu sain donnaient un score IA plus élevé avec l'analyse du tissu sain péritumoral que la zone tumorale seule en comparaison avec le grade FNCLCC en termes de pronostic. Ce premier résultat nous laisse ainsi penser que l'information concernant le pronostic du patient pourrait se trouver dans le tissu environnant la tumeur. Cette analyse pourrait être enrichie par la corrélation deep learning des lames et résultats d'expression. On pourrait prédire le profil d'expression à partir des lames (série de *training*) et celle-ci pourrait faire l'objet d'une validation avec apport des données cliniques et thérapeutiques.

Actuellement les progrès en deep learning ont permis de compléter et d'affiner les classifications histologiques traditionnelles dans certains cancers comme le mésothéliome (Courtiol et al. 2019). Dans les sarcomes, peu de données sont disponibles à l'heure actuelle dans la littérature. Un travail collaboratif sur la prédiction de certaines mutations dans les GIST est actuellement en cours de publication (Yu et al in press).

Nous avons donc souhaité compléter l'analyse morphologique traditionnelle de ces tumeurs par une analyse en deep learning réalisée en collaboration avec des équipes de l'INRIA Monc: DR LE Van Linh, DR SAUT Olivier, DR CROMBE Amandine. Ceux-ci étudient plus particulièrement les applications de l'IA dans le domaine médical. L'utilisation d'algorithmes et d'outils permettant l'aide à la décision pourrait aider à une meilleure compréhension de la maladie et finalement d'orienter la prise en charge. Un des résultats préliminaires séduisant avec la société Owkins (collaboration avec l'Institut Bergonié) a permis de réaliser une étude

ancillaire. Celle-ci a permis l'obtention d'un score IA légèrement supérieur au grade FNCLCC en termes de pronostic dans les sarcomes des tissus mous de l'adulte (J. M. Coindre et al. 2001). L'hypothèse de travail est donc de faire analyser à la machine le tissu sain autour de la tumeur et de chercher une information, combinée avec la tumeur qui serait meilleure que nos outils actuels en termes d'outil de prédiction du risque de rechute.

Nous allons donc nous intéresser particulièrement au Deep-Learning (DL) comme outil d'imitation du cerveau. Il s'agit de copier l'application profonde de nos réseaux de neurones. On crée alors des neurones « numériques » qui vont pouvoir se connecter entre eux et créer un véritable réseau. Celui-ci va être entrainé à la prédiction d'évènements que sont la survie, la rechute métastatique et la rechute locale. Ce processus d'entrainement sera confirmé sur une série de validation issue d'une cohorte complémentaire de sarcomes des tissus mous issus de l'Institut Gustave Roussy.

Dans un premier temps un modèle d'analyse mathématique a été mis au point avec mon collègue spécialisé en deep learning à l'Inria en établissant une modélisation des lames scannées. Ci-joint la publication envoyée pour le MICCAI (Medical Image Computing and Computer Assisted Interventions).

Publication sur la methodologie de ces analyses preliminaires

A Deep Attention-MIL framework to predict survivals of soft-tissue sarcoma

from Whole Slide Images

Van-Linh Le1,2, Audrey Michot3, Amandine Crombe4, Carine Ngo6, Charles Honoré7, Jean-Michel Coindre5, Olivier Saut2, and Francois Le-Loarer5

1 University of Bordeaux (IMB), CNRS and Bordeaux INP, UMR 5251, F-33400, Talence, France

2 MONC team, INRIA Bordeaux Sud-Ouest, Talence, France

3 Department of Oncological Surgery, Institut Bergonié, Bordeaux, France

4 Department of Radiology, Pellegrin University Hospital, Bordeaux, France

5 Department of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

6 Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

7 Department of Oncological Surgery, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

van-linh.le@u-bordeaux.fr

Abstract. Soft-tissue sarcoma is a group of cancers that develops in soft tissue and can appear asymptomatically anywhere in the body. Diagnosing patient survival time at different stages of cancer can help clinicians define an accurate treatment plan to save the patient's life. In this paper, we proposed an end-to-end Deep learning framework via Multiple Instance Learning (MIL) for the survival predictions: Overall survival, Metastasis-free survival, and Local-recurrence free survival, by studying the features from Whole Slide Images of soft-tissue sarcoma patients. The suggested framework consists of three steps: tiles selection from the WSIs to choose the interested tiles for the study, tiles feature extraction by using a pre-trained deep learning model, and a Deep Attention-based model.
to predict the risk score for each patient via MIL approach. Then, the risk scores were used to separate the patients into low/high-risk groups and predict survival time. The framework was trained and validated on a development dataset including of 220 patients, then it was evaluated on an external dataset consisting of 48 patients. The experimental results showed the proposed framework was

validated and contributed to accurate cancer survival prediction on both validation and external testing dataset.

Keywords: Multiple Instance Learning · Deep Attention model · Survival prediction · Soft-tissue sarcoma · Whole Slide Image.

1 Introduction

Soft-tissue sarcoma (STS) is a rare and heterogeneous group of tumors affecting adults. It begins in the soft parts of the body that connect, support, and surround other structures, e.g., muscle, fat, blood vessels, nerves, tendons, and the lining of joints. The last World Health Organization (WHO) histologic classification of soft tissue tumors recognized more than 50 subtypes of soft-tissue sarcoma [1]. A robust and effective prognostic system based on histological grading applicable to all adult STSs has been set up from a large cohort of the French Federation of Cancer Centers (FNCLCC) to help the clinician [22, 4]. STSs are known to have a poor and variable prognosis. Prognosis of STS is dominated by two events with different consequences which are local recurrence and distant metastasis. Overall survival mainly depends on metastasis, but local control may also impact overall survival [2]. It is crucial for the clinician to determine new prognostic factors to personalize and adapt the patient treatment. In most reported studies, quality of surgical margins is the most important factor for predicting local recurrence [2] whereas metastasis and overall survival are related mainly to histological grade [3]. In recent years, Deep Learning [8] via Multiple Instance Learning [7] (MIL) was shown to be an effective way to predict survival in patients with STS by analyzing the Whole Slide Images (WSIs). In some cases, it might offer a better predictive value than histological grade. In addition to biological and clinical information, WSIs may contain information useful for analyzing diagnosis and prognosis of cancer, e.g., Overall Survival (OS), Metastasis Free Survival (MFS), or Local-Recurrence Free Survival (LRFS), as well as prediction of response to treatment. Compared to genomic data, WSIs can present the tumor growth and morphology in extremely detailed, high resolution. However, capturing cell detail makes the exported image potentially cumbersome to cope with, and analyzing WSIs challenging for several reasons: (1) WSIs may contain billion pixels which is difficult to process computationally; (2) a patient could have several WSIs for study, with significant differences in texture and biological structures; (3) we have only label at the patient level while each patient could have different WSIs for diagnosis. Deep learning has become a popular solution for image processing applications including the analysis of pathological images. However, the processing of WSIs is different from the processing of usual images

due to the massive resolution of this kind of image. It is impossible to analyze the whole image at one time. To overcome this challenge, one possible solution is to consider a weakly supervised method via a Multiple Instance Learning (MIL) approach [14]. In MIL, a WSI is divided into non-overlap tiles (patches). Therefore, a WSI could be considered a bag of tiles. Not all tiles are necessary to be analyzed because some of them could not be relevant to diagnosis detection, instead, a sub-set of tiles (some bags) is selected for the study. In this work, we propose an end-to-end framework to predict the survival of cancer patients. At the hearth of our framework is a deep learning model with an attention mechanism for the prediction of survival via MIL. We evaluate the proposed framework on two datasets originating from two different French clinical centers: one at Institute Bergonié in Bordeaux and one at Institute Gustave Roussy in Villejuif. In this work, we show that the framework offers satisfactory predictions of the survival probability of the patients compared to the gold standard for cancer survival prediction: FNCLCC grade [4].

2 Methodology

2.1 Overview of the Framework

Figure 1 shows the stages in the proposed framework. It consists of three phases: firstly, the non-overlap patches (tiles) are extracted from the WSIs of the patients. Secondly, a pre-trained deep learning model (e.g., ResNet50 [13]) is used as an encoder to extract the features from the tiles. Finally, the extracted features are fed into the deep learning survival model for predicting the risk score for each patient. The risk scores are then taken by a non-parametric estimator (e.g., Kaplan-Meier [17]) to predict the survival probability for the patient.

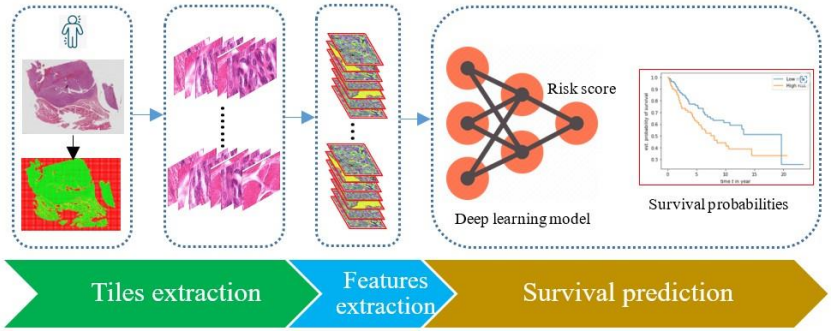


Fig. 1: The phases in the proposed framework

2.2 Tiles extraction

A WSI is organized as a pyramid of images with different magnification levels, the image at the highest level (40× of magnification) could have a resolution of $100K \times 100K$ pixels, and it is down sampled over

the magnification levels. Usually, the image (original image) at the highest magnification level (40×) is chosen for study. It is worth noting that a large part of the image does not contain any tissue, which are not necessary for analysis. These regions are discarded during the tiling process. Because of the problem with high resolution of the original image, it is impossible to apply the classical image processing techniques on whole image for pre-processing step. Instead, an image at a lower magnification level (e.g., 12×, scaled image) is used to perform the pre-processing operations (e.g., segmentation, binarization), to select the tissue area, and to indicate the location of the interested tiles. At the end of this stage, the tiles on the original image corresponding to the selected tiles on the scaled images are extracted and used for the study. As a preferred size from the deep learning models for image classification [13,20], the original image is divided into non-overlap tiles with a size of 224×224×3 pixels. Based on the fraction of tissue, tiles are classified into 4 groups: group A represents the tiles that are composed of more than 80% of tissue, group B contains the tiles which have more than 10% and less than 80% of tissue, group C includes the tiles which have more than 0% and less than 10% of tissue and group D of the tiles that do not contain tissue. In this work, we have considered tiles from group A and B (e.g., those composed of more than 10% of tissue) for our analysis. As mentioned, a patient could have several WSIs, even if we only extract tissue tiles, we can still get hundreds of thousands tiles for each patient.

2.3 Features extraction

Unlike segmentation and detection tasks in WSI analysis [23, 5, 19], our framework predicts patient-level aggregated from tile-level information. As pointed out in [15], training patch-based CNNs for weakly supervised learning is very time-consuming (several weeks), we propose to use features from pre-trained models instead of using CNNs to learn features from scratch. Here, for instance, we used a pre-trained ResNet50 [13] on ImageNet [20] to extract the features of the tiles. For each tile, only 2048 features are considered. Then, the extracted features are concatenated to obtain the features for each patient. As the output of this stage, extracted features from WSI tiles of each patient are represented as a matrix of (N × 2048), where N is the number of tiles selected. Over the past two years, we see that the self-supervised models have outperformed the supervised models on ImageNet [20] for downstream transfer learning performance. Therefore, we want to compare the performance of our framework by using features outputed from different encoders. Following that, we have trained a Masked AutoEncoder [10] on tiles of several WSIs. Then, the encoder has been used as an extractor. For this model, we extracted 1024 features for each tile.

2.4 Multiple Instance Learning model for survival prediction

Figure 2 illustrates the proposed deep learning architecture for survival prediction. The layers of this model can be decomposed into three groups: the first group consists of the layers that stayed before

the Attention module [16]. These are used to aggregate the features for each tile as well as compute the score for each tile; the second group is an Attention module [16] which outputs the attention score for each tile. The attention score combined with the corresponding tile features before passing it to the layers in the third group to estimate the risk score for each patient. Local representation (two layers before the attention module) encodes features of the tiles, but our model provides the score at the patient level. Therefore, aggregating tile features into patient-level representation is a necessary step. A popular choice would be to use the maximum or the mean operator. Yet, the drawbacks are clear they are pre-defined and not trainable which might not be flexible and adjustable to the specific task. A better way to integrate tile information is to leverage an attention mechanism that considers the importance of each tile. In this work, we proposed to use the attention base MIL for aggregation of tile features to obtain the representation of patient-level [16]. It consists of two linear layers interspersed by Tanh activation function. A soft-max activation function is placed at the end of the module to calculate the attention score for each tile, to be sure that the sum of all attention scores is equal to 1.The input of the model is the selected features of the patient, organized as a matrix of (M × 2048) where M is the number of tiles considered. After passing the layers in the first group, the features of each tile were aggregated and reduced to 256 features. These reduced features are inputted to the attention module to output the attention score for each tile (1×M). The attention score is multiplied with corresponding tile features to obtain the representation feature for WSI (1 × 256) which is the input for the last layer in the model. Finally, a linear function learns the representation of WSI to provide the risk score for the patient. The proposed architecture is detailed in Table 1, Supplemental document. Our model was inspired by some studies [16, 24], but we have modified the parameters to adapt to our objective. Firstly, we replaced the ReLU activation function with PreLU activation, which is more precise in the decision [12]. Secondly, to prevent over-fitting, we inserted the dropout layers [21] at the end of each group of layers, and reduce the number of features in the last layer of the model.

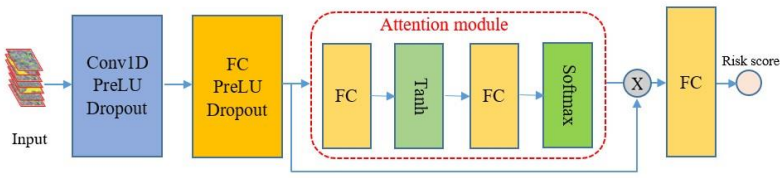


Fig.2: The proposed survival model

3 Experiments

3.1 Datasets

We performed experiments on two development datasets: the Bergonié dataset and the IGR dataset. The two cohorts of patients adults with STS were extracted from the Sarcoma BCB(https://sarcomabcb.org:connect). The Bergonié dataset, collected by the pathologist of the Institute of Bergonié (Bordeaux, France), starting from 01/01/1990 until 01/12/2020. It consists of 220 patients with more than 450 WSIs representing at least 2 WSIs per patient. The IGR dataset, collected by Institute Gustave Roussy (Villejuif, France) in a period from 01/01/2000 until 01/12/2016. It consists of 48 patients with more than 100 slides. In both datasets, we received also the clinical data and outcomes including the metastasis and local recurrence status. As part of this study, we have used the Bergonié dataset to train and validate the models. The IGR dataset was used as an external cohort. Table 2 in Supplemental document details the number of patients, WSIs, cases of events in each dataset.

3.2 Experiments setup

We evaluated model performance on three survival tasks: OS, MFS, and LRFS. For each task, we performed a 5-fold cross-validation on the training dataset (Bergonie). Then, the 5 corresponding models are used for inference on the external validation set (IGR). For all three tasks, we reported the C-index and Confidence Interval (CI-95%). The reported C-index in this study was the average C-index of 5-fold cross-validation. As mentioned in section 2.2, each patient has a hundred thousand tiles. Due to the limitation of the calculation, we could not analyze all tiles; therefore, we selected a subset of tiles (e.g., M = 10K) for the study after trying several trials. As the output of this step, each patient was represented as a matrix of ($M \times 2048$), this matrix was used as the input of the survival model.

3.3 Implementation details

The models were implemented by using the Pytorch library [9]. Models were trained in 200 epochs using an Adam optimization [18] with a weight decay of 10−4. The learning rate was set to $3 \times 10-3$, batch size was equal to 1, the loss was backward after obtaining forward values of all patients. An early stopping strategy was applied by monitoring the validation loss, the training process was ended if the validation loss was not improved in 20 epochs.

4 Experimental results

In this section, we explore the experimental results. Firstly, we present the model's performances on tile features only for three survival tasks: OS, MFS, and LRFS. Secondly, we re-design the model by considering some clinical features, we compare the results between the two approaches (with and without clinical features). Finally, these results are compared to the results of a Cox model, a common model for survival prediction.

4.1 Prediction from tiles features

On the validation set, we observe that the C-index scores could be divided into two groups: the first group stays around 0.7 corresponds to the OS (0.6901 ±0.0388) and MFS (0.7179 ± 0.0709) task, while the second group is near 0.6 which match the result on LRFS (0.6211±0.0537) task. On the external validation set (IGR), the average C-indexes on OS and MFS tasks are lower than the validation set, (0.6294 ± 0.0153) and (0.682 ± 0.0491) for OS and MFS, respectively. However, the C-index on LRFS outperforms the score on the validation set (0.76 ± 0.0184)(see the details in Table 3, Supplemental document). We see that even the C-index scores on the test set are smaller than the validation set, but the difference is not so much. It means that the models are not over-fitting and they work well on the unseen data. As described, the models provided the risk (event) score for each patient. Then, the risk scores were used to divide the patients into two groups: low risk and high risk, using the equation 1. Finally, an estimator (e.g., Kaplan-Meier [17]) was used to provide the survival probability of the two groups.

$$dx = f(x) = \begin{cases} 0 & \text{if } Px < PI \\ 1 & \text{if } Px \geq PI \end{cases} \quad (1)$$

Where: Px is the predicted risk score from the model and PI is the median of the risk scores. We see from the results that the statistical information between the two groups is significant, our scores are good enough to separate the patients,the difference between the low and high-risk curves is significant ($p < 0.05$). We obtain similar stratification to the Grade (which is seen as the gold standard to evaluate the models) with a better stratification for LRFS. On the Bergonié dataset, our curves are very close to the grades, even our curves on OS and MFS tasks are better than the Grade. On the external test set IGR, our survival curves are better than the Grade on the LRFS task, while the curves on OS and MFS tasks are very close to the Grade. The curves are shown in Fig. 1 and Fig.2 (Supplemental document).

4.2 Adding clinical features to imaging

This section presents the results of the enhanced version of the proposed deep learning model. In this version, we consider additional clinical features (e.g., Age, Size of the tumor, Grade, and Histology) besides the tile features for the prediction of survival. On the validation dataset, the C-index is improved both on three survival tasks: OS (0.7835±0.034), MFS (0.7389±0.034), LRFS (0.6883± 0.037). It is the same situation on the testing IGR dataset, the results are better for the three survival tasks: OS (0.6378 ± 0.043), MFS (0.6885 ± 0.033), LRFS (0.7272 ± 0.068) (details in Table 4, Supplemental document). However, the improvement in IGR was not as large as expected from the validation set results.To explain the difference, we hypothesized that we have a bias between the clinical data of the

patients from the two centers. Using the same evaluation as the one presented in the previous section, the outputs of the models were used to group the patients into low/high-risk groups. The survival curves on each task (OS, MFS, LRFS) in this approach are illustrated in Fig. 3 (Supplemental document). We see from the results that adding clinical features improves the statistics on C-index scores but not on the survival curves, even the results on LRFS have reduced a little bit, the survival curves (high/low risk) could not separate in first 5 years.In addition to the risk score, our models also provide the attention score for each tile, which allows us to predict the survival pattern before predicting the risk score. Figure 3 illustrates the top 30 tiles of a patient who had a metastatic relapse. Most of these tiles, with a high attention score, are found within the tumor, but some tiles from other regions are found (blue border) where one can see the presence of metastasis.

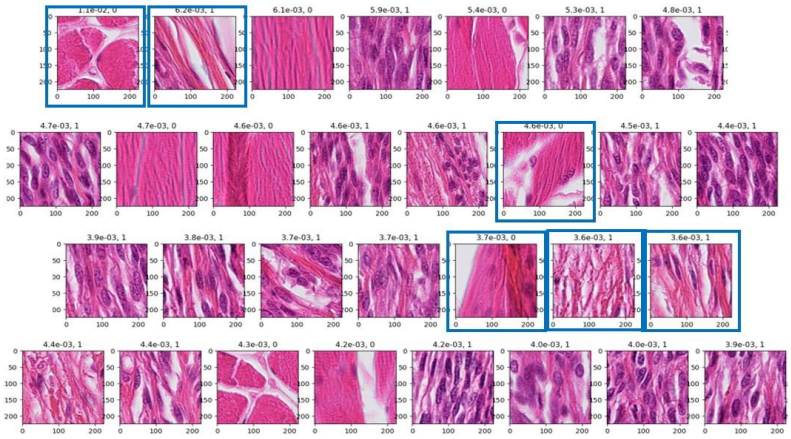


Fig. 3: Top-30 tiles with highest attention score of a metastasis patient. The blue box presented the tiles outside the tumor region with presence of metastasis.

Compare to Cox model: Cox model [6] is a popular model for the prediction of survival. We have used the Cox model with two objectives: (1) to verify the informative value of tile encoding, is it enough for use as a feature in a survival model? (2) to compare the performance of our framework with a classical method for survival tasks. The Cox model was trained on the Bergonié dataset and tested on the IGR dataset. We first try the Cox with 4 clinical features. Then, we used the outputs of deep learning model (risk score) as the fifth feature on the Cox model. We see from the results that adding the tile features has improved the performance of the Cox model (Table 5, Supplemental document). Besides that, in the comparison between the results of Cox model (5 features) and our results, the results on the validation set are better than the Cox model on OS and MFS tasks, while we are close to Cox's result on the LRFS task. In another work, we modified the joined model (tiles and clinical features) for a classification task. The objective was to predict the probability that a patient will have an event (OS,

MFS, LRS) in 10 years or not. The model was trained with 5-fold cross-validation and the AUC score was used as a performance score. The average AUCs (CI-95%) of 5-fold cross-validation were 0.7776
A Deep Attention-MIL framework to predict survivals of soft-tissue sarcoma 9 (±0.047), 0.7312 (±0.062), and 0.6539 (±0.099) for OS, MFS, and LRFS tasks, respectively. The results showed that the model gave good results on the new objective, we have obtained a good average AUC on OS and MFS tasks and not so bad on LRFS task.

Model performances on the features from different encoders: As mentioned in Section 2.3, we have trained a Masked AutoEncoder [10] and downstream it for use as an encoder to extract the features from the tiles. The obtained results were not as expectation, the performances of the model have not been improved by the new features (both on three tasks). The obtained C-indexes scores were lower than on ResNet50 [13].

5 Discussion and Conclusion

In this paper, we proposed a Deep Attention-MIL framework for survival prediction from the pathological slide. Our objective was to investigate the role of the WSI for the prognostic tasks along to the clinical features. To this end, we extended the model by considering the clinical features. First, we saw that the deep learning risk scores could be used as a feature for the survival analysis, e.g.,in the Cox model, and it really improved the Cox's performance for prognosis tasks. Second, we proposed a model to combine the tiles and clinical features for survival prediction. As a result, our model achieved good performance for various survival prediction tasks. Our results were close to the results of Cox model (5 features). These results can compare to the gold standard for the study of cancer. The study has opened some questions that should point out in the future: **–** Analyzing the effect of the tiles selection step on the performance of the model: In our study, a set of 10K tiles has been selected for analysis instead of using all tiles from the WSIs. We have tried several experiments with different strategies for this step, e.g., sort/ shuffle the tiles scores, and select other set of 10K tiles. The results showed that there was not significantly changed between strategies. However, we also put here a question for considering another strategy with MIL instead of choosing 10K of tiles.

– Concerning the features extraction step, the features from the encoder of the MAE model have not improved the performance of the model as expected. However, it exists several self-supervised approaches that could be interesting to try (e.g., MoCo v2 [11]). The objective is to procedure an extractor that has a relation with our studied images.

– Adding the clinical features has improved the performance of the model on the Bergonié dataset but not on the IGR dataset. The hypothesis is that there is a bias between the two datasets. Therefore,

considering the uniformity of the WSIs coming from different centers could be also another work of this study.

Acknowledgements The authors would like to thank the support of the Bordeaux Institute of Oncology (BRIC) for this project. This study was carried out in the framework of a collaboration between the MONC team, Inria Bordeaux Sud-Ouest, and the Sarcotarget team - BRIC.

References

1. Antonescu, C., Yoshida, A.: The who classification of tumours editorial board. Soft Tissue and Bone Tumours. 5th Edition. Freddie Bray (Ed.). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France **617** (2020)
2. Casali, P., Abecassis, N., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Bonvalot, S., Boukovinas,I., Bovee, J., Brodowicz, T., Broto, J., et al.: Soft tissue and visceral sarcomas:Esmo–euracan clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology **29**, iv51–iv67 (2018)
3. Coindre, J.M., Terrier, P., Bui, N.B., et al.: Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. a study of 546 patients from the french federation of cancer centers sarcoma group. Journal of Clinical Oncology **14**(3), 869–877 (1996)
4. Coindre, J.M., et al.: Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the french federation of cancer centers sarcoma group. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society **91**(10), 1914–1926 (2001)
5. Courtiol, P., Tramel, E.W., Sanselme, M., Wainrib, G.: Classification and disease localization in histopathology using only global labels: A weakly-supervised approach. preprint arXiv:1802.02212 (2018)
6. Cox, D.R.: Regression models and life-tables. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) **34**(2), 187–202 (1972)
7. Dietterich, T.G., Lathrop, R.H., Lozano-Pérez, T.: Solving the multiple instance problem with axis-parallel rectangles. Artificial Intelligence **89**(1), 31–71 (1997)
8. Dong, S., Wang, P., Abbas, K.: A survey on deep learning and its applications.Computer Science Review **40**, 100379 (2021)
9. Falcon, W., The PyTorch Lightning team: PyTorch Lightning (3 2019),https://github.com/Lightning-AI/lightning
10. He, K., Chen, X., Xie, S., Li, Y., Dollár, P., Girshick, R.: Masked autoencoders are scalable vision learners. In: Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. pp. 16000–16009 (2022)
11. He, K., Fan, H.,Wu, Y., Xie, S., Girshick, R.: Momentum contrast for unsupervised visual representation learning. In: Proceedings of the IEEE/CVF conference on computer vision and pattern recognition. pp. 9729–9738 (2020)
12. He, K., Zhang, X., Ren, S., Sun, J.: Delving deep into rectifiers: Surpassing humanlevel performance on imagenet classification. In: Proceedings of the IEEE international conference on computer vision. pp. 1026–1034 (2015)
13. He, K., Zhang, X., Ren, S., Sun, J.: Deep residual learning for image recognition. In: Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition.pp. 770–778 (2016)
14. Herrera, F., Ventura, S., Bello, R., Cornelis, C., Zafra, A., Sánchez-Tarragó, D., Vluymans, S., Herrera, F., Ventura, S., Bello, R., et al.: Multiple instance learning. Springer (2016).
15. Hou, L., Samaras, D., Kurç, T.M., Gao, Y., Davis, J.E., Saltz, J.: Efficient multiple instance convolutional neural networks for gigapixel resolution image classification.preprint arXiv:1504.07947 **7**, 174–182 (2015)

16. Ilse, M., Tomczak, J.,Welling, M.: Attention-based deep multiple instance learning. In: International conference on machine learning. pp. 2127–2136. PMLR (2018)
17. Kaplan, E.L., Meier, P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. Journal of the American statistical association **53**(282), 457–481 (1958)
18. Kingma, D.P., Ba, J.: Adam: A method for stochastic optimization. arXiv:1412.6980 (2014)
19. Rony, J., Belharbi, S., Dolz, J., Ayed, I.B., McCaffrey, L., Granger, E.: Deep weakly-supervised learning methods for classification and localization in histology images: a survey. arXiv preprint arXiv:1909.03354 (2019)
20. Russakovsky, O., Deng, J., Su, H., Krause, J., Satheesh, S., Ma, S., Huang, Z., Karpathy, A., Khosla, A., Bernstein, M., Berg, A.C., Fei-Fei, L.: ImageNet Large Scale Visual Recognition Challenge. International Journal of Computer Vision (IJCV) **115**(3), 211–252 (2015). https://doi.org/10.1007/s11263-015-0816-y
21. Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I., Salakhutdinov, R.:Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting. The journal of machine learning research **15**(1), 1929–1958 (2014)
22. Trojani, M., Contesso, G., Coindre, J., et al.: Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. International journal of cancer **33**(1), 37–42 (1984)
23. Wang, D., Khosla, A., Gargeya, R., Irshad, H., Beck, A.H.: Deep learning for identifying metastatic breast cancer. arXiv preprint arXiv:1606.05718 (2016)
24. Yao, J., Zhu, X., Jonnagaddala, J., Hawkins, N., Huang, J.: Whole slide images based cancer survival prediction using attention guided deep multiple instance learning networks. Medical Image Analysis **65**, 101789 (2020)

A Deep Attention-MIL framework to predict survival of soft-tissue sarcoma from Whole Slide Images: Supplementary material

Anonymous

Anonymous Organization
*******@****.***

Table 1: The input/output at each layer of the survival model.

Layer	Input	Output
Conv1D/PreLU/Dropout	$M \times 2048$	$M \times 512$
FC/PreLU/Dropout	$M \times 512$	$M \times 256$
Attention module	$M \times 256$	1×256
FC	1×256	1

Table 2: The details of studied datasets.

Dataset	Anonymous1	Anonymous2
No. patients	220	48
No. WSIs	450	105
No. patients vival/ death	133/87	36/12
No. patients non-metastasis/ metastasis	148/72	37/11
No. patients non-recurrence/ recurrence	188/32	40/8
Location	Institute Anonymous1 (France)	Institute Anonymous2 (France)
Collection period	From 01/01/1990 to 01/12/2020	From 01/01/2000 to 01/12/2016

Table 3: The C-index scores (± CI-95%) of Overall Survival (OS), Metastasis Free Survival (MFS), and Local-Recurrence Free Survival (LRFS) tasks on Anonymous1 validation and Anonymous2 testing datasets.

Dataset	OS	MFS	LRFS
Anonymous1	0.6901 (± 0.0388)	0.7179 (± 0.0709)	0.6211 (± 0.0537)
Anonymous2	0.6294 (± 0.0153)	0.682 (± 0.0491)	0.76 (± 0.0184)

Table 4: The C-index scores (± CI-95%) of OS, MFS, LRFS tasks on Anonymous1 validation and Anonymous2 testing datasets (with clinical features).

Dataset	OS	MFS	LRFS
Anonymous1	0.7835 (± 0.034)	0.7389 (± 0.034)	0.6883 (± 0.037)
Anonymous2	0.6378 (± 0.043)	0.6885 (± 0.033)	0.7272 (± 0.068)

Table 5: The C-index scores from Cox model on OS, MFS, LRFS tasks.

Dataset	OS	MFS	LRFS	Nb. features
Anonymous1	0.7455	0.6835	0.7216	4 features (clinical)
Anonymous2	0.57	0.7049	0.7381	
Anonymous1	0.7591	0.7071	0.7274	5 features (clinical + imaging score)
Anonymous2	0.5733	0.74	0.7279	

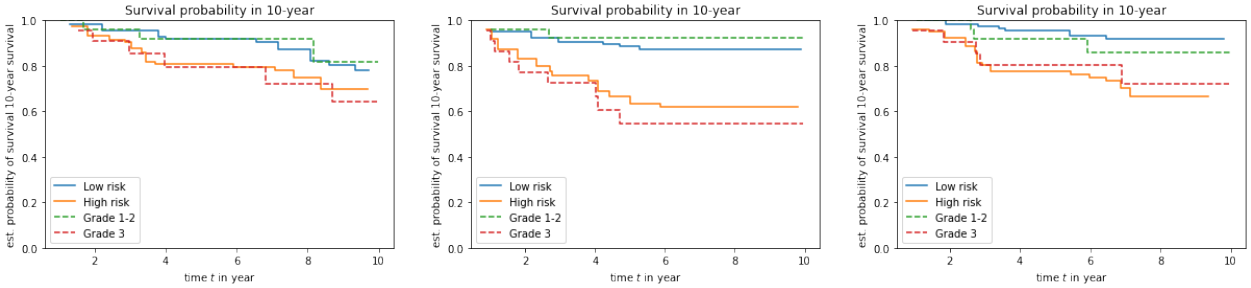


Fig. 1: The survival curves (in 10 years) on Anonymous2 dataset by using imaging features only. From left to right: OS, MFS, LRFS tasks

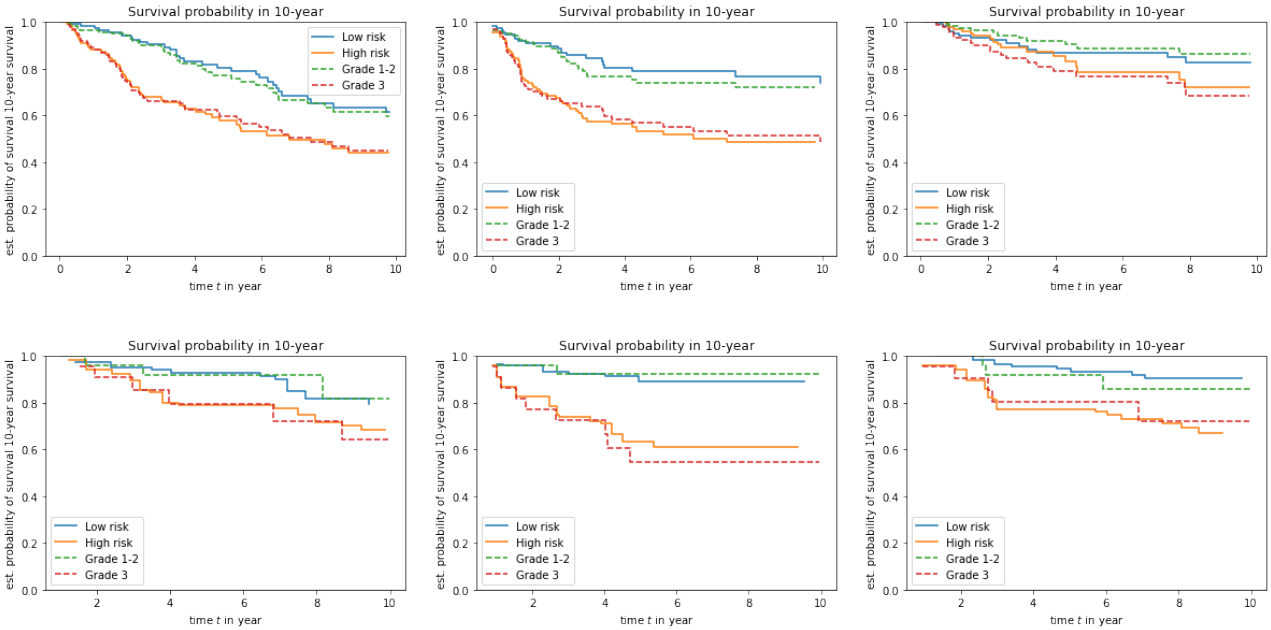


Fig. 2: The survival curves (in 10 years) on Anonymous1 (top row) and Anonymous2 (bottom row) dataset by using imaging and clinical features. From left to right: OS, MFS, LRFS tasks

Apport de cet article

Cette publication relate de la construction d'un modèle de deep learning basé sur des lames histologiques scannées. En parallèle de ce travail, nous avons cherché la zone la plus prédictive du risque de rechute. Nous allons rappeler brièvement le matériel et méthodes.

Matériel

Choix de la cohorte

Nous avons d'abord travaillé sur notre série de 220 cas de sarcomes pris en charge sur l'Institut Bergonié avec chirurgie première au niveau des membres et de la paroi du tronc.
Lors de la construction du modèle, une cohorte externe de validation a été souhaité. Nous avons donc entamé un travail collaboratif avec l'équipe de l'Institut Gustave Roussy nous permettant d'obtenir de nouveaux cas (nouvelles lames scannées) sans traitement au préalable, avec données de recul suffisant pour permettre des analyses de survie.

Relecture et enregistrement des lames

Prétraitement des images : Des lames colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HES) ont été examinées par un pathologiste spécialisé senior pour délimiter les zones de la masse tumorale, y compris le centre de la tumeur (Tc), la périphérie de la tumeur (Tp) et les tissus sains non tumoraux, y compris la marge R0 (à plus de 1 cm = HT) et marge R1 (R1). La cohorte de l'Institut Bergonié contient 220 cas de sarcomes des tissus mous (cf précédemment). Une lame par patient, au maximum deux ou trois lames ont été scannées. L'idéal était donc de percevoir sur une même lame HES nos 4 zones d'intérêt. La figure 6 montre la démarcation de chaque zone rapportée sur des images de diapositives entières (WSI). La sélection se fait sur la représentation nécessaire de chaque zone (Si pas de présence de tissu sain environnant, alors le cas n'avait pas été retenu). Les lames HE ont été numérisées à l'aide d'un scanner de la série Hamamatsu Nanozoomer à un grossissement de 40 fois. Le logiciel TOOLKIT a été utilisé pour l'anonymisation de chaque lame. Le modèle a été construit en intégrant les lames histologiques numérisées sous forme de multiples « tuiles » et entame la phase

d'apprentissage pour permettre à la machine d'être reproductible. Nous avons extrait l'image entière de la diapositive (WSI) pour la segmentation, comme nous pouvons le voir sur la figure 14. Ensuite, ces zones d'intérêt ont été contourées pour permettre dans un premier temps de les identifier et dans un second temps de les comparer et ou de les pooler (analyse de zones combinées).

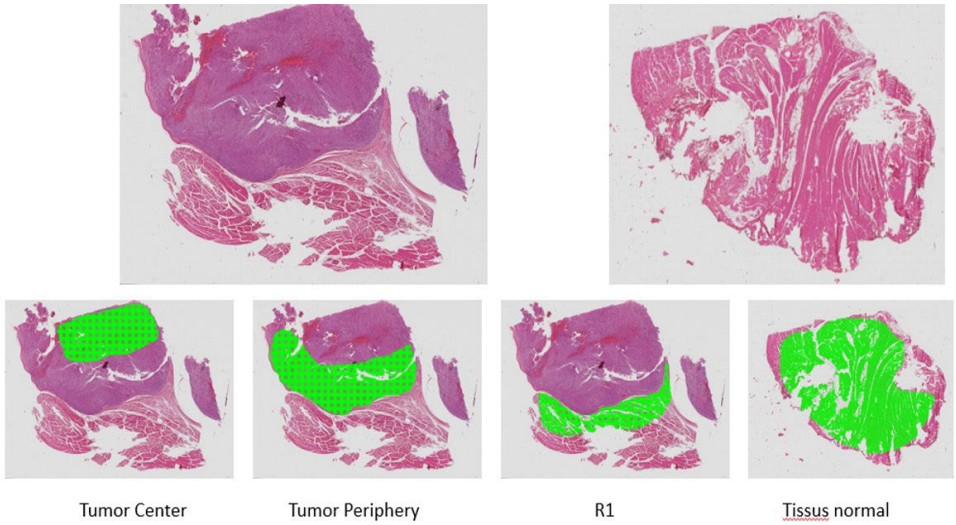
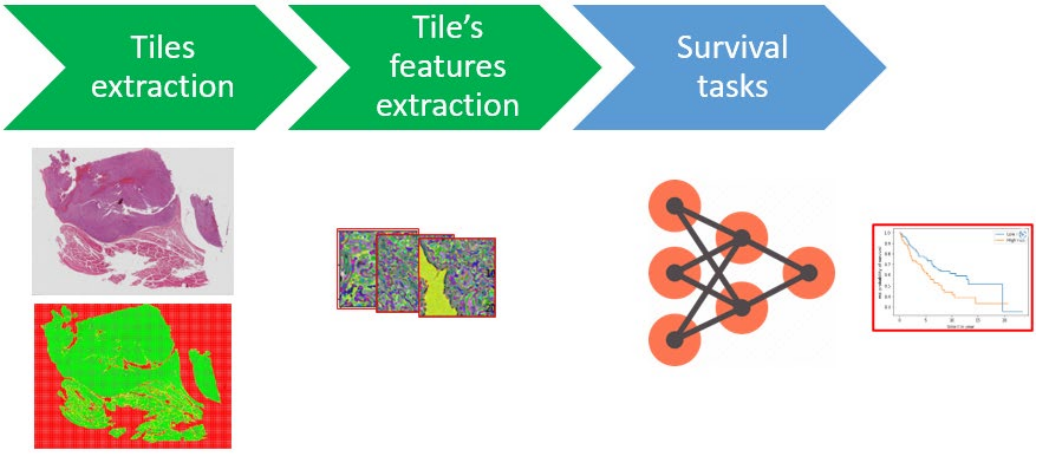


Figure 14: segmentation des zones d'intérêt et extraction des tuiles.

Méthode : Entraînement de modèle et stratégies d'expérimentation

.

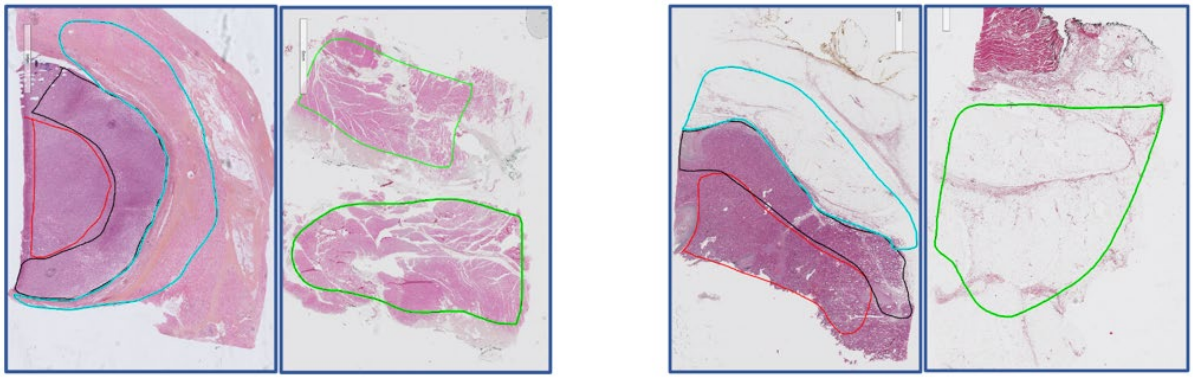
Le modèle Deep Learning (DL) a été construit par extraction de tuiles. L'extraction des caractéristiques des tuiles et les données de survie ont été réalisées : Figure 15



Un score DL a été généré pour chaque patient et le DL va catégoriser le patient en haut ou bas risque en fonction de l'algorithme appris sur la cohorte d'entrainement. En parallèle des modèles de Cox ont permis d'élaborer des courbes de survie avec analyse de la survie globale (OS) de la survie sans métastase (MFS) et de la survie sans rechute locale (LRFS). Les premiers résultats ont été exprimés par zone d'analyse à savoir :

- TC : zone tumorale centrale
- TP : zone tumorale périphérique
- R1 : zone de tissu sain au contact de la tumeur
- TS : zone de tissu sain à distance > 1cm

Sachant que nous avions deux types de R1-TS : tissu musculaire et tissu fibroadipeux, lorsqu'un avait été choisi sur lame du R1, la même nature de tissu était prise pour le tissu sain (Figures 16)

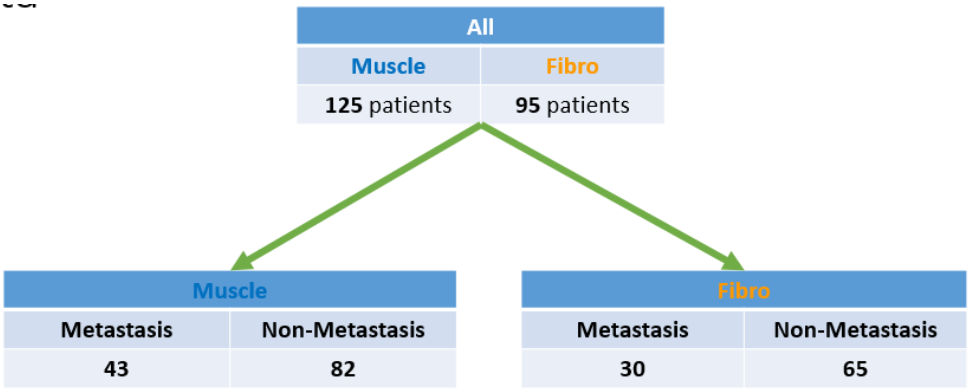


Figures 16 : à gauche, les 3 zones sont « contourées » avec zone de tumeur centrale TC, zone tumorale périphérique TP, zone saine peritumorale R1 qui est dans du muscle, et dans ce cas la lame attenante de tissu sain contourée en vert est également du tissu musculaire. A droite, la situation avec les zones de TC TP et le R1 qui est cette fois adipeux et la lame correspondante de tissu adipeux.

Afin de nous affranchir de cette possible problématique, la même nature de tissu a été choisi pour les échantillons de R1 et de TS dès l'élaboration de la cohorte.. Nous avons travaillé sur un score de prédiction sur la cohorte globale et en sous analyse dans le groupe avec tissu musculaire et dans le groupe à tissu fibroadipeux. En effet, nous nous sommes posés la question du rôle de la nature du tissu environnant et de son impact. A noter que les tumeurs profondes ne sont pas nécessairement entourées de tissu musculaire et inversement. Il n'y a pas à prioris de biais de ce type, entre des tumeurs profondes qui seraient toutes musculaires et des superficielles qui seraient fibroadipeuses.

Nous avons donc scindé la cohorte comme ci dessous : flowchart de la cohorte globale de Bergonié pour la survie sans récidive (Figure 17).

Figure 17 : flowchart de la cohorte globale de Bergonié pour la survie sans récidive



Première série d'expérimentation :

Le DL va fournir un score de risque correspondant au statut de survie (vivant ou décédé) pour chaque patient de la cohorte de l'Institut Bergonié.

Les expériences ont été conçues avec une validation croisée (VC) 5 fois, le C-index a été enregistré sur l'ensemble de validation de chaque partie.

A la fin de la validation croisée, le C-index moyen et l'Intervalle de Confiance (IC) moyen ont été calculés 5 fois.

L'expérience a été réalisée sur trois ensembles de données différents :

tous les patients,

patients avec muscle strié dans l'échantillon sain = cohorte musculaire et

patients avec tissu fibro-adipeux dans les échantillons sains = cohorte fibro-adipeuse.

Pour chaque expérience, nous avons fait la validation croisée sur une région individuelle, une combinaison de 2 régions, 3 régions et toutes les régions. Enfin, nous avons comparé les résultats sur les trois ensembles de données comme nous pouvons le voir sur la figure

- Dataset 1 (All) : Tous les patients (220 patients) de l'Institut Bergonié
- Dataset 2 (cohorte musculaire) : 125 patients
- Dataset 3 (cohorte fibroadipose) : 95 patients

Deuxième série d'expérimentation :

a. Entraînement : Le modèle est entraîné sur 70 % du jeu de données de l'Institut Bergonié (train IB). Ensuite, le modèle formé est validé sur les 30 derniers % de la validation IB et de la validation IGR. Nous effectuons 3 tests pour 3 caractéristiques d'entrée différentes : Tp, Tc+Tp, Tp+R1 et Tc+Tp+R1.

b. Validation croisée : pour chaque caractéristique d'entrée, nous avons effectué une validation croisée quintuple. Les résultats sur l'Institut Bergonié sont obtenus en combinant les validations de tous les 5 volets. Sur IGR, nous effectuons 5 tests sur 5 modèles. Ensuite, nous calculons le C-index moyen de 5 sorties, ainsi que les courbes de Kaplan-Meier.

Résultats sur la région analysée pour la prédiction du score

Les résultats AUC sont reportés sur la figure 18 ci dessous.. Les résultats sont élevés quelque soit la région avec une meilleure prédiction dans le TP TC et TS à distance. Sur les figures 19 sont reportés les résultats des AUC sur les combinaisons de deux régions : Tc + Tp puis Tc + R1, Tc + TS, TP+ R1, TP+ TS et enfin R1+ TS. Enfin les combinaisons de trois régions et plus sont répertoriées dans la figure 20.

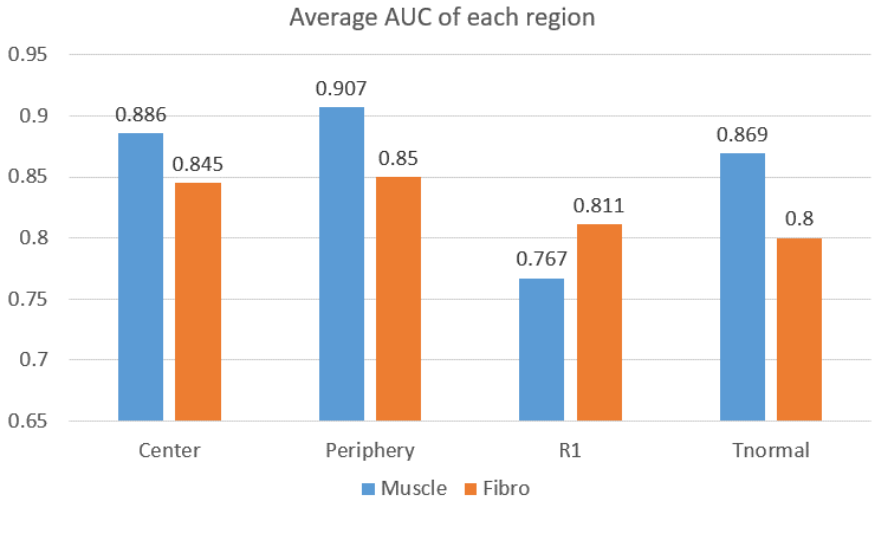


Figure 18 : résultats AUC par cohorte et par région

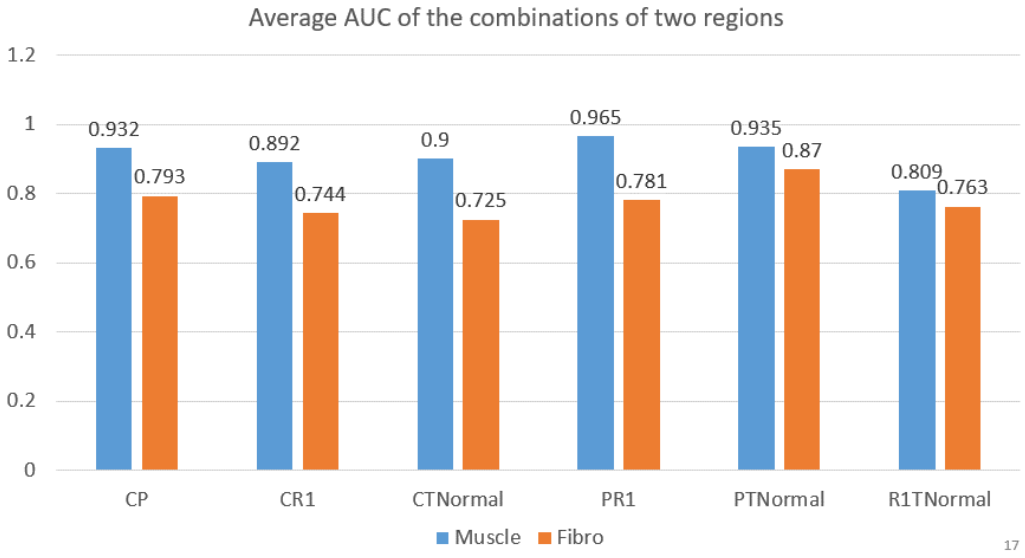


Figure 19 : résultats AUC par cohorte et par combinaison de 2 régions

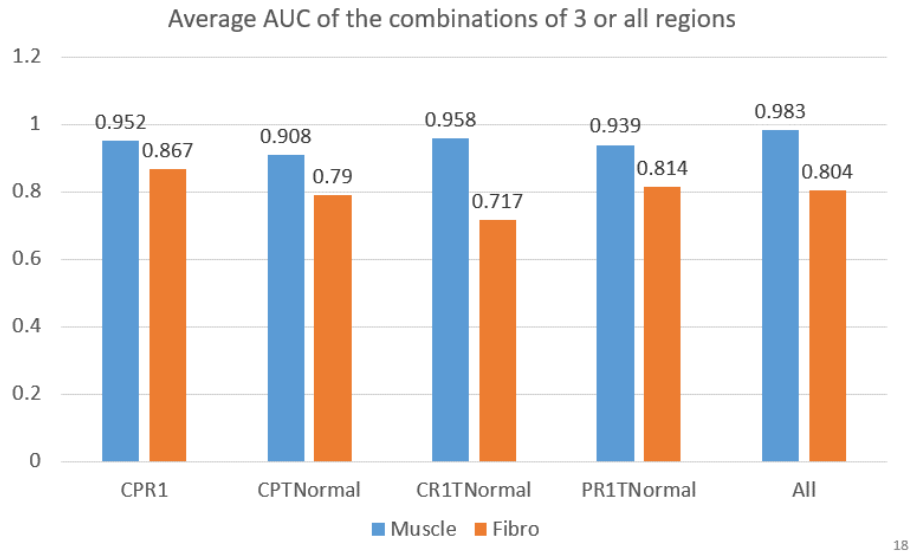


Figure 20 : résultats AUC par cohorte et par combinaison de 3 régions et la cohorte globale

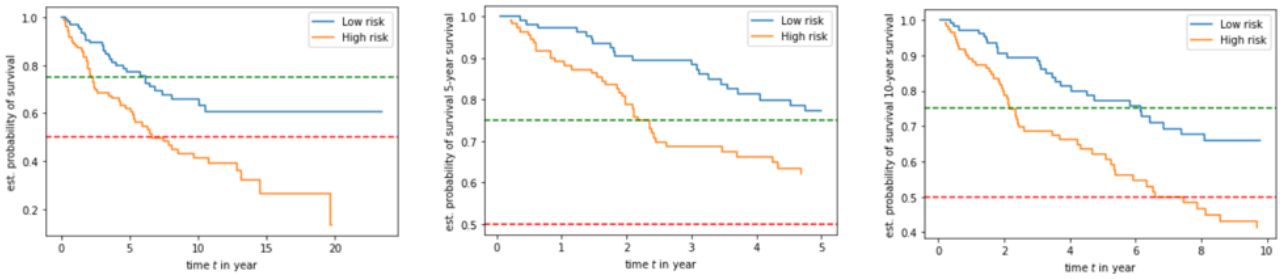
Avant d'aller plus loin, devant le résultat élevé (voir très élevé) du score AUC dans le tissu normal comme facteur de prédiction de la rechute, deux possibilités s'offrent à nous. Soit le

tissu normal (à distance) est presque aussi prédictif que la tumeur, soit il y a quelque chose dans les lames de tissu normal qui n'est pas normal.
Nous sommes donc retournés de principe à l'analyse des lames histologiques de départ et, effectivement 4 cas ont été éliminés du fait de présence potentielle de cellules tumorales dans le tissu sain à distance.

Par la suite, après définition d'un haut risque et d'un bas risque de rechute, le score DL est appliqué sur la cohorte globale pour la survie globale : Figure 21.

C-Index	Current C-Index
Overall Survival	**0,733** (± 0,04)

Survival time	Low risk	High risk
Median	-	6,6
Third quartile	6,15	2,17

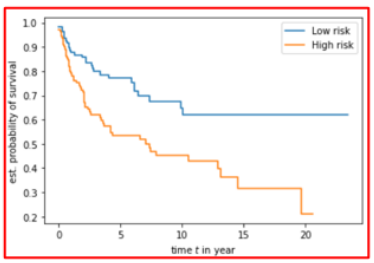


p = 0,0003 Survival in 5 years Survival in 10 years

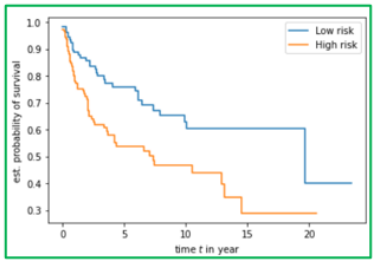
Figure 21 : Survie globale de la cohorte globale

La même méthode est appliquée pour la survie sans métastase. Deux groupes sont identifiés grâce au score DL (Figure 22).

C-Index	Previous C-Index	Current C-Index
Metastasis free survival	0,7037 (± 0,02)	**0,7135** (± 0,03)



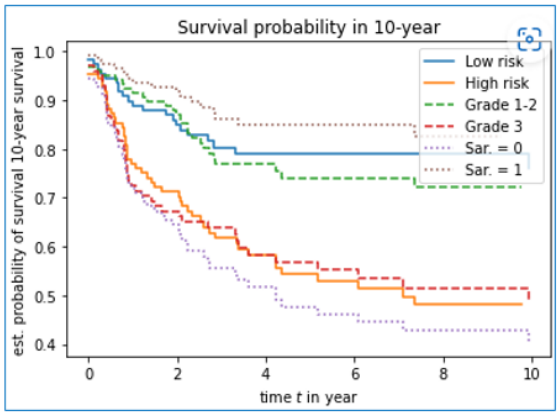
p = 0,00075



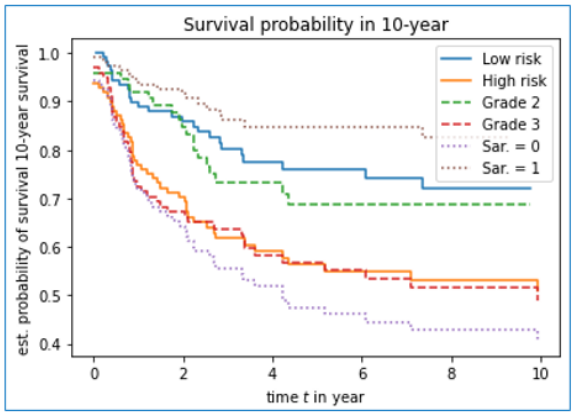
p = 0,0021

figure 22 : survie sans métastase en fonction du socre de Deep learning (DL).

Pour aller plus loin, nous avons souhaité comparer le score prédictif du DL au grade FNCLCC et au Sarculator (nomogramme proposé par Callegaro (Callegaro et al. 2016)) dans notre cohorte de Bergonié.Les résultats obtenus sont notifiés dans la figure 23. Lorsque l'on compare le score du DL bas risque au grade 1 et 2, le grade est un peu moins prédictif que le DL. Le sarculator, lui, qui associe des données cliniques telles que l'âge du patient, la taille tumorale, le grade FNCLCC et le type histologique.



Without clinical features



With clinical features

Figure 23 : comparaison de survie globale pour les bas et hauts risques du DL score, pour le grade FNCLCC et pour le sarculator (normogramme proposé par Callegaro), avec et sans données cliniques associées.

-Sur la cohorte Fibro (barres jaunes) : le C-Index élevé pour le TC, TP et TS (~0,74) avec un score R1 très (0,55). Il convient de noter que les erreurs des trois régions : TC, TP et R1 (> 0,15) sont supérieures au TS(0,12).

- Comparaison : L'utilisation de tous les patients pourrait fournir des résultats stables avec une erreur < 0,1 pour les quatre régions. Diviser les patients en deux cohortes pourrait améliorer les résultats avec les patients musculaires, l'erreur (sur chaque cohorte) est augmentée et plus différente entre les régions. Les figures 3 et 4 montrent les résultats des combinaisons de 2, 3 et de toutes les régions sur trois ensembles de données

Sur tous les patients : Les combinaisons TC/TP/TS pourraient améliorer les scores C-Index, les combinaisons R1 réduisent principalement les scores C-Index. Cependant, les améliorations ne sont pas si nettes, elles ne sont pas si différentes sur les résultats de chaque région (par exemple : Centre = 0,76 et CP = 0,77). De plus, l'ajout des régions fait augmenter l'erreur (valeurs CI).

- Sur la cohorte Muscle : les combinaisons ont amélioré le score C-Index (même combinaison de 2 ou 3 régions), mais les erreurs ont été suivies (augmentent aussi).

- **Sur la cohorte Fibro** : C'est la même situation que dans la cohorte globale, les scores C-Index étaient diminués sur les combinaisons de R1 et l'amélioration sur les autres combinaisons n'était pas nette.

Cependant, l'erreur (IC) sur la cohorte fibro est plus élevée que sur les autres ensembles de données (tous les patients et cohorte musculaire).

- Sur la combinaison de toutes les régions, on voit la différence entre les scores C-Index sur 3 jeux de données, on obtient les scores les plus élevés sur la cohorte Muscle (0,815) que sur la cohorte All patients (0,677) et la cohorte Fibro (0,681).

Conclusion:

- Sur une seule région, le TP fournit le meilleur score sur la cohorte globale.
- Sur la cohorte Muscle, nous avons obtenu le même niveau de résultat pour toutes les régions
-Sur la cohorte Fibro, R1 a fourni le plus mauvais C-Index tandis que TS a un niveau identique à TC et Tp.
- La répartition des patients en deux cohortes donne des résultats contradictoires : les C-Index sont améliorés sur la cohorte Muscle mais pas sur la cohorte Fibro (sauf dans le TS).
- Sur la combinaison de toutes les régions, le **C-Index moyen obtenu à 0,677/ 0,815/ 0,681** pour trois jeux de données **All/ Muscle/ Fibro**, respectivement.

Devant ces résultats, deux possibilités. Soit, nous tenions une information étonnante avec la prédiction du pronostic qui est meilleure dans le tissu sain à distance (C index à 0.8), soit et

c’est ce que nous avons fait, nous avions un problème dans le contenu de ces lames de tissu sain. Nous sommes donc retournés sur les lames et effectivement certains cas douteux (n=6) ont été exclus.

Les premières données intéressantes sont reportées dans le tableau ci-dessous (Table 2).

Table 2 : données de survie globale (OS) survie sans métastase (MFS) et survie sans rechute locale (LRFS) en fonction de la zone Tc : tumeur centrale, Tp : tumeur périphérqiue, R1 : zone saine péritumorale, TS :zone de tissu sain à distance >1cm.

	TC	TP	R1	TNormal
OS	0.6357 (± 0.092)	0.6305 (± 0.048)	0.6050 (± 0.047)	0.6263 (± 0.06)
MFS	0.6263 (± 0.043)	0.718 (± 0.073)	0.644 (± 0.04)	0.5763 (± 0.065)
LRFS	0.5246 (± 0.109)	0.5908 (± 0.109)	0.5896 (± 0.07)	0.5505 (± 0.071)

Table 1 – C-index (± CI) of each task on each studied region

Le score C-index est reporté pour chaque région avec sa marge d’erreur.

Sur une région individuelle

• Sur la cohorte individuelle, les meilleurs scores sont dans le TP

• Sur la cohorte Muscle, il semble que la région Tissus-Normal fournisse un meilleur score AUC que la région R1, c'est l'inverse dans la cohorte Fibro (Tissus-Normal est la zone la moins représentative).

• Comparaison de deux cohortes : La plupart du temps, les scores AUC de Muscle sont meilleurs que l'AUC fourni par Fibro. De plus, les scores d'intervalle de confiance (95 %) du groupe Muscle sont plus petits que les IC de Fibro.

Nous avons relancé les analyses du DL en fonction de la zone sans y associer les annotations cliniques. Le but étant que la technique soit reproductible et indépendante des données qu’on lui donne. C’est à dire que la machine puisse prédire l’évolution de la maladie du patient avec d’autres signes que ceux que nous connaissons habituellement (grade FNCLCC : différenciation, mitose et nécrose).

Facteurs pronostiques

Cette étude exploratoire met en évidence un score pronostique comparatif entre le DL sur les zones tumorales centrales et périphériques, les tissus sains environnants et les tissus sains distants appariés. Ce score DL a été construit sous la forme de haut et de bas risque d'événement et comparé à leurs courbes de survie en particulier la survie sans métastase (MFS) (Figure 24).

Résultats

Nous avons obtenu le meilleur score C-index sur les caractéristiques de la périphérie dans les deux ensembles (IB et IGR). Ces scores ont été réduits lorsque nous avons combiné la périphérie avec d'autres régions, par exemple, le centre des tumeurs (CP) et R1 (PR1). La combinaison de Tp et R1 fournit également un bon score de prédiction à 5 ans comme nous pouvons l'observer dans les figures 21, 22, 23 qui illustrent les courbes de Kaplan-Meier des ensembles de validation IB et IGR avec les caractéristiques Périphérie, CP, PR1. Il est intéressant de noter que nous avons utilisé la médiane de la validation de l'IB comme seuil pour diviser les patients en groupes à risque faible/élevé pour deux ensembles de validation.

Article en cours insérer pdf

Deep learning strategy to assess the prognostic value of the peritumoral tissue of soft tissue sarcomas

Michot Audrey and Le Van-Linh
Coindre Jean-Michel
Sauzeau Maelys , Velasco Valérie
Honoré Charles, N'go Carine, Mesli Nouria
Saut Olivier
Le Loarer François and Crombé Amandine

ABSTRACT

Backgound: Soft tissue sarcomas in adults are rare, aggressive and malignant tumors which evolution is marred with local relapse or metastasis.

Purpose: Our goal was to decipher the specific contribution of the different areas within the tumor bulk, including tumor center, tumor periphery, R0 margin and R1 margin to the local aggressiveness.

Methods: A Deep learning (DL) model was built from these different areas using scanned slides in order to highlight new unknown predictive morphological factors correlated with relapse and to establish a predictive DL signature of relapse

Results: DL based on Tp+R1 had the highest score on survival curves, close but better to the combination of Tc+Tp and Tc+Tp+R1.

Conclusion: DL strategy could assess the prognostic value of STS by integrating the R1 to TP.

KEY WORDS

Deep learning;

Artificial intelligence

Digital pathology

Soft-tissue sarcoma;

Histologic grading;

Prognosis prediction

SUMMARY / TRANSLATIONAL RELEVANCE

ABBREVIATIONS

c-index : concordance index
CI : C index
DL-CP : Deep learning score for center of tumor and periphery of tumor
DC-CPR1 : Deep learning score for centre of tumor+periphery+R1
DL-P : Deep learning score for tumor periphery
DL-PR1 : Deep learning score for tumor periphery+R1
HES: hemalun-eosine-safran
HR: Hazard ratio
LFS: local recurrence free survival
M-RC/LPS: myxoid-round cell liposarcoma
MFS: myxofibrosarcoma
MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumors
OS : overall survival
Pr-DM : probes for distant metastasis
Pr-OS : probes for overall survival
STS : soft tissue sarcoma

INTRODUCTION

Soft tissue sarcoma (STS) of the limbs and trunk wall are the most frequent sarcoma in adults. They are aggressive and have relatively poor prognosis. Prediction of relapse is challenging due to its variety and heterogeneity. Pathologists diagnose and FNCLCC grade are based on tumor criteria (i.e., tumor differentiation, mitotic count and tumor necrosis) and never consider the peritumoral fibrous capsule. In recent years, technological innovations and new image analysis systems have offered new possibility to obtain a predictive assessment of tumor relapse. Deep learning (DL) based on histological slides is increasingly used for survival prediction for patients with sarcoma (RMS, SS). DL could extract complex characteristics or features associated to the tumor but also to the structure of the peritumoral fibrous capsule. These complementary information's associated to the tumor could be better in term of prediction than tumor alone by allowing the integration of additional information not visible or unknown. Surrounding tissues of STS demonstrate various aspects on morphological level but their

relevance to predict the relapse potential is poorly unknown. Four regions will be compared separately and in combination to define the most impactful area or combination for the prognosis and their relationship with survival curves: overall survival (OS), metastasis free survival (MFS) and local recurrence free survival (LRFS). This change of point of view puts the patient's response to their tumor first as a new biomarker necessary to identify patient at high risk of relapse to personalize their follow-up and validate therapeutic complementary modalities.

MATERIAL AND METHODS

1. Study design and patients

This multiple center study was approved by the institutional review boards (IRBs) of Bergonié Institute (Bordeaux, France) and Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), two French sarcoma reference centers. The need for written informed consent was waived by the IRBs because of it retrospective nature.

The study comprised two initial populations. Figure 1 shows the study flow-chart.

The first population included all consecutive patients from Bergonié registered in the BCB sarcoma database (https://conticabase.sarcomabcb.org/connect) between January 1st 1990 and December 1st 2020, as long as the filled the following inclusion criteria: age ≥18 years, newly-diagnosed non-metastatic STS, involving the limbs or the trunk wall, treated in a curative intent in a sarcoma center, and with available tissue sample for HES slide digitalization. Hence, 213 patients were included, who were randomly allocated to one Training cohort (70% [149/213]) and one independent validation cohort (Test-1, 30% [64/213]).

The second population comprised 48 patients from Gustave Roussy and was used as a second independent validation cohort (Test-2). All patients from Test-2 had available digitalized HES slides and filled the same inclusion criteria, between January 1st 1998 and December 1st 2016.

We are fortunate to have all the corresponding clinical data of these cases that we updated in 01/02/2022.

2. Data collection

Clinical data were encoded in the database and were updated on February 2nd, 2022. We extracted the following variables: patients' age at diagnosis, histologic type (categorized as in the Sarculator nomogram) and FNCLCC histologic grade (all reviewed by senior pathologists with expertise in sarcoma), tumor location, depth and size, date of curative surgery, surgical margins, chemotherapy and radiotherapy, date of local relapse, metastatic relapse and death or last follow-up.

We used the SARCULATOR free application to compute the 10-year predicted probability of OS (Pr-OS) and distant metastases (Pr-DM) for each participant (1). Patients were then divided into 3 categories of Pr-OS: Low-Pr-OS (≤51%), Intermediate-Pr-OS (>51% and ≤66%), and high-Pr-OS (>66%) as previously described (2) The corresponding new categorical variable was named Sarculator Groups.

The primary endpoint was the MFS, for which we used the delay (in months) from surgery to last patient's follow-up or metastatic relapse.

3. Development of DL models on various combinations of digitalized tumor tissues

3.1. Image preprocessing

Hematoxylin-and-eosin-stained (HES) slides were reviewed by a senior specialized pathologist to demarcate areas of the tumor bulk, including tumor center (Tc), tumor periphery (Tp), and non-tumoral healthy tissues including R0 margin (at more than 1 cm= HT) and R1 margin (R1). The Figure 2 showed the demarcation of each area reported on whole slide images (WSI). The selection is made on the necessary representation of each zone (If not healthy surrounding tissue, the case was not retained).

HE slides were reviewed by a pathologist and digitized using Hamamatsu Nanozoomer Series scanner at 40-fold magnification. The logiciel TOOLKIT was used for anonymization of each slide.

The model was built by integrating the histological slides scanned in the form of multiples « tiles » and begins the learning phase to allow machine to be reproducible.

We extracted the tiles from the Whole Slide Image (WSI) at the highest magnification level (40×) as we can see in Figure 2. As a preferred size from the deep learning models for image features extraction, the WSI is divided into non-overlapping tiles with a size of 224×224×3 pixels. Based on the fraction of tissue, we have considered the tiles composed of more than 10% of tissue for our analysis. Then, the features of tile has been extracted by using pre-trained model ResNet50 (3) These features were used as the input to a Deep Learning model for generating the risk score for patients.

3.3. Generating DL scores for all patients

In order to provide the DL score for each patient, we have used a Deep Attention-MIL model. This model inputs the extracted features from the WSI and outputs the risk score for the patient. The layers of this model can be decomposed into three groups: the first group consists of the layers before the Attention module. These are used to aggregate the features for each tile as well as compute the score for each tile; the second group is an Attention module (4) which outputs the attention score for each tile. The attention score is combined with the corresponding tile features before passing it to the layers in the last group to estimate the risk score for each patient (Figure 3 cf MICCAI). Then, the risk scores are normalized to a fix range of [-1, 1] to reduce the difference between the output from different datasets. Finally, the normalized risk score is used to split the patients into the high/low-risk group. As mentioned, we had three datasets in our study (Train, Test-1, Test-2). We used the median score of Training set as a cut to split the patients into high/low-risk. This value is applied also to Test-1 and Test-2. The low/high-risk patients were given to the Kaplan-Meier to predict the survial curves.

In order to compare the effect of the areas to the results, we provide the risk scores (DL scores) for each patient based on the considered areas: Periphery, Tc + Tp, Tp + R1, Tc+ Tp +R1, by using the same model that we have described in the previous section. The DL score with normalization are used in our analysis to compare with other variables.

4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R (v4.1.0, The R foundation for Statistical Computing). All tests were two-tailed. A P-value less than 0.05 was deemed significant. Survival analysis was performed with 'survival', 'pec' and 'survminer' packages.

Descriptive statistics. Categorical variables were described in the entire population, and the Train, Test-1 and Test-2 cohorts, as number and percentages, and numeric variables as mean ± standard deviation, or median with range (minimum-maximum) and inter-quartile range (Q1-Q3), as appropriate.

Univariable analyses. The four DL scores were dichotomized according to their median in the Training cohort (categorized as 'high risk' if ≥median in Train, and 'low risk' otherwise). Kaplan-Meier curves for MFS were drawn for the four dichotomized DL-scores and all covariables in the Train, Test-1 and Test-2, and difference in survivals were tested with the log-rank test. Univariable Cox regressions were then fitted (for both continuous and dichotomized DL-scores) and hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CIs) were estimated. Regarding the histologic type, its categorization was simplified as: myxofibrosarcoma, leiomyosarcoma, undifferentiated sarcoma, myxoid-round cells liposarcoma (M-RC/LPS, reference level), other liposarcoma and other STS because of very small effectives in synovial sarcomas, malignant peripheral nerve sheath tumors and vascular sarcoma in Test-1 and Test-2.

In the entire population, correlations between the continuous DL scores and tumor size, Pr-OS and Pr-DM were investigated with the Spearman rank test. Associations between the continuous DL scores and histologic type and grade were investigated using one-way analysis of variance (ANOVA-1) or Friedman rank test depending on Shapiro-Wilk normality test (with post-hoc Tukey or Mann-Whitney tests, as appropriate, corrected with the Benjamini-Hochberg procedure).

Sub-analysis in the grade II subpopulation. The same univariable survival analysis was replicated for the four continuous and dichotomized DL scores in the subgroup of patients with grade II STS.

Multivariable analyses. We designed a similar multivariable setting as for the Sarculator nomogram to investigate the prognostic value of the four DL scores. For each score (continuous or dichotomized) and grade, multivariable Cox regressions including size (continuously), age (continuously), histologic type (categorical with M/RC-LPS as reference) and the score of interest were trained in the Training cohort. Then, the model was applied on Test-1 and Test-2, and its performances in Train, Test-1 and Test-2 cohorts were estimated thanks to the Harrell concordance index (c-index), which ranges from 0 (worst possible) to 1 (perfect model) (5)The Sarculator (which is multivariable by nature) was similarly trained in Train and applied on Test-1 and Test-2 to benchmark the DL-based models. Pairwise c-indices comparisons were achieved using bootstrapping on 1000 replicates ('boot' package). Additionally, we plotted the calibration curves for the scores for all multivariable models (6).

Other survival outcomes. Lastly, the Kaplan-Meier curves for LFS and OS were drawn for the four dichotomized DL-scores in the Train, Test-1 and Test-2, complemented with log-rank tests.

RESULTS

1. Patients' characteristics

Patients' characteristics are given in Table 1. There were 75/149 (50.3%) women in Train, 23/64 (35.9%) women in Test-1, and 16/48 (33.3%) women in Test-2 (P=0.0422, Chi-square test).

Median age was 67 years (Q1-Q3: 52-79) in Train, 52.5 years (Q1-Q3: 37.5-75) in Test-1, and 55 years (Q1-Q3:45.8-68.5) in Test-2 (P=0.0009, ANOVA-1).

Average size was 96.1 ± 57 mm in Train, 96 ± 52.4 mm in Test-1 and 78.1 ± 49.2 mm in Test-2 (P=0.1280, ANOVA-1)

There were 70/149 (47%) patients with grade III STS in Train, 27/64 (42.2%) in Test-1 and 24/48 (50%) (P=0.7800, Chi-square test)

There were 45/149 (30.2%) metastatic relapses in Train (5-year MFS probability: 67.3 months, 95%CI: 59.6 - 76.1), 20/64 (31.3%) in Test-1 (5-year MFS probability: 70.3 months, 95%CI: 59.1 - 83.6), and 11/48 (22.9%) in Test-2 (5-year MFS probability: 74.9 95%CI: 62.9 - 89.2) (Table 2). MFS probabilities were not significantly different depending on the 3 cohorts (P=0.3580, log-rank test).

2. Univariable analyses

All dichotomized DL scores were significantly associated with MFS in Train (all P<0.0001, log-rank tests) and in Test-1 (P=0.0112 for DL-P, P=0.0050 for DL-CP, P<0.0001 for DL-PR1 and DL-CPR1, log-rank tests). In Test-2, dichotomized DL-P and DL-CP were still associated with MFS (P=0.0242 and P=0.0152, log-rank tests) (Table 3, Fig.3). The histologic grade was associated with MFS in Train and Test-2 (P=0.0122 and 0.0089, respectively, log-rank tests), but not in Test-1 (P=0.0712). Univariable analysis for the other covariables is shown in Table 4.

The continuous DL scores were strongly associated with the histologic grade and histologic types (all P-values <0.0001, ANOVA-1), with higher scores in synovial sarcoma, leiomyosarcoma and undifferentiated sarcoma and in grade III tumors (Table 5, Fig.4).

3. Subgroup analysis in the grade II patients

There were 97/261 (37.2%) grade II patients in total with 20 metastatic relapses (54 patients in Train [including 12 metastatic relapses], 24 patients in Test-1 [including 7 metastatic relapses] and 19 patients in Test-2 [including 1 metastatic relapse]). Univariable survival analysis depending on the DL score is given in Table 6, with Kaplan-Meier curve on Fig.5. Whatever the cohort; no difference was captured with dichotomized DL-PR1 and DL-CPR1 scores. Regarding DL-P, significantly lower MFS probability was found in the high risk group in Train and Test-1 (P=0.0014 and 0.0176, respectively, log-rank tests). Regarding DL-CP, similar association was only found in Train (P=0.0038). Only one event occurred in Test-2 and no significant association was found in this cohort.

4. Multivariable analysis

The results for all multivariable modeling with HRs for each input variable are provided in Table 7. All continuous DL-scores were independent predictors for MFS in Train: HR=36.24, 95%CI: 12.21-107.6 (P<0.0001) for DL-P, HR= 26.35, 95%CI: 8.81-78.78 (P<0.0001) for DL-CP, HR= 24.38, 95%CI: 7.79-76.31 (P<0.0001) for DL-PR1, and HR= 30.72, 95%CI: 9.08-103.98 (P<0.0001) for DL-CPR1.

Similarly, all dichotomized DL-scores were independent predictors for MFS with lower survival in the high risk group in Train: HR=19.27, 95%CI: 6.25-59.44 (P<0.0001) for DL-P, HR=8.85, 95%CI: 3.49-22.45 (P<0.0001) for DL-CP, HR=4.72, 95%CI: 2.21-10.06 (P=0.0001) for DL-PR1, and HR=6.54, 95%CI: 2.79-15.3 (P<0.0001) for DL-CPR1.

Regarding the Sarculator groups, intermediate-Pr-OS and low-Pr-OS were associated with lower MFS in Train (HR=3.33, 95%CI: 1.35-8.19, P=0.0090, and HR=6.68, 95%CI: 3.12-14.29, P<0.0001, respectively). However, the histologic grade was not independently associated with MFS in Train (P=0.5692 for grade II, and P=0.1021 for grade III, respectively, with grade I as reference)

Table 8 and Fig.6 show the c-index values and comparisons.

Overall, whatever the continuous or dichotomized nature of the DL-score, their corresponding c-indices were always higher than the c-indices of the Sarculator groups in the three cohorts. These c-indices were also higher than the c-indices of the grade-base model in Train and Test-1. Hence, highest c-index in Train was reached with DL-P taken continuously (c-index=0.868, 95%CI: 0.818-0.918), and in Test-1 for DL-PR1 (c-index=0.809, 95%CI: 0.731-0.886).

In Test-2, higher c-index was found for the grade-base model against continuous DL-based models (c-index=0.724, 95%CI: 0.596-0.851), however, when dichotomized, highest c-index in Test-2 corresponded to DL-CP (c-index=0.754, 95%CI: 0.644-0.865).

Corresponding calibration curves for continuous and dichotomized scores and in the three cohorts are displayed on Fig.7.

5. Other outcomes

5.1. Local relapse free survival

5.2. Overall survival

Discussion

Metastasis and local recurrence risk prediction allows to develop different strategies depending on the risk. For a high risk of metastasis event, we purpose in our center systematically neoadjuvant chemotherapy. For local recurrence risk, we trend to purpose neoadjuvant or adjuvant radiotherapy and for the group least at risk, a therapeutic de-escalation with surgery alone could also be indicated as in well-differentiated liposarcoma of the limbs. To taylor a better support integrating, we need to test new strategies. Here, we have fortunate to used digital pathology and deep learning (DL) for prognosis prediction of STS and to have corresponding clinical data. First, the study of **Foersch** highlight the help of DL to accurately diagnose frequent subtypes of STS from conventional histopathological slides (7) . It might be used for prognosis prediction in LMS, the most prevalent STS subtype in our cohort. It can also help pathologists to make faster and more accurate diagnoses (7). They trained the DL model for the disease-free survival, and they were able to accurately predict the 2-year survival status and the model's outcome as a significant independent prognostic factor, outperforming known risk factors such as high FNCLCC grade or incomplete surgical resection.

Finally, we could predict the expression profile and the clinical evolution of the patient thanks to the detailed global analysis of his tumor and his environment. This study will contribtue to better identify high risk patients by reclassifying intermediate grades and thus improve treatment and surveillance.

This analysis could be enriched and compared to the differential of expression of each zone compared to the others.

CONCLUSION

DL strategy associating TP+R1 was an effective and promising technique in predicting survival of STS, and the ensemble models were superior to the traditional FNCLCC grade and the Sarculator.

Characteristics		All patients (N = 261)	Training Cohort (n = 149)	Testing Cohort 1 (n = 64)	Testing Cohort 2 (n = 48)
Sex					
	Female	114/261 (43.7%)	75/149 (50.3%)	23/64 (35.9%)	16/48 (33.3%)
	Male	147/261 (56.3%)	74/149 (49.7%)	41/64 (64.1%)	32/48 (66.7%)
Age at diagnosis (years)					
	Mean +/- SD	59.5 +/- 19.5	63.4 +/- 18.4	53.5 +/- 21.1	55.4 +/- 18.3
	Median [IQR] (range)	61 [47 - 76] (14 - 94)	67 [52 - 79] (16 - 94)	52.5 [37.5 - 75] (14 - 90)	55 [45.8 - 68.5] (18 - 85)
Tumor Size (mm)					
	Mean +/- SD	92.8 +/- 54.8	96.1 +/- 57	96 +/- 52.4	78.1 +/- 49.2
	Median [IQR] (range)	80 [50 - 120] (10 - 310)	80 [60 - 120] (20 - 310)	82.5 [57.5 - 130] (13 - 275)	75 [38.8 - 100] (10 - 230)
Tumor location					
	Lower limb	159/261 (60.9%)	93/149 (62.4%)	40/64 (62.5%)	26/48 (49.6%)
	Trunk wall	72/261 (27.6%)	43/149 (28.9%)	13/64 (20.3%)	16/48 (25%)
	Upper limb	30/261 (11.5%)	13/149 (8.7%)	11/64 (17.2%)	6/48 (9.4%)
Tumor depth					
	Deep	169/261 (64.8%)	17/149 (11.4%)	4/64 (6.2%)	11/48 (22.9%)
	Superficial	32/261 (12.3%)	97/149 (65.1%)	44/64 (68.8%)	28/48 (58.3%)
	Superficial and deep	60/261 (23%)	35/149 (23.5%)	16/64 (25%)	9/48 (18.8%)
Histologic type					
	Leiomyosarcoma	36/261 (13.8%)	18/149 (12.1%)	9/64 (14.1%)	6/48 (12.5%)
	Liposarcoma	30/261 (11.5%)	17/149 (11.4%)	11/64 (17.2%)	8/48 (16.7%)
	Liposarcoma myxoid	33/261 (12.6%)	19/149 (12.8%)	8/64 (12.5%)	3/48 (6.2%)
	MPNST	7/261 (2.7%)	3/149 (2%)	1/64 (1.6%)	3/48 (6.2%)
	Myxofibrosarcoma	28/261 (10.7%)	19/149 (12.8%)	7/64 (10.9%)	2/48 (4.2%)
	Other	43/261 (16.5%)	24/149 (16.1%)	13/64 (20.3%)	6/48 (12.5%)
	Synovial sarcoma	12/261 (4.6%)	5/149 (3.4%)	6/64 (9.4%)	1/48 (2.1%)
	Undifferentiated sarcoma	70/261 (26.8%)	42/149 (28.2%)	9/64 (14.1%)	19/48 (39.6%)
	Vascular sarcoma	2/261 (0.8%)	2/149 (1.3%)	0/64 (0%)	0/48 (0%)
FNCLCC Grade					
	I	43/261 (16.5%)	25/149 (16.8%)	13/64 (20.3%)	5/48 (10.4%)

	II	97/261 (37.2%)	54/149 (36.2%)	24/64 (37.5%)	19/48 (39.6%)
	III	121/261 (46.4%)	70/149 (47%)	27/64 (42.2%)	24/48 (50%)
Surgical margins					
	R0	158/261 (60.5%)	83/149 (55.7%)	33/64 (51.6%)	42/48 (87.5%)
	R1	103/261 (39.5%)	66/149 (44.3%)	31/64 (48.4%)	6/48 (12.5%)
Chemotherapy					
	No	219/261 (83.9%)	124/149 (83.2%)	52/64 (81.2%)	43/48 (89.6%)
	Yes	42/261 (16.1%)	25/149 (16.8%)	12/64 (18.8%)	5/48 (10.4%)
Radiotherapy					
	No	60/261 (23%)	35/149 (23.5%)	11/64 (17.2%)	14/48 (29.2%)
	Yes	201/261 (77%)	114/149 (76.5%)	53/64 (82.8%)	34/48 (70.8%)
SARCULATOR groups					
	High Pr-OS	149/261 (%)	74/149 (49.7%)	38/64 (59.4%)	37/48 (77.1%)
	Intermediate Pr-OS	43/261 (%)	27/149 (18.1%)	9/64 (14.1%)	7/48 (14.6%)
	Low Pr-OS	69/261 (%)	48/149 (32.2%)	17/64 (26.6%)	4/48 (8.3%)
SARCULATOR 10y OS probability (%)					
	Mean +/- SD	65.3 +/- 24.4	61.6 +/- 25.9	67.5 +/- 22.7	74.9 +/- 18.5
	Median [IQR] (range)	71 [50 - 85] (2 - 98)	65 [42 - 84] (3 - 98)	76 [51 - 86] (6 - 96)	78 [68.5 - 88.2] (2 - 98)
SARCULATOR 10y DM probability (%)					
	Mean +/- SD	29.7 +/- 22	30.4 +/- 19.9	28.4 +/- 18.8	29.1 +/- 30.9
	Median [IQR] (range)	25 [13 - 43] (2 - 200)	26 [13 - 48] (2 - 83)	23.5 [13.8 - 40] (3 - 82)	22 [11 - 37] (3 - 200)

Outcome	Cohort	Number of events	2-year survival probability	5-year survival probability	Median survival time in non-relapsing patients (months)
LFS	Train	25/149 (16.8%)	92.6 (88.3 - 97.1)	82 (74.9 - 89.8)	47.8 [25.3 - 118.2] (1 - 248.5)
		7/64 (10.9%)	95.2 (90.1 - 100)	85.8 (76.2 - 96.5)	48.8 [29.6 - 97.4] (4.4 - 281)
		8/48 (16.7%)	95.7 (90 - 100)	86.6 (77.2 - 97.2)	85.1 [50.6 - 121.1] (12.6 - 217.4)
MFS	Train	45/149 (30.2%)	79.8 (73.4 - 86.6)	67.3 (59.6 - 76.1)	72.5 [31.1 - 139.7] (0.7 - 248.5)
	Test 1	20/64 (31.3%)	82.3 (73.3 - 92.4)	70.3 (59.1 - 83.6)	63 [33.1 - 128.5] (4.4 - 281)
		11/48 (22.9%)	87.4 (78.4 - 97.3)	74.9 (62.9 - 89.2)	79.9 [51.6 - 119.7] (12.6 - 217.4)
OS		61/149 (%)	84.2 (78.4 - 90.3)	70.3 (62.9 - 78.6)	80.2 [34.6 - 142.4] (72.3 - 248.5)
	Test 1	22/64 (%)	88.7 (81.2 - 97)	69.3 (57.5 - 83.5)	62.2 [32.3 - 131] (12.9 - 281)

Characteristics	Deep Learning Scores in the Entire population							
	DL-P		DL-CP		DL-PR1		DL-CPR1	
	Value§	P-value	Value§	P-value	Value§	P-value	Value§	P-value
Categorical variables								
Grade								
I	-0.3793 ± 0.3644	<0.0001***	-0.3585 ± 0.3251	<0.0001***	-0.3784 ± 0.266	<0.0001***	-0.3194 ± 0.2998	<0.0001***
II	-0.168 ± 0.427		-0.1132 ± 0.4321		-0.1709 ± 0.39		-0.1143 ± 0.4056	
III	0.1598 ± 0.3628		0.1839 ± 0.344		0.0499 ± 0.323		0.1523 ± 0.3212	
Histologic types								
Liposarcoma myxoid	-0.4721 ± 0.2915	<0.0001***	-0.4289 ± 0.2924	<0.0001***	-0.4361 ± 0.3118	<0.0001***	-0.3845 ± 0.3015	<0.0001***
Leiomyosarcoma	0.1225 ± 0.4299		0.2583 ± 0.3466		-0.0034 ± 0.3352		0.1579 ± 0.3224	
Liposarcoma	-0.0796 ± 0.43		-0.1055 ± 0.3605		-0.1411 ± 0.3251		-0.0764 ± 0.3887	
Malignant peripheral nerve sheath tumour	-0.1082 ± 0.2217		-0.0899 ± 0.2266		-0.1316 ± 0.2889		-0.0937 ± 0.2251	
Myxofibrosarcoma	-0.0863 ± 0.4728		-0.0748 ± 0.4572		-0.1302 ± 0.3072		-0.0455 ± 0.3877	
Other	-0.0045 ± 0.4914		-0.0287 ± 0.5193		-0.0504 ± 0.4687		-0.0088 ± 0.4961	
Synovial sarcoma	0.259 ± 0.2087		0.2598 ± 0.2677		0.0537 ± 0.2518		0.1507 ± 0.2706	
Undifferentiated sarcoma	0.0133 ± 0.3771		0.0794 ± 0.339		-0.0171 ± 0.3377		0.0606 ± 0.312	
Vascular sarcoma	-0.1961 ± 0.5496		-0.4228 ± 0.2169		-0.3927 ± 0.701		-0.4225 ± 0.5453	

Continuous variables												
Size	0.020	(-0.111; 0.15)	0.7518	-0.045	(-0.176; 0.076)	0.46888	0.01	(-0.107; 0.139)	0.8772	-0.001	(-0.116; 0.123)	0.9856
Sarculator Pr-OS	-0.323	(-0.431; -0.202)	<0.0001 ***	-0.283	(-0.402; -0.156)	<0.0001 ***	-0.297	(-0.405; -0.187)	<0.0001 ***	-0.315	(-0.422; -0.197)	<0.0001 ***
Sarculator Pr-DM	0.365	(0.244; 0.474)	<0.0001 ***	0.355	(0.252; 0.465)	<0.0001 ***	0.348	(0.233; 0.448)	<0.0001 ***	0.364	(0.250; 0.472)	<0.0001 ***

Table 5

Model	Cohort		No. At risk	No. Of events	MFS probability at 2y	MFS probability at 5y	Log rank P-value	HR (95%CI)	Cox P-value
	All patients								
		LR (reference)	52	4	95.83 (90.34 - 100)	91.04 (83.01 - 99.85)	0.0004***	-	-
		HR	45	16	83.47 (72.99 - 95.46)	58.06 (43.86 - 76.87)		5.77 (1.93 - 17.27)	0.0017**
P			-	-	-	-	-	4.88 (1.86 - 12.83)	0.0013**
	Train								
		LR (reference)	31	2	96.3 (89.43 - 100)	91.71 (81.27 - 100)	0.0014**	-	-
		HR	23	10	81.57 (66.76 - 99.66)	50.47 (32.57 - 78.22)		8.04 (1.76 - 36.71)	0.0072**
			-	-	-	-	-	132.09 (8.22 - 2122.89)	0.0006***

	Test 1									
			LR (reference)	11	1	90.91 (75.41 - 100)	90.91 (75.41 - 100)	0.0176*	-	-
			HR	13	6	73.33 (51.48 - 100)	27.5 (6.23 - 100)		8.92 (1.04 - 76.34)	0.0458*
				-	-	-	-	-	12.92 (1.14 - 145.91)	0.0386*
	Test 2									
			LR (reference)	10	1	100 (100 - 100)	90 (73.2 - 100)	0.3428	-	-
			HR	9	0	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)		0 (0 - Inf)	0.9996
				-	-	-	-	-	0.45 (0.01 - 28.46)	0.7065
	All patients	DL-CP (bin.)								
			LR (reference)	53	5	93.87 (87.37 - 100)	89.33 (80.89 - 98.66)	0.0024**	-	-
			HR	44	15	85.86 (75.98 - 97.02)	59.55 (45.16 - 78.53)		4.24 (1.54 - 11.68)	0.0052*
CP				-	-	-	-	-	2.91 (1.09 - 7.78)	0.0328*
	Train	DL-CP (bin.)								

		LR (reference)	33	3	96.43 (89.79 - 100)	88.36 (76.77 - 100)	0.0038**	-	-
		HR	21	9	80.67 (65.31 - 99.64)	51.22 (32.47 - 80.79)		5.55 (1.5 - 20.53)	0.0102*
			-	-	-	-	-	44.6 (4.11 - 484.43)	0.0018*
Test 1	DL-CP (bin.)								
		LR (reference)	12	2	83.33 (64.7 - 100)	83.33 (64.7 - 100)	0.0949	-	-
		HR	12	5	80.81 (60.04 - 100)	30.3 (6.95 - 100)		3.78 (0.71 - 20.01)	0.1181
			-	-	-	-	-	5.9 (0.75 - 46.09)	0.0907
Test 2	DL-CP (bin.)								
		LR (reference)	8	0	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	0.3938	-	-
		HR	11	1	100 (100 - 100)	90.91 (75.41 - 100)		1219290603.24 (0 - Inf)	0.9996
			-	-	-	-	-	0.59 (0.01 - 27.19)	0.7891
PR1	All patients								

				92.25 (85.23 - 99.85)		77.76 (66.29 - 91.22)			
	LR (reference)	54	10				0.5252	-	-
				87.6 (77.99 - 98.4)		73.32 (60.22 - 89.26)			
	HR	43	10					1.33 (0.55 - 3.19)	0.5266
		-	-	-		-	-	1.61 (0.56 - 4.64)	0.3772
Train									
				93.05 (84.18 - 100)		79.69 (65.08 - 97.58)			
	LR (reference)	31	5				0.2594	-	-
				86.12 (72.7 - 100)		65.02 (46.93 - 90.07)			
	HR	23	7					1.91 (0.61 - 6.04)	0.2677
								11.69 (1.43 -	
		-	-	-		-	-	95.76)	0.0219*
Test 1									
				87.5 (72.71 - 100)		69.64 (47.47 - 100)			
	LR (reference)	16	4				0.1949	-	-
				68.57 (40.26 - 100)		51.43 (23.65 - 100)			
	HR	8	3					2.61 (0.58 - 11.75)	0.2116
		-	-	-		-	-	3.92 (0.32 - 48.37)	0.2861
Test 2									

						85.71 (63.34 -			
		LR (reference)	7	1	100 (100 - 100)	100)	0.1904	-	-
		HR	12	0	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)		0 (0 - Inf)	0.9996
			-	-	-	-	-	0.01 (0 - 88.94)	0.3111
	All patients								
					92.25 (85.23 -	85.23 (75.62 -			
		LR (reference)	55	7	99.85)	96.07)	0.0400*	-	-
					87.6 (77.99 -	65 (51.11 -			
		HR	42	13	98.4)	82.66)		2.53 (1.01 - 6.35)	0.0475*
CPR1			-	-	-	-	-	2.7 (0.94 - 7.73)	0.0642
	Train								
					93.29 (84.69 -	84.77 (71.91 -			
		LR (reference)	33	4	100)	99.92)	0.0539	-	-
					85.45 (71.49 -	58.75 (40.36 -			
		HR	21	8	100)	85.51)		3.07 (0.92 - 10.21)	0.0671
								28.41 (2.36 -	
			-	-	-	-	-	341.82)	0.0084*
	Test 1								

					84.62 (67.11 -	84.62 (67.11 -			
		LR (reference)	13	2	100)	100)	0.0678	-	-
					78.75 (56.41 -				
		HR	11	5	100)	37.5 (14 - 100)		4.1 (0.79 - 21.21)	0.0921
			-	-	-	-	-	3.33 (0.42 - 26.48)	0.2559
	Test 2								
						88.89 (70.56 -			
		LR (reference)	9	1	100 (100 - 100)	100)	0.2918	-	-
		HR	10	0	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)		0 (0 - Inf)	0.9996
			-	-	-	-	-	0.18 (0 - 13.51)	0.4364
	All patients	Sarculator groups							
		High Pr-OS (reference)	67	7	96.97 (92.92 - 100)	88.47 (80.76 - 96.91)	<0.0001**	-	-
		Intermediate Pr-OS	18	6	79.91 (61.78 - 100)	58.12 (37.28 - 90.62)		4.51 (1.51 - 13.49)	0.0071**
Sarculator		Low Pr-OS	12	7	63.64 (40.71 - 99.47)	26.52 (8.52 - 82.48)		8.27 (2.89 - 23.66)	0.0001**

Train	Sarculator groups								
		High Pr-OS (reference)	35	4	94.12 (86.53 - 100)	86.88 (75.59 - 99.85)	0.0175*	-	-
		Intermediate Pr-OS	13	5	80 (58.68 - 100)	50 (26.9 - 92.93)		4.9 (1.3 - 18.53)	0.0191*
		Low Pr-OS	6	3	83.33 (58.27 - 100)	31.25 (6.71 - 100)		4.9 (1.09 - 21.97)	0.0378*
Test 1	Sarculator groups								
		High Pr-OS (reference)	14	2	100 (100 - 100)	85.71 (69.21 - 100)	0.0211*	-	-
		Intermediate Pr-OS	4	1	75 (42.59 - 100)	75 (42.59 - 100)		2.71 (0.24 - 30.41)	0.419
		Low Pr-OS	6	4	40 (13.67 - 100)	20 (3.46 - 100)		8.06 (1.44 - 45.1)	0.0175*
Test 2	Sarculator groups								
		High Pr-OS (reference)	18	1	100 (100 - 100)	94.44 (84.33 - 100)	0.8137	-	-

Intermediate Pr-OS	1	0	100 (100 - 100)	100 (100 - 100)	0 (0 - Inf)	0.9996
Low Pr-OS	0	0	-	-	-	-

Table 6

Grade	Predictor	c-index	DL-P (cont.)	DL-CP (cont.)	DL-PR1 (cont.)	DL-CPR1 (cont.)	Grade	Sarculator
Train	DL-P (cont.)	0.868 (0.818 - 0.918)	-	0.0120*	0.0190*	0.042	0.0010**	0.0010**
	DL-CP (cont.)	0.830 (0.772 - 0.889)	-	-	0.4446	0.4505	0.0020**	0.0010**
	DL-PR1 (cont.)	0.833 (0.778 - 0.888)	-	-	-	0.4895	0.0010**	0.0010**
	DL-CPR1 (cont.)	0.831 (0.77 - 0.892)	-	-	-	-	0.0020**	0.0010**
	Grade	0.760 (0.691 - 0.829)	-	-	-	-	-	0.0390*

		0.718	(0.647	-					
	Sarculator	0.788)		-	-	-	-	-	-
		0.766	(0.671	-					
Test-1	DL-P (cont.)	0.861)		-	0.4506	0.1588	0.1528	0.1988	0.0490*
		0.767	(0.675	-					
	DL-CP (cont.)	0.859)		-	-	0.1229	0.0809	0.1838	0.0480*
		0.809	(0.731	-					
	DL-PR1 (cont.)	0.886)		-	-	-	0.4036	0.0340*	0.0040**
	DL-CPR1	0.804	(0.723	-					
	(cont.)	0.886)		-	-	-	-	0.0569	0.010*
	Grade	0.721 (0.6 - 0.842)		-	-	-	-	-	0.1289
		0.658	(0.549	-					
	Sarculator	0.766)		-	-	-	-	-	-
		0.691	(0.578	-					
Test-2	DL-P (cont.)	0.804)		-	0.3556	0.3047	0.2727	0.2967	0.1269
		0.712	(0.593	-					
	DL-CP (cont.)	0.831)		-	-	0.2168	0.0440*	0.4456	0.1169
		0.660	(0.540	-					
	DL-PR1 (cont.)	0.781)		-	-	-	0.4156	0.2308	0.2787

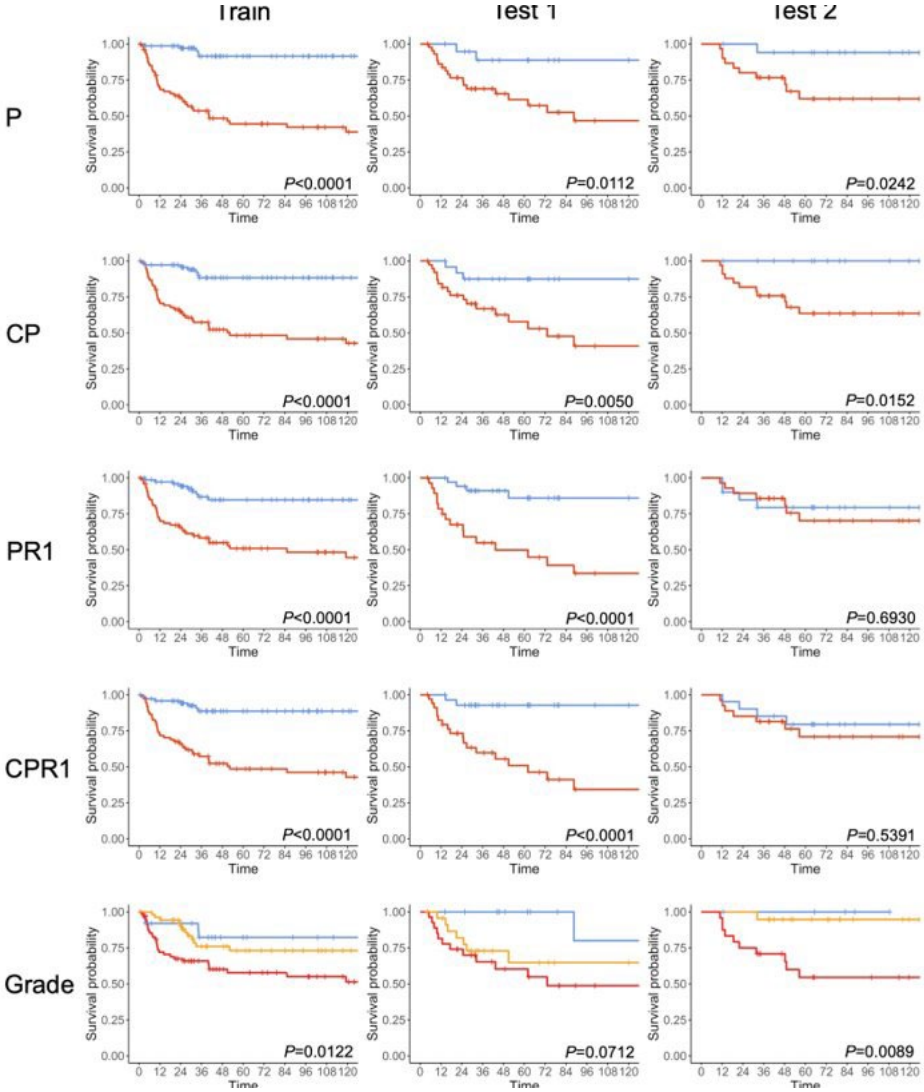
	DL-CPR1 (cont.)	0.653 (0.532 - 0.775)		-	-	-	-	0.2078	0.2967
	Grade	0.724 (0.596 - 0.851)		-	-	-	-	-	0.0609
	Sarculator	0.602 (0.465 - 0.738)		-	-	-	-	-	-

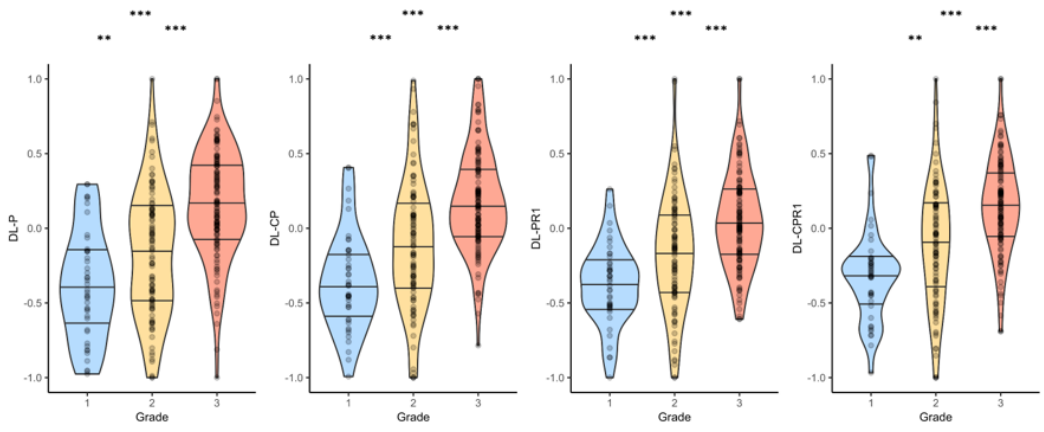
Grade	Predictor	c-index	DL-P (bin.)	DL-CP (bin.)	DL-PR1 (bin.)	DL-CPR1 (bin.)	Grade	Sarculator
Train	DL-P (bin.)	0.841 (0.791 - 0.892)	-	0.0659	0.0120*	0.0160*	0.0020**	0.0010**
	DL-CP (bin.)	0.81 (0.748 - 0.872)	-	-	0.1898	0.2168	0.0110*	0.0010**
	DL-PR1 (bin.)	0.792 (0.726 - 0.858)	-	-	-	0.3297	0.0639	0.0070*
	DL-CPR1 (bin.)	0.798 (0.73 - 0.867)	-	-	-	-	0.0230*	0.0040**
	Grade	0.760 (0.691 - 0.829)	-	-	-	-	-	0.0390*
	Sarculator	0.718 (0.647 - 0.788)	-	-	-	-	-	-

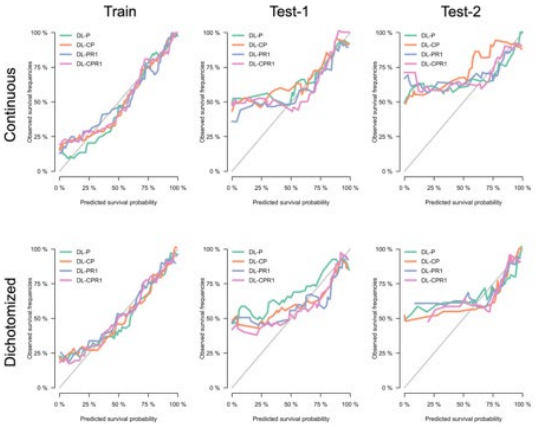
Test-1	DL-P (bin.)	0.725 (0.62 - 0.831)	-	0.4026	0.1319	0.0769	0.4436	0.1149
	DL-CP (bin.)	0.737 (0.626 - 0.849)	-	-	0.1768	0.0529	0.3536	0.1129
	DL-PR1 (bin.)	0.778 (0.681 - 0.874)	-	-	-	0.4276	0.0879	0.0060*
	DL-CPR1 (bin.)	0.782 (0.687 - 0.877)	-	-	-	-	0.0490*	0.0050*
	Grade	0.721 (0.6 - 0.842)	-	-	-	-	-	0.1289
	Sarculator	0.658 (0.549 - 0.766)	-	-	-	-	-	-
Test-2	DL-P (bin.)	0.703 (0.568 - 0.837)	-	0.1209	0.2737	0.3387	0.3257	0.1069
	DL-CP (bin.)	0.754 (0.644 - 0.865)	-	-	0.0529	0.0809	0.2088	0.0340*
	DL-PR1 (bin.)	0.646 (0.512 - 0.781)	-	-	-	0.4166	0.1469	0.3177
	DL-CPR1 (bin.)	0.667 (0.541 - 0.793)	-	-	-	-	0.2128	0.2178

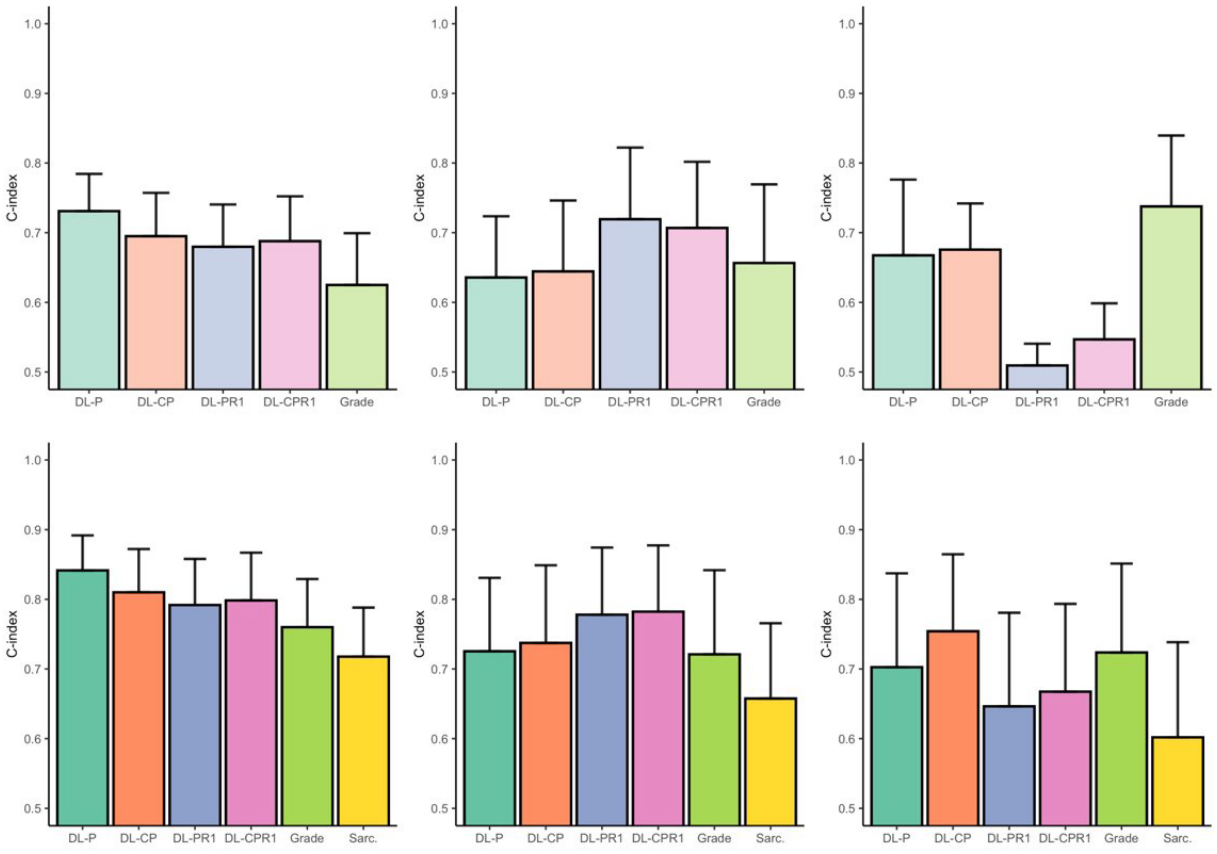
		0.724	(0.596	-					
	Grade	0.851)		-	-	-	-	-	0.0609
		0.602	(0.465	-					
	Sarculator	0.738)		-	-	-	-	-	-

Table 7


Train
Test 1
Test 2
P
CP
PR1
CPR1
Grade
Survival probability
Time
P<0.0001
P=0.0112
P=0.0242
P<0.0001
P=0.0050
P=0.0152
P<0.0001
P<0.0001
P=0.6930
P<0.0001
P<0.0001
P=0.5391
P=0.0122
P=0.0712
P=0.0089


DL-P
DL-CP
DL-PR1
DL-CPR1
Grade


Train
Test-1
Test-2
Continuous
Dichotomized
DL-P
DL-CP
DL-PR1
DL-CPR1
Predicted survival probability


C-index
DL-P
DL-CP
DL-PR1
DL-CPR1
Grade
Sarc.

Problématique évoquée : La cohorte de l'IGR utilisée fonctionne de manière différente par rapport aux cohortes d'entrainement de Bergonié. De plus il n'y pas d'événement métastatique dans le groupe grade 2. Le FNCLCC grade est meilleur que le DL score dans cette cohorte. Afin de pouvoir conclure et d'obtenir un travail de qualité, nous avons donc contacté l'IGR pour agrandir la cohorte recueillie.

Partie 3 : Identification de biomarqueur prédictif de rechute

Les analyses moléculaires semblent prometteuses pour identifier des biomarqueurs pronostiques comme le suggère le genomic index et la signature CINSARC (Croce et Chibon 2021; Chibon et al. 2010). En effet le grade FNCLCC ne peut être appliqué sur certains sous types de sarcomes comme les léiomyosarcomes utérins. Or le pronostic du LMS est sombre et nécessite une identification certaine et aussi le diagnostic des tumeurs musculaires lisses à potentiel incertain (STUMP) doivent pourvoir être différenciées des léiomyomes qui eux sont bénins. Dans cette situation, l'analyse génomique de ces différentes tumeurs va permettre de ranger les tumeurs utérines à potentiel malin incertain par l'évaluation de l'index génomique par CGH array, en comptabilisant le nombre d'anomalies génomiques de la tumeur. La CGH va permettre de distinguer les tumeurs à risque de récidive comme les léiomyosarcomes des tumeurs bénignes comme les léiomyomes. Par la suite, la signature transcriptomique CINSARC a été testée pour les STUMP et les LMS et montre alors à nouveau une meilleure corrélation avec la survie et la récidive que le grade FNCLCC. L'index génomique et la signature CINSARC contribueront à améliorer les diagnostics, les stratégies thérapeutiques et la randomisation dans les futurs essais cliniques (Croce et Chibon 2021). Si l'on pousse le raisonnement plus loin, la compréhension des mécanismes biologiques en lien avec l'index génomique et la signature CINSARC et même le grade devraient nous conduire à la compréhension du mécanisme de rechute , en particulier métastatique.

Cette signature moléculaire a par ailleurs été transposée en RNA seq et semble reproductible avec cette technique qui plus est applicable sr de nombreux types de cancers différents (Lesluyes et al. 2019).

Nous avons donc souhaité analyser notre cohorte par whole RNA sequencing en évaluant à nouveau chacune des régions sélectionnées. Le but étant de définir ou de rechercher une signature transcriptomique prédictive de la rechute locale et de comparer également le centre et la périphérie de la tumeur afin d'identifier certains facteurs responsable de l'hétérogénéité tumorale.

Vers une signature moléculaire

Cet axe de travail s'oriente vers l'analyse moléculaire et en particulier transcriptomique par *whole RNA-sequencing* . Plusieurs zones d'intérêt sélectionnées issues d'un même cas vont être analysées comme ce qui suit (Figures 1,2 et 3) :

La zone tumorale centrale (Tc) et le tissu tumoral périphérique (Tp),

Le tissu péritumoral sain au contact (TS-R1) = zone frontière et le tissu sain à distance (TS).

Cette étude va permettre d'identifier des biomarqueurs dérégulés de façon différentielle dans les différentes zones et de déterminer les signatures immunologiques entre les différents territoires. Des gènes d'intérêt vont être mis en évidence dans la zone marginale pouvant être associé au risque de rechute.

Enfin une analyse spatiale transcriptomique par technique *Visium* va nous permettre d'observer quelques cas de façon complémentaire. Cette technique innovante qui se rapproche de la technique « *single cell* » permet l'analyse fine de groupements cellulaires spécifiques et de leur expression. Celle-ci va nous permettre également d'identifier des sous-groupes au sein des sarcomes indifférenciés avant traitement et d'explorer leur environnement et leur zone réactive de tissu sain péritumoral. La « transcriptomique spatiale » est une analyse d'expression des gènes couplée à une localisation de cette expression au sein d'un tissu. Cette analyse pourra également être suivie d'une analyse transcriptomique à haut débit sur quatre échantillons bien limités et quatre échantillons mal limités et spatiale au niveau de leur zone transitionnelle en fonction de la signature Fridman (Petitprez et al. 2020).

Déroulement de la recherche : Matériel et méthodes

a. Recueil des pièces tumorales et sélection de la cohorte de travail

La cohorte de ce travail rétrospectif a été issue des données de la Conticabase, base de données nationales du groupe sarcome (https://conticabase.sarcomabcb.org) . Nous avons choisi d'étudier les patients non métastatiques pris en charge de façon chirurgicale à l'Institut Bergonié depuis le 01.01.2009, date à partir de laquelle le moyen de conservation des prélèvements était le formol (Tableau 3). Il s'agit de patients adultes, atteints de sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc sans traitement au préalable. Ont été exclus les cas ayant reçu une chimiothérapie ou une radiothérapie première, les chirurgies hors

centre ou les sarcomes en territoire irradiés. De même, les sarcomes intra-tronculaires ou les reprises chirurgicales avec chirurgie initiale hors centre ont été exclus.

Tableau 3 : *Flowchart*

749 listes de numéro de dossiers issus de la Conticabase
- 340 prises en charge en dehors du réseau
- 9 chirurgies extérieures
- 27 avec traitement néoadjuvant
- 29 sarcomes en territoire irradié
- 24 sans matériel utilisable suffisant
= 144 sarcomes des tissus mous

144 patients x 4 zones = 576 zones analysées. En effet l'adjonction d'une chimiothérapie systémique ou d'une radiothérapie sur la zone d'intérêt doit irrémédiablement modifier l'environnement de la tumeur (au niveau de la tumeur et du tissu sain). Tous ces cas ont donc été exclus.

b. Critères d'inclusion et de non-inclusion

1. Patients atteints de sarcomes des tissus mous des membres et de la paroi du tronc de type adulte.
2. Tout type histologique de sarcome.
3. Patients non métastatiques.
4. Patients sans traitement au préalable.
5. Patients inclus dans la CONTICABASE, base de données nationales du groupe sarcome.
6. Prise en charge de façon chirurgicale à l'Institut Bergonié depuis le 01.01.2009, date à partir de laquelle le moyen de conservation des prélèvements était le formol.

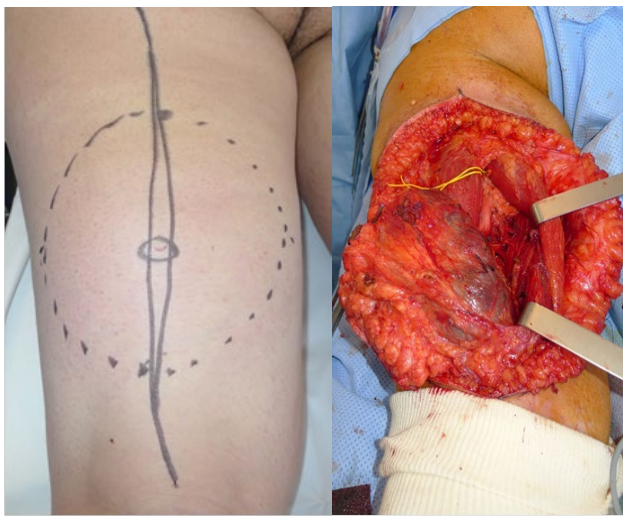
Critères de non-inclusion

1. Chimiothérapie ou une radiothérapie première
2. Chirurgie hors centre Bergonié
3. Sarcomes en territoire irradiés.
4. Sarcomes intra-tronculaires.
5. Reprises chirurgicales ne présentant pas de résidu tumoral macroscopique.
6. Pathologies reclassées en tumeur à malignité intermédiaire selon WHO 2023.

c. Protocole de recueil anatomo-pathologique

Afin de pouvoir travailler sur les différentes zones d'intérêt des pièces opératoires, une relecture de tous les cas identifiés ci-dessus a été réalisée par des anatomopathologistes séniors à l'Institut Bergonié afin de s'assurer du diagnostic et vérifier la présence sur les lames et dans les blocs de tissu tumoral et de tissu sain au contact de la tumeur et à de tissu sain à distance. Les cas ne présentant pas ces caractéristiques ont été exclus. Les lames d'intérêt

pour chaque patient ont été retenues puis ont été contourées pour permettre l'extraction des différentes zones et bénéficieront ainsi d'une analyse transcriptomique à haut débit.



Figures 24 et 25 : Dessin préopératoire. Exérèse de la pièce.

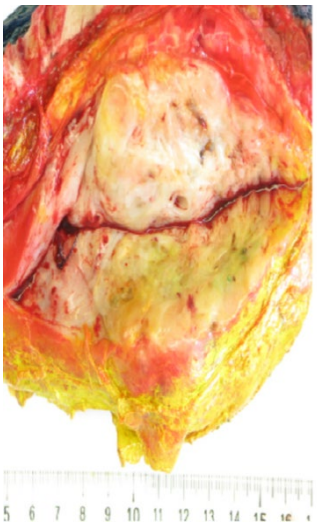


Figure 26 : Coupe transversale d'une tumeur avec visualisation de la zone tumorale centrale, périphérique, le tissu sain péritumoral et à distance.

d. Caractérisation du profil transcriptomique

Extraction d'ARN à partir de bloc paraffine FFPE avec l'extracteur d'acides nucléiques Maxwell® RSC utilisé en Pathologie Moléculaire (Promega)

Des lames HES correspondant aux blocs des 144 tumeurs et tissus sains ont été réalisées. Sur le bloc de paraffine la zone de tissu a été cerclée (zones d'intérêt) par le pathologiste sénior, et, sur la lame HES correspondante, le bloc a été ponctionné. La méthode

de prélèvement du tissu sur le bloc est le forage par punch pour les pièces opératoires. La quantité de matériel prélevée sur le bloc est fonction de la **densité cellulaire** du prélèvement (dépendant du type de tissu), de la surface et de l'épaisseur de la zone cerclée. Afin d'être conforme à l'identitovigilance, chaque étape vérifie la concordance du numéro d'identification SIL entre la feuille de demande d'examen, la lame HES cerclée, le bloc ainsi que le tube dans lequel sera placé le matériel à déparaffiner.

Comme il y a plusieurs blocs pour un même patient, le numéro spécifique du bloc utilisé a été répertorié sur les feuilles de traçabilité.

Dans le cas d'un prélèvement qui n'est pas entièrement tumoral (zones de nécrose à exclure), le pathologiste cercle sur la lame HES correspondante au bloc, une zone présentant une proportion importante de cellules tumorales.

A l'aide de l'HES cerclé, la zone d'intérêt est reportée sur le bloc de paraffine et des carottes sont prélevées à l'aide d'un punch stérile à usage unique. Le nombre de carottes prélevées sera d'autant plus important si la densité cellulaire est faible et/ou si le prélèvement a une faible épaisseur dans le bloc de paraffine :

- tissu dont la densité cellulaire est moyenne à forte : prélever 4 carottes
- tissu à densité cellulaire faible et/ou faible épaisseur de tissu dans la carotte : prélever 6 à 8 carottes.

Puis les carottes sont placées dans un tube à vis de 2ml identifié par le numéro SIL du patient. Certaines étapes de purifications ont lieu ensuite.

Contrôle de la quantité et de la qualité de l'ARN :

Les ARN seront ensuite quantifiés au Nanodrop (cf ADN) et passés sur puce bioanalyser RNA nano Kit.

Séquençage haut débit ARN par True seq RNA Exome (Illumina)

extrait du manuel du fabriquant : figure 27

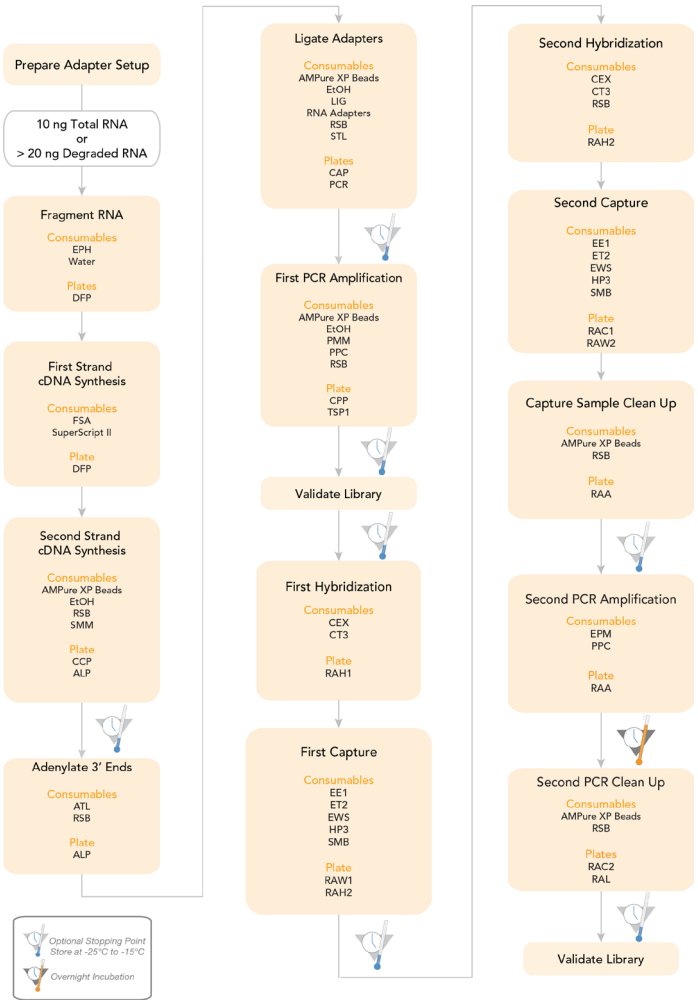


Figure 27 : résumé des différentes étapes réalisées pour le whole RNA sequençage.

Actuellement la FISH et la RT-PCR sont les techniques de biologie moléculaire utilisées en routine du fait de leur facilité d'accès. Néanmoins il arrive que le diagnostic reste incertain et/ou ne permette pas d'identifier des anomalies moléculaires inconnues ou non suspectées ou même des variations de l'anomalie suspectée (exemple : implication d'un exon inhabituel ou rétention d'une séquence intronique). L'avènement du séquençage de nouvelle génération (RNA-sequencing) permet de rechercher de façon simultanée des centaines de transcrits de fusion, permettant ainsi une plus grande exhaustivité de *screening moléculaire* pour l'anomalie envisagée mais aussi pour des anomalies non anticipées.

Le *RNA-sequencing* ou RNA-seq permet l'étude simultanée de l'ensemble du transcriptome, c'est à dire de l'ensemble des ARNs présents dans une cellule à un moment donné. Le transcriptome est donc le reflet de l'expression des gènes. Il existe deux types de RNA-seq : le RNA-seq ciblé (*targeted*), détectant les anomalies d'un panel de gènes connus et

prédéfinis et, le RNA-seq non ciblé, global, *(whole*) qui permet d'identifier des transcrits de fusion sans avoir besoin de connaître les partenaires ni la localisation des points de cassure. Cette méthode sera utilisée. Le principe du RNA-seq non ciblé est d'obtenir à partir des fragments d'ARN des brins d'ADNc (ADN complémentaire) qui vont ensuite être amplifiés et séquencés.

La première étape repose sur la constitution de la **librairie**. L'ARN va être transformé en ADNc double brin et ensuite être fragmenté en segments de taille fixe (de 100 à 500 paires de bases). Par la suite, des adaptateurs vont être ajoutés aux extrémités de chaque brin pour permettre leur identification. Les brins d'ADN double brin ainsi obtenus vont pouvoir être amplifiés par PCR.

La deuxième étape est **l'amplification par clusters** : chaque brin d'ADNc va pouvoir être fixé sur un support (puce ou bille) avant d'être amplifié par PCR pour permettre d'obtenir des signaux détectables. Chaque brin pourra être séquencé. La technique Illumina utilisée se base sur une PCR avec utilisation de 4 terminateurs réversibles marqués à chaque cycle. A l'aide d'un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est mesurée lors de chaque cycle. Cette fluorescence va permettre l'identification au fil du séquençage de la base incorporée. Entre deux cycles les terminateurs sont supprimés et lavés et de nouveaux terminateurs réversibles marqués sont ajoutés afin de répéter l'opération jusqu'à ce que le séquençage du fragment soit terminé. La lecture est donc effectuée à chaque position sur toutes les séquences en parallèle.

Cette technique a pour avantage de ne pas être restreinte par un panel de transcrits déjà connus et prédéfinis à l'avance. Elle permet de façon exploratoire, d'avoir la possibilité d'identifier de nouveaux transcrits de fusion avec des partenaires de fusion moins fréquents ou des points de cassure inhabituels tout au moins dans les prélèvements tumoraux.

L'objectif principal de cette analyse vise la mise en évidence d'un groupe de patients dont l'expression du tissu sain péritumoral serait corrélée à une évolution clinique de rechute plus péjorative. Cette population particulière pourrait alors bénéficier d'un suivi particulier voir d'une stratégie chirurgicale différente probablement plus agressive d'emblée.

Analyse des données et Bio-informatique

L'analyse bioinformatique va permettre la réalisation d'une analyse non supervisée de type clustering appariée pour chaque patient. Cette analyse globale va permettre tout d'abord de réaliser un contrôle qualité et de vérifier bien que les échantillons tumoraux « *clusterisent* » ensemble et les échantillons sains, dont ceux de la capsule péritumorale saine, sont bien ensemble. Nous cherchons ainsi à donner une identité au tissu péritumoral qui jusque-là était considérée par défaut comme du tissu sain normal. L'analyse du tissu péritumoral pourrait permettre la classification en deux groupes, un qui serait plus à risque de récidive car plus proche du tissu tumoral (et ce même au niveau du tissu sain plus à distance) et un groupe à faible risque qui se rapprocherait plus volontiers à du tissu sain avec des profils cliniques distincts. L'analyse anatomopathologique du tissu péritumoral sain identifie deux types de patients, un avec tumeur bien limitée et un avec tumeur plus infiltrante. Une corrélation entre récidive tumorale et modification de profil transcriptomique pourrait permettre l'identification d'un groupe à risque comme cela a été montré dans le CHC dans l'étude d'Hoshida (Hoshida et al. 2008).

Insérer pdf

Impact of transcriptional variations in the STS: from tumor to healthy surrounding tissue

Molecular signature of non-tumoral healthy tissue as a major prognostic factor in STS

Audrey Michot
Jessica Baud
Rihab Azmani
Larry Blanchard
Julie Sentis
Isabelle Hostein
Aurélien Bourdon
Florent Dumont
Mariella Spalato

Jean-Michel Coindre
François Le Loarer

Abstract

Background

Purpose

Results

Discussion

Conclusion

Keywords

Transcriptomic

Whole RNA sequencing

Peritumoral tissue

Healthy surrounding tissue

Soft-tissue sarcoma

Keypoints

1

2

3

Abreviations

CINSARC : Complexity INdex in SARComas
DGE : differential of gene expression
DNA : desoxyribonucleic acid
EMT: epithelial mesenchymal transition
FGSEA : Fast Gene Set Enrichment Analysis
FNCLCC : Fédération national des centres de lutte contre le cancer

nc
HT: healthy tissue
HTSeq : high-throughput sequence analysis
LogCPM
MEC : matrix extracellular
MET : mesenchymal epithelial transition
PCR : polymeras chain reaction
RNA : ribonucleic acid
R1: healthy tissue in contact with tumor
SeqPrep
STS : soft-tissue sarcoma
UCSC hg19
UPS : undifferenciated pleomorphic sarcoma
Tc : Tumor central
Tp : Tumor periphery

Abreviatons of genes

ABCC6: ATP binding cassette subfamily C membre 6
ACTC1 : actin alpha cardiac muscle 1
ADORA2B: adenosine A2b receptor
ALPK2: alpha kinase 2
BGN : biglycan
CD1 :cluster de différenciation 1
CD2 :cluster de différenciation 2
CDK: cycline dependant kinase
CDKN1A: cyclin dependant kinase inhibitor 1A
CDH11: cadherin 11
CKM: creatine kinase type M
COMP: cartilage oligomerci matric protein
COL5A1 : collagen type 5 alpha chain
COL10A1: collagen type X alpha 1 chain
CRISPLD2: cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase
FAP: fibroblast activation protein alpha
HER-2: human epiderm al growth factor recpetor 2
KIAA1199: CEMIP: cell migration inducing hyaluronidase 1
LIPG: endothelial lipase
LUM: lumican
MYBPC 1 et2: myosin binding protein C 1, 2
MYH1,2,7,8: mutY DNA glyocsylase 1,2,7 , 8
MYL1 :myosin light chain 1
MYLPF: myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle
MYOC: myocilin
P4HA3: prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3
P21: CDKN1
P53: tumor protein P53
POU4F1 : POU class 4 homeobox 1
PTEN: phosphatase and TENsin homolog

SCG2: secretogranin II
WNT

Introduction

Soft-tissue sarcoma were rare and heterogenous group of tumors originated from mesenchymal tissue. The peritumoral fibrous capsule is an outer layer that envelops soft-tissue sarcomas (STS). The notion of margins and/or tumor invasion front is an area of major interest which is both often the possible surgical limit and both the area of preferential interaction with the tumour. What is the area of healthy tissue needed to be removed? how to better understand the risk of relapse? This capsule is made up of collagen fibers and other structural components that can affect tumor progression and response to treatment. In STS of trunk wall or limbs in adults, the peritumoral capsule may be well-defined, which may help limit tumor spread and facilitate surgical removal. A thicker capsule may be a sufficient barrier and could authorize programmed R1 surgery in front of noble structures such as vessels, nerves, or bones (Stoeckle et al. 2009). But, we know also that the R1 vs R0 increase the risk of recurrence (Blay et al. 2019)(Levy A JCO)). Some tumors may have a thinner or poorly defined fibrous capsule, which could require complex surgery and lead to tumor recurrence. These patients require neoadjuvant management to improve and facilitate conservative surgery. Histology of the peritumoral fibrous capsule could also reveal information about tumor biology, such as cell density, the presence of blood vessels, and the type of collagen fibers. These information's could be used to assess the risk of recurrence and to guide treatment choices. Dr W.F.Enneking was one of the first to study the peritumoral fibrous capsule in STS and its potential role in tumor progression (Enneking, Spanier, et Malawer 1981). Since then, much research has been conducted to understand the biological mechanisms involved in the synthesis and behavior of the peritumoral fibrous capsule.

Molecular analysis and particularly transcriptomic analysis by whole RNA-sequencing of bulk tumor and healthy surrounding paired tissue of soft-tissue sarcoma of limbs and trunk wall were done. We will look for a difference of expression between the central core of tumor and the peripheral of the tumor. In a second stage, we will look also for a difference between healthy peritumoral tissue just in contact with the tumor also called R1 and the healthy tissue "at distance" which is more than 1 cm to the contact of tumor cells. The main hypothesis being that the central core is the best differentiated than the peripheral area, which need to be analyzed to score the FNCLCC grade (Coindre et al. 2001). The FNCLCC was the gold standard which was the most use by clinicians again. The invasion front or the peripheral of tumor will be the less differentiated and the best area for counting mitosis possibly due to factors as hypoxia. Also, the hypoxic tumor microenvironment has been implicated in immune escape, but the underlying mechanism remains elusive (Ma et al. 2022).

First question: should we evaluate the histoprognostic grade rather in the central core or in the peripheral area of tumor?

More recently, the CINSARC signature for "complexity index in sarcoma", transcriptomic signature of 67 genes involved in the regulation of mitosis (mitotic checkpoint) and

chromosomal rearrangement integrity was reported by Chibon et al in 2010 (Chibon et al. 2010). Is the CINSARC score identical between samples of Tc and Tp?

Second question: Does analysis of healthy peritumoral tissue provide additional information on the prognosis? Could this information be explained by the reactive immune infiltrate? Isn't the host's reaction to the tumor the major predictive factor? Does the Fridman signature applied to peritumoral tissue permit to distinguish a group of immune high and a group of immune low with different outcomes (Petitprez et al. 2020)? The role of the reactive immune infiltrate will be different if we take into account the tumor and healthy tissue as a whole vs only the reaction of healthy tissue?

Could we split the R1 trransriptomic profile in two distinct entities with different outcomes ? Then, we add a high-throughput transcriptomic analysis by visium technic on four well-limited tumors and four poorly limited tumors at the level of their transitional zone (Petitprez et al. 2020).

To evaluate the hypothesis that non tumoral healthy surrounding tissue influences disease progression, we used cancer-adjacent non-neoplastic tissue from 144 soft-tissue sarcomas to identify distinct gene expression subtypes in non tumoral tissue. Biological features of these subtypes were defined by comparison with established and novel gene expression signatures and by performing immunological score on transcriptomic data. The novel microenvironment subtypes identified were also evaluated for overall survival. Our data suggest two biologically distinct subtypes of nontumoral microenvironment with distinct biological features and clinical outcomes. Different types of sarcomas have disparate outcomes and we strive as clinicians to better understand the patient's prognosis by integrating new information molecules from the holy tissue surrounding the tumor.

Material et methods

Design of this study

It was a retrospective study, with data were from the Conticabase (https://conticabase.sarcomabcb.org). The focus was done on the non-metastatic patients treated surgically first at the Institut Bergonié from 01/01/2009 to 01/12/2020 (Table 1: Flowchart). It was the beginning of the conservation in formalin. These are therefore adult patients with soft-tissue sarcoma of the limbs and trunk wall without prior treatments. Thus, cases having received primary chemotherapy or radiotherapy, surgeries outside the center or sarcomas in irradiated area were excluded. Similarly, intra-troncular sarcomas or surgical revisions were excluded. The study was conducted following the ethical principles and the Institut Bergonié review board. All cases from this period were included with in total 576 blocks from 144 patients (x4 area per case). Indeed, the addition of systemic chemotherapy or radiotherapy to the area of interest must irremediably modify the environment of the tumor (at the level of the tumor and the healthy tissue). All these cases were therefore

excluded. Some cases were also excluded after extraction, some after library preparation and some did not present sufficient reads to be analyzed (Table 1 Flowchart).

RNA extraction

RNA extraction from FFPE paraffin block with the Maxwell® RSC nucleic acid extractor used in Molecular Pathology (Promega). HES slides corresponding to the blocks of the 144 tumors and healthy tissues were produced. On the paraffin block the area of tissue was circled (areas of interest) by the senior pathologist, and on the corresponding HES slide the block was sampled. The method for removing tissue from the block is punch drilling for the operating pieces. The quantity of material taken from the block depends on the cell density of the sample (depending on the type of tissue), the surface and the thickness of the circled area. In order to comply with identity vigilance, each step checks the concordance of the SIL identification number between the examination request sheet, the circled HES slide, the block as well as the tube in which the material to be deparaffinized will be placed.

As there are several blocks for the same patient, the specific number of the block used has been listed on the traceability sheets. In the case of a sample that is not entirely tumorous (areas of necrosis to be excluded), the pathologist circles on the HES slide corresponding to the block, an area presenting a significant proportion of tumor cells. Using the circled HES, the area of interest is transferred to the paraffin block and carrots are taken using a sterile single-used punch. The number of cores taken will be all the more important if the cell density is low and/or if the sample has a small thickness in the paraffin block:

- tissue with medium to high cell density: take 4 carrots

- tissue with low cell density and/or low tissue thickness in the core: take 6 to 8 cores.

Then the cores are placed in a 2ml screw-top tube identified by the patient's SIL number. Some purification steps then take place.

Qualification

RNA quantity and quality control: The RNAs will then be quantified with the Nanodrop (see DNA) and passed on the RNA nano Kit bioanalyzer chip.

RNA sequencing

High throughput RNA sequencing by True seq RNA Exome (Illumina) according to manufacturer's data (first step is the constitution of the library, second the cluster amplification and third the whole data).

Whole RNA2-sequencing will be performed simultaneously on several selected areas of interest from the same case, tumor tissue at central and peripheral level, healthy tissue

around the tumor core tumor tissue (TC) and peripheral tumor tissue (TP), healthy peritumoral tissue in contact (HT-R1) and healthy tissue at distance (HT) more than 1 centimeter (cm) (Figures 1a, 1b).

This protocol explains how to convert total RNA into a library of known strand origin, and then capture the coding regions of the transcriptome using reagents for the Illumina® TruSeq® RNA Exome workflow. The library is suitable for subsequent cluster generation and DNA sequencing. The RNA is fragmented using divalent cations under elevated temperature. cDNA is generated from the cleaved RNA fragments using random priming during first and second strand synthesis. Then, sequencing adapters are ligated to the resulting double-stranded cDNA fragments. The coding regions of the transcriptome are captured from this library using sequence-specific probes to create the final library.

Study Description

The aim of this study is to identify differences in gene expression between **R1 and HT conditions**, then, between **TC and TP conditions**. For this purpose, FFPE samples were subjected to RNA extraction and RNAseq trancriptomic analyses. Differential gene expression analyses were then performed to identify genes affected by tumor micro environment

NGS RNAseq sequence alignment and quality control pipeline

Raw RNAseq sequences were controlled for quality using a set of published tools to produce curated reads. Firstly, reads with low quality bases at 5' and 3' were trimmed using the Sickle package (Phred cut off 20, max trim size 30 nc) (1)(2). The SeqPrep package was used to remove sequencing adaptors from raw reads (3). This package also detected an important proportion of RNA fragments whose R1 and R2 paired-end reads were overlapping and merged them into single-end reads. To keep exploiting those fragments, a home-made python script was developed that split those merged reads into new non-overlapping R1 and R2 paired end reads. Curated reads were aligned using TOPHAT2 (based on aka BOWTIE2) on both the UCSC hg19 reference genome and transcriptome (4). Finally, we applied a post-alignment quality control of aligned reads by removing reads with mapping scores lower than 20 using Samtools (5). PCR duplicate reads were identified and removed using Picard MarkDuplicates (https://broadinstitute.github.io). Read counts were generated performed using the Python module HTSeq (6)

Differential analysis

Transcript count data were normalized according the VOOM method, which transforms raw count values to log2-counts per million (logCPM), estimates the mean-variance relationship and uses this relationship to compute appropriate observational-level weights (7). The RNAseq differential gene expression between groups of samples was performed using the statistical t-test from the R package LIMMA, which calculates fold changes and nominal p-values related to each gene starting from raw expression values and the normalization weights produced by VOOM (8). The set of nominal p-values from each test were adjusted according to the Benjamini-Hochberg adjustment (9). We defined the significantly up- or down-

regulated transcripts using an FDR threshold of 0.05. The fold-change used to further filter the differential gene expression was set to a minimum value of 2.

Gene Set-Enrichment Analysis

MSigDB (10) and FGSEA (11) was used to identify pathways or gene ontologies in which the genes of an identified group were enriched. Oncogene and Tumor Suppressor Gene status (approximately 800 known genes) was assigned according to the annotation in Cancer Gene Panel (12,13).

Unsupervised Clustering

Unsupervised clustering analysis of RNA-Sequencing expression data was performed using agglomerative hierarchical clustering with distance criteria (1-Pearson_Correlation) and linkage criteria equal to average via the function hclust available in R (14). To assess the robustness of clustering results at a given SD threshold, we performed consensus clustering via the package ConsensusClusteringPlus available in BioConductor (15). Consensus was established after 10,000 iterations on the subset of samples obtained by leave-n-out of 40% of samples.

Fridman signature

We applied a simplified Fridman method (with two extrema categories) on our four areas of samples. It was performed the centroid regression to calculate the immune status of each sample. If one sample present a high immune level of response, the patient is placed in E group. If all samples were A, the patient was placed in A group.

Ancillary study: “UPS Visium”

The highly innovative Visium technology will make it possible to complete high-throughput transcriptomic analysis using the notion of space. Indeed, this analysis will make it possible to study the immune infiltrate at the level of the healthy invasion front of the tumor. The area of the peritumoral capsule will be the subject of microdissection and multiplex fluorescent immunohistochemistry analysis on 4 cases of undifferentiated pleomorphic cell sarcomas (UPS), including 4 well-limited cases and 4 very infiltrating cases in terms of the peritumoral capsule.

Results

Clustering global

Hierarchical global unsupervised clustering was noticed in Figure 2. A focus was done on the R1 samples at the right of the clustering which could split the samples in two groups (Figure 3).

Comparison of R1 and distant HT

Differential Expression paired t-test between healthy and R1 conditions. 260 genes with an adjusted P value < 0.05 were assigned as differentially expressed. HT was the baseline.

As we can see on the Vocano Plot (Figure 4), we found a DGE of 260 genes (Table 2). 207 genes were overexpressed in R1, and 53 genes overexpressed in distant HT.

The most genes overexpressed in R1 were *BGN, COL5A1, LUM, FAP and CDH11* in terms of adjusted pvalue (1,73E-34; 1,99E-31). The most genes overexpressed in R1 in terms of FC (7,146 – 3,98) were *COL10A1, COMP, KIAA1199, SCG2, P4HA3* (Table 2).

The major hallmark pathway enrichment was the hallmark of epithelial mesenchymal transition (Figure 5). The REACTOME pathway enrichment contained an overexpression of translation protein modification, disease of metabolism and degradation of the extracellular matrix, collagen formation and extracellular matrix organization (Figure 6). The GENE ONTOLOGY cellular component contained endoplasmic reticulum lumen, collagen containing extracellular matrix and external encapsulating structure (Figure 7). The GENES involved in biological process were small molecule metabolic process, organic acid metabolic process, response to growth factor, animal organ morphogenesis and particularly external encapsulating structure organization (Figure 8).

The genes involved in molecular function were molecular transducer activity, oxidoreductase activity, glycosaminoglycan binding, structural molecule activity, extracellular matrix structural constituent (Figure 9).

Comparison of DGE of Peritumoral Healthy Tissue R1 vs Healthy at distance, those had metastatic event vs no

The aim of this study is to identify differences in gene expression ** R1 tissue**. For this purpose, FFPE samples were subjected to RNA extraction and RNAseq trancriptomic analyses. Differential gene expression analyses were then performed to identify genes affected by tumor microenvironment (Table 3). Two major genes were significatively different and over expressed in the surrounding healthy tissue paired between those who presented a metastatic evolution and the others: *CRISPLD2 and LIPG. MYOC* was down expressed in the R1 when they had a metastatic evolution. *LIPG* is an endothelial lipase, a form of lipase secreted by vascular endothelial cells in tissues with high metabolic rates and vascularization.

Comparison of DGE of R1 HT with local recurrence vs no

Ten major genes were found to be different in the group which had local recurrence vs no particularly in the R1 (Table 4).

ALPK2 Protein serine kinase activity involved in several processes including epicardium mrophogenesis, heart development and negative regulation of Wnt signaling pathway involved in heart development. Known as tumor promotor in development of bladder cancer (Wang, Cell death 2021).

POU4F1 confers trastizumab resistance in HER-2 positive breast cancer through regulating *ERK1/2* signaling pathway (Wu 2020). POU Class 4 Homebox 1 is a member of the POU domain family transcription factors and has a key role in regulating cancers. POU4F1 promotes the resistance of melanoma to BRAF inhibitors (Liu Cell Deat 2020). POU4F1 is a stem-cell-associated transcriptional factor that is highly expressed in melanoma cells and contributes to BRAF-activated malignant transformation.

Comparison of DGE of Tc vs Tp

The aim of this study is to identify differences in gene expression between **TC and TP conditions**. For this purpose, FFPE samples were subjected to RNA extraction and RNAseq trancriptomic analyses. Differential gene expression analyses were then performed to identify genes affected by tumor microenvironment. The difference between the expression of TC and TP were very narrow with a list of 13 genes significatively up regulated in the Tc (Table 5). We reported *ACTC1, CKM, MYBPC 1 et2, MYH1,2,7,8, MYL1, MYLPF* which are related to the muscular structure or in any case the intramuscular localization of the type of tumors of interest (STS).

Discussion

The phenotypic plasticity involves a process which cells acquire phenotypic traits of another lineage (somarelli 2016). That plasticity is defined by a reversible conversion of cellular phenotypes and these transitions play an important role in development, wound healing, fibrosis and carcinoma progression (somarelli). Why some subtypes of cancers have a MET signature (as in the K breast) or pro EMT signals in the microenvironment? Mesenchymal phenotypes are inherently chemoresistant (Li et al., 2008), and in support of these observations, a response to therapies has been negatively correlated with an EMT signature in metaplastic breast cancer (Taube et al., 2010). The EMT program is controlled by pro-invasive signals from the microenvironment favored by hypoxia, inflammation and lack of nutrients. The cancer subtype classification system is based on their gene expression profile, so it does not take into account tumor heterogeneity. EMT cells can be a minority within a tumour, while having an impact, in particular on resistance to chemotherapy. A "partial" EMT identified in cancerous tissues could be sufficient to allow invasion while retaining a degree of plasticity allowing MET-like reversion, responsible for the metastatic event. Tumor cell invasion requires not only a modification of cell-MEC interactions, but also a significant remodeling of the MEC, necessarily leading to a degradation step. It is the matrix

metallopeptidase *MMPs,* whose expression were induced during EMT that are mainly involved in this degradation, in particular *MMP2* and *MMP9* (Nisticò et al., 2012) as we can see in our R1. We can therefore explain or evoke the fact that the healthy peritumoral tissue seems to be the preferential localization of this transition . The differential of gene expression between the genes of the remote healthy tissue and the healthy peritumoral tissue are all involved in this process. The fibrous capsule was the place of this degradation, which is necessary for invasion. This place, where the fibroblasts synthesize the fibrous capsule (which can go as far as cartilage or bone even in soft tissue) increase in morphogenesis, growth factors, metabolism, tissue developemen. That explain the overexpression of genes of MEC, GAG, collagen and fibrosis. Genes involved in epithelial mesenchymal transition, such as *ABCC6*, *ACAN* and *ADAM12*, are indeed associated with tumor progression and may be a potential therapeutic target.

Then, we reported a signature of 2 genes upregulated in the R1, which would be responsible of the distant metastatic outcome. *CRISPLD2* associate with prognosis in ovarian cancer (Chen 2020) cf. *CRISPLD2* has been proved to play significant role in either maintaining cell structure, participating in immune response, inhibiting inflammatory or involving in cell motility.

LIPG was already known as an inflammation and cancer modulator (hong, cancer 2021). Recently, it suggested that *LIPG* contributes to cancer initiation and progression. Lipids are one of the major nutrient and dysregulation of lipid metabolism undoubtedly plays a crucial role in cancer progression (Boren 2012, Hong 2021). *LIPG* supports the cell proliferation and tumor growth in the way to finish the lipid synthesis or directly to provide energy provision in cell. Cadenas et al (2011) found that the upregulation of *LIPG* could mediate the adaptation to oxidative stress in breast cancer and prompt the cancer cell to use the lipoprotein as a nutrition source.

ALPK2 Protein serine kinase activity involved in several processes including epicardium mrophogenesis, heart development and negative regulation of Wnt signaling pathway involved in heart development. Known as tumor promotor in development of bladder cancer (Wang, Cell death 2021).

POU4F1 confers trastizumab resistance in HER-2 positive breast cancer through regulating *ERK1/2* signaling pathway (Wu 2020). POU Class 4 Homebox 1 is a member of the POU domain family transcription factors and has a key role in regulating cancers. *POU4F1* promotes the resistance of melanoma to BRAF inhibitors (Liu Cell Deat 2020). *POU4F1* is a stem-cell-associated transcriptional factor that is highly expressed in melanoma cells and contributes to BRAF-activated malignant transformation.

Growing evidence suggests that extratumoral microenvironment may play a role in cancer progression in breast cancer. Chen *et al.* showed that some cancer patients have gene expression patterns in their adjacent non-neoplastic tissue that are similar to invasive breast cancer signatures, and that these signatures may predict progression of early premalignant lesions (breast K research).

These observations suggest that the stroma and/or epithelium adjacent to tumors may harbor changes, referred to as field effects [14], and that these changes may be of prognostic value (Heaphy CM, Griffith JK, Bisoffi M: Mammary field cancerization: molecular evidence and clinical importance. Breast Cancer Research)

Active cancer-adjacent tissue shows features of active EMT or cellular dedifferentiation and was associated with poor survival (in study of Roman Perez)

We suggest that the transcriptomic profile of non-tumoral surrounding tissue in soft tissue sarcomas may be associated with patient prognosis.

The study of Petitprez et al, highlighted in a large serie of sarcoma, an immune-based classification on the composition of the tumor microenvironment and identify distinct phenotypes. The class E was characterized by the presence of tertiary lymphoid structures that contain T cells and follicular dendritic cells and are particularly rich in B cells. B cells are the strongest prognostic factor even in the context of high or low CD8+ T cells and cytotoxic contents. The class-E group demonstrated improved survival in PembroSARC study (ref).

Many other questions remain to be answered to better understand the complexity of the mechanisms involved in the formation and progression of STS.

Conclusion

References

1. GitHub - najoshi/sickle: Windowed Adaptive Trimming for fastq files using quality [Internet]. GitHub. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://github.com/najoshi/sickle

2. najoshi. sickle: Windowed Adaptive Trimming for fastq files using quality [Internet]. 2017 [cité 27 sept 2017]. Disponible sur: https://github.com/najoshi/sickle

3. GitHub - jstjohn/SeqPrep: Tool for stripping adaptors and/or merging paired reads with overlap into single reads. [Internet]. GitHub. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://github.com/jstjohn/SeqPrep

4. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 4 mars 2012;9(4):3579.

5. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 15 août 2009;25(16):20789.

6. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq–a Python framework to work with high-throughput sequencing data. Bioinformatics. 15 janv 2015;31(2):1669.

7. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Genome Biol. 3 févr 2014;15(2):R29.

8. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Research. 20 avr 2015;43(7):e47e47.

9. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological). 1995;57(1):289300.

10. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 oct 2005;102(43):1554550.

11. Korotkevich G, Sukhov V, Sergushichev A (2019). “Fast gene set enrichment analysis.” bioRxiv. doi: 10.1101/060012, http://biorxiv.org/content/early/2016/06/20/060012.

12. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape K, Lu X, Manekia J, et al. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. Br J Cancer. 11 nov 2014;111(10):201423.

13. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. Science. 29 mars 2013;339(6127):154658.

14. R Core Team (2020). — European Environment Agency [Internet]. [cité 31 juill 2021]. Disponible sur: https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006.

15. Wilkerson MD, Hayes DN. ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking. Bioinformatics. 15 juin 2010;26(12):15723.

Complementary analysis:

High troughpout transcriptomic analysis of 8 UPS

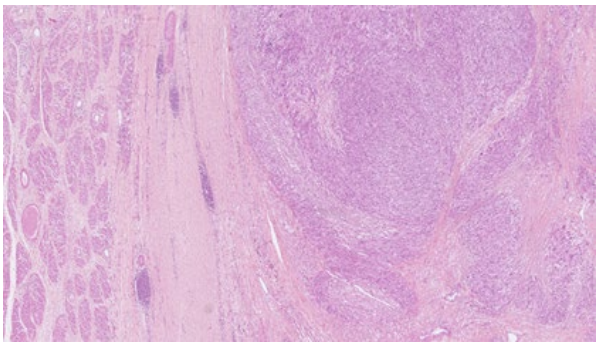
Analyse ancillaire de l'infiltrat immunitaire au sein de la capsule péritumorale par technique visium

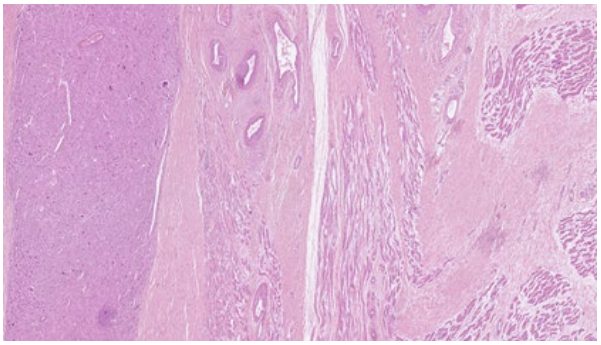
Est-ce que le mode d'infiltration de la tumeur a un rôle dans la rechute locale ?

Pour appréhender au mieux cette question, nous avons souhaité étudier des tumeurs très différentes presque extrêmes afin de pouvoir mettre en exergue des mécanismes fondateurs de cette infiltration. Le tissu juxtatumoral à un rôle fondamental dans l'évolution tumorale. Il correspond au front d'invasion de la tumeur et possède ainsi des caractéristiques variables en fonction de l'agressivité de la tumeur et en fonction de la réaction de l'hôte face à la tumeur.

Nous avons étudié 4 sarcomes indifférenciés type UPS très bien limités avec ci-dessous (Figure 28a 28b) une limite tumorale bien visible, nette, un peu en on off. On peut voir également dans le cas de gauche (Fig.28a) la présence de structures lymphoïdes tertiaires, qui sont d'ailleurs présentes dans la couronne de tissu sain autour de la tumeur et non au centre de la tumeur. C'est cette réaction visible de l'hôte contre la tumeur qui nous parait pouvoir détenir tant de nouvelles cibles thérapeutiques que d'éléments déterminants prédictifs de la rechute.

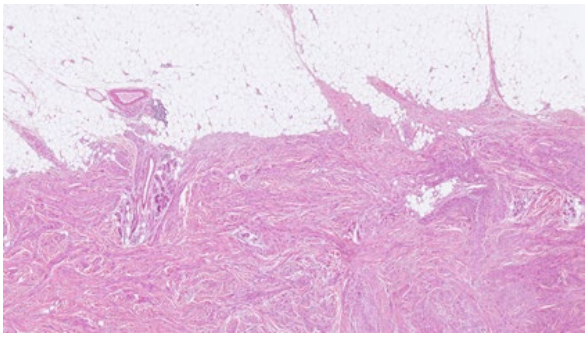
La technologie *Visium*, très novatrice va permettre de compléter l'analyse transcriptomique haut débit en utilisant la notion d'espace. En effet cette analyse va permettre d'étudier l'infiltrat immunitaire au niveau du front d'invasion sain de la tumeur. La zone de la capsule péritumorale fera l'objet de microdissection et d'analyse en immunohistochimie fluorescente multiplex sur 4 cas de sarcomes indifférenciés à cellules pléomorphes (UPS) dont 4 cas bien limités et 4 cas très infiltrants en termes de capsule péritumorale.





Figures 28a et 28b : UPS avec tumeur très bien limités ; TLS dans le front d'invasion ou dans le stroma plutôt que dans le centre de la tumeur (Sautès-Fridman et al. 2019).

A ces premiers cas analysés, nous opposons l'analyse de 4 UPS de morphologie différente. Il s'agit de tumeurs plus infiltrantes avec comme ci-dessus des doigts de gants qui s'insinuent dans le tissu sain environnant (Figure 29a et 29b).



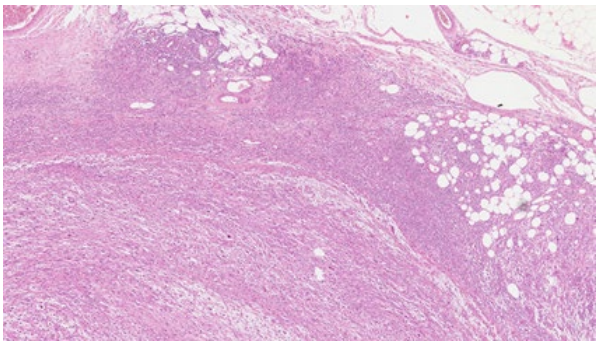


Figure 29a et 29b : UPS avec tumeur plus infiltrantes.

Premier cas - Il s'agit d'un sarcome indifférencié à cellules pléomorphes de type UPS. L'analyse de cette tumeur infiltrante est bien positionnée et est à cheval sur la zone tumorale périphérique et sur la couronne de tissu sain péritumorale (Figure 30). Il s'agit d'une tumeur riche en lymphocytes T, sans structure lymhoide tertiaire organisée visible: TLS -, bien visible à gauche de la microdissection réalisée. Il y a une surreprésentation de la population de macrophages plutôt M2 qui sont favorables à une immunosuppression locale, à l'activation du complément et qui participe au front d'invasion. Sur la droite de l'image on observe plutôt la zone marginale et le tissu sain plus à distance représenté par du muscle. Le tissu normal péritumoral "résiste" mal à la tumeur et on visualise par zones l'induction de l'exhaustion dans des zones d'infiltration dans le tissu musculaire strié (Figures 31)

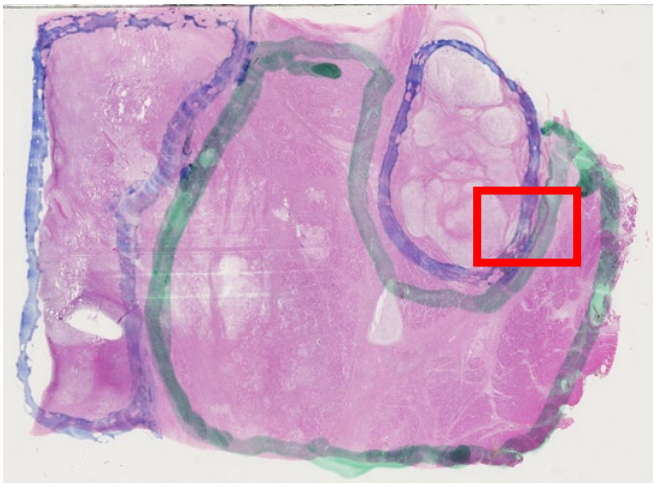
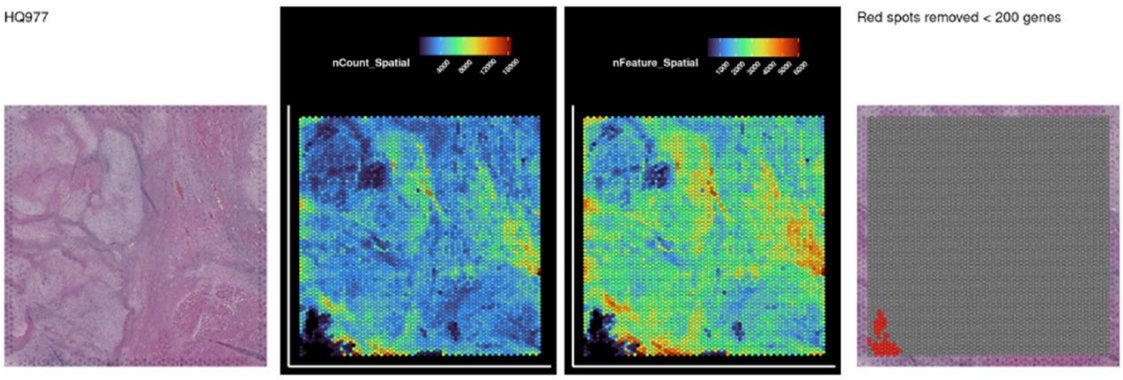


Figure 30 : lame histologique correspondant à la tumeur délimitée et au tissu sain péritumoral. Le rectangle rouge localise la zone microdisséquée.



Figures 31: données brutes générées à partir de l'analyse spatiale transcriptomique. lDans la recue de Kendal (Kendal et al. 2023), le rôle des cellules B dans le sarcome, y compris la compréhension des différentes populations de cellules B associées au sarcome, l'organisation des cellules B intra-tumorales dans les structures lymphoïdes tertiaires sont présentés.

La distribution spatiale des cellules B intratumorales semble également être variable dans les sarcomes, certains sous-types de tumeurs présentant généralement un infiltrat lymphocytaire plus diffus (par exemple, sarcome pléomorphe indifférencié, UPS) avec une faible présence de cellules B, et d'autres (par exemple, Rhabdomyosarcome, RMS) démontrant une présence de cellules B plus organisée dans des configurations connues sous le nom de structures lymphoïdes tertiaires (TLS) (Chen et al. 2020).

Une analyse de TLS indique que la structure et l'architecture spatiale d'une réponse immunitaire intra-tumorale médiée par les cellules B est plus complexe que la simple présence de ces populations de cellules immunitaires (Bruno 2020).

Second cas (Figure 32): Il s'agit d'une tumeur infiltrante avec sur la zone analysée, une partie de zone tumorale riche en fibroblastes. Il y a peu de lymphocytes B et T, peu de macrophages. Nous n'observons pas de structures lymphoides tertiaires visibles dans la zone tumorale. En revanche, au sein de la zone marginale saine, on peut observer une structure TLS mature au sein d'un tissu musculaire inflammatoire. Le patient en question a présenté une évolution métastatique et est décédé de cette évolution.

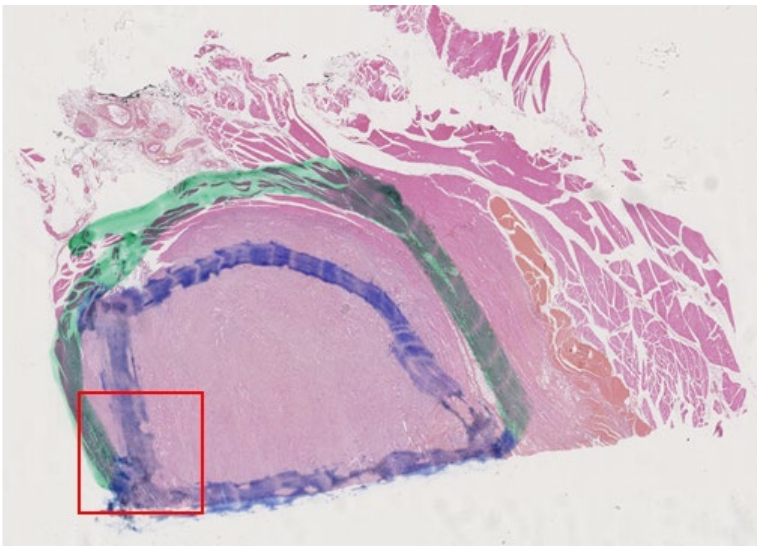
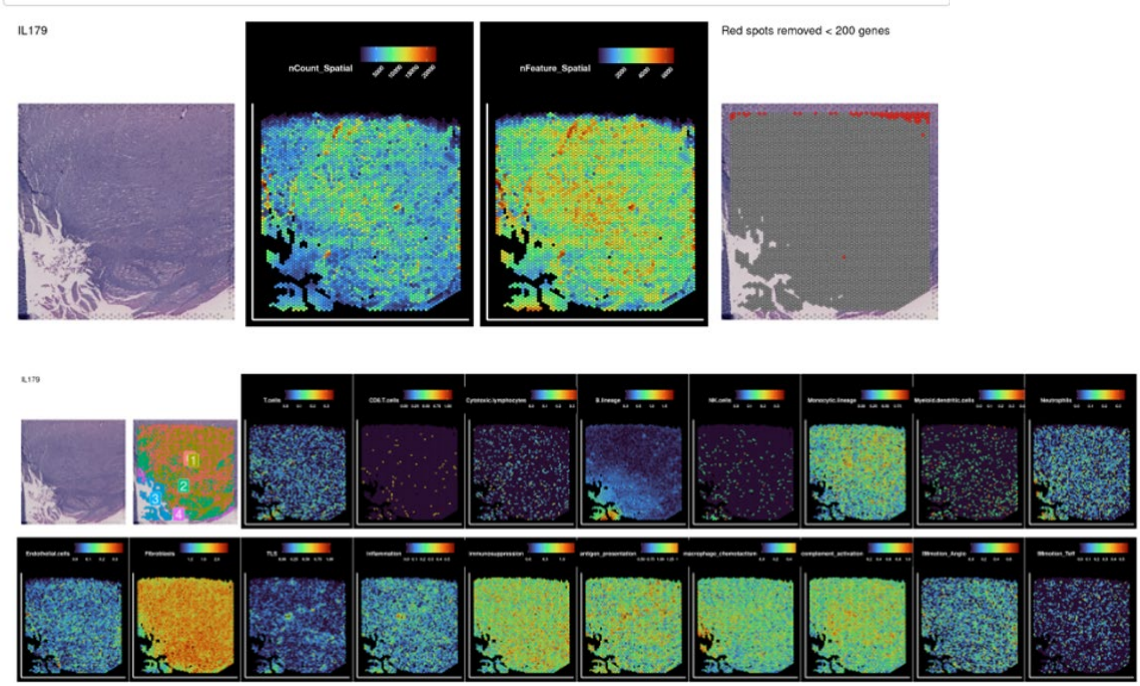


Figure 32 : lame histologique de sarcome des tissus mous avec en zone bleue la zone tumorale et en zone verte la zone saine péritumorale. Le rectangle rouge correspond à la zone de microdissection.



Figures 33 : données générées brutes correspondant à l'analyse de la zone microdisséquée.

Troisième cas: il s'agit d'une tumeur infiltrante c'est à dire ne présentant pas des limites tumorales franches. La zone analysée est bien positionnée figure 34, à cheval zone tumorale et zone marginale. On visualise une zone fibroblastique avec présence d'aggrégats de

lymphocytes B. Il existe au sein de la zone marginale une signature TLS positive avec forte expression d'IgA. Le patient a présenté une évolution métastatique.

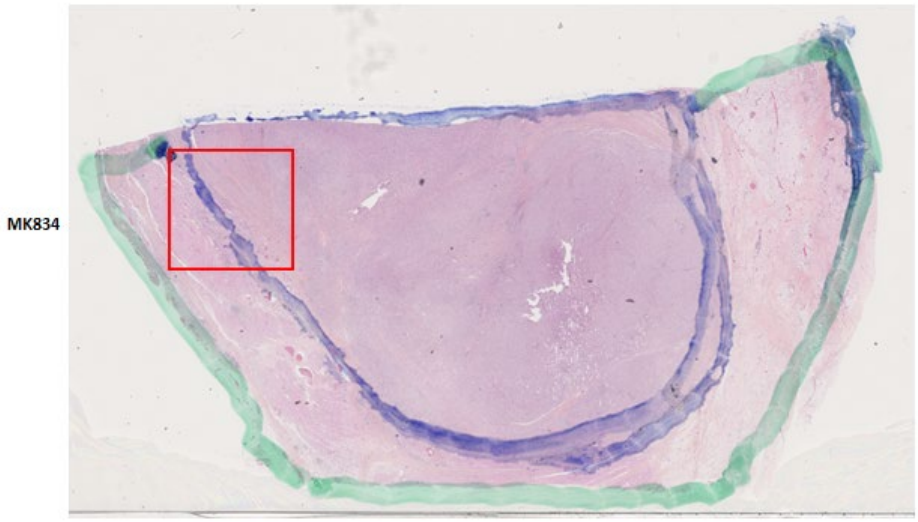
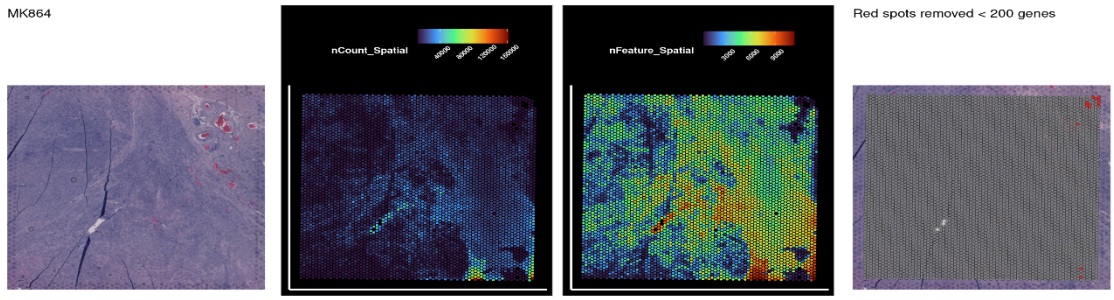
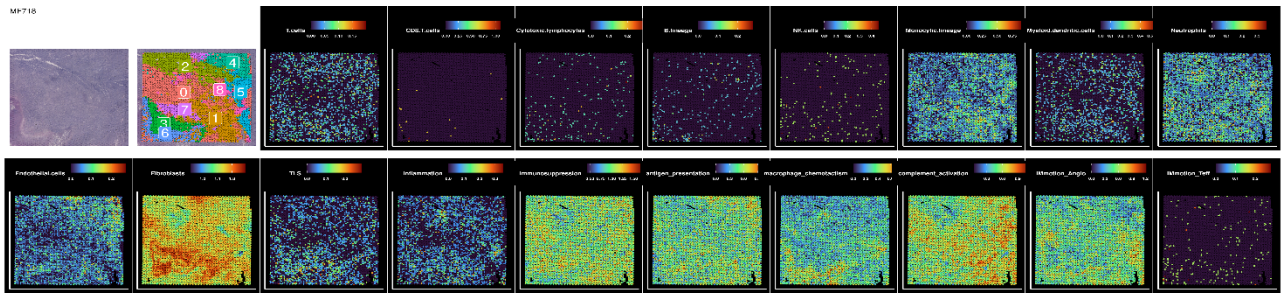


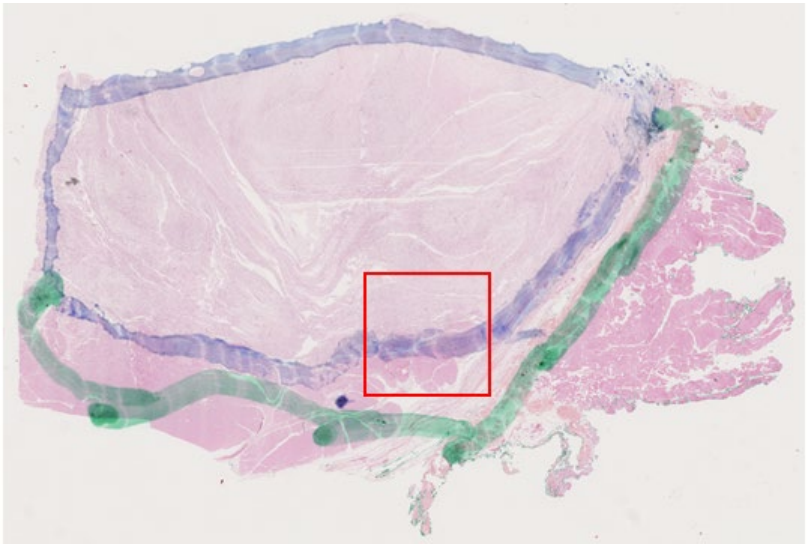
Figure 34: lame histologique d''un cas de sarcome avec zone analysée à cheval zone tumorale zone marginale. `## Genes kept:  15441 from 17943`

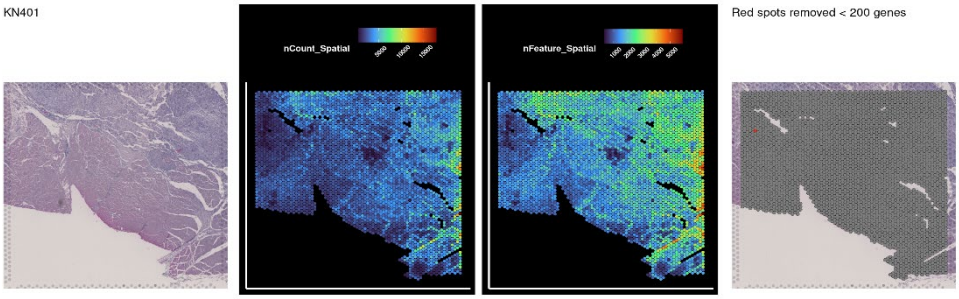


Normalize and compute MCP-scores and signatures



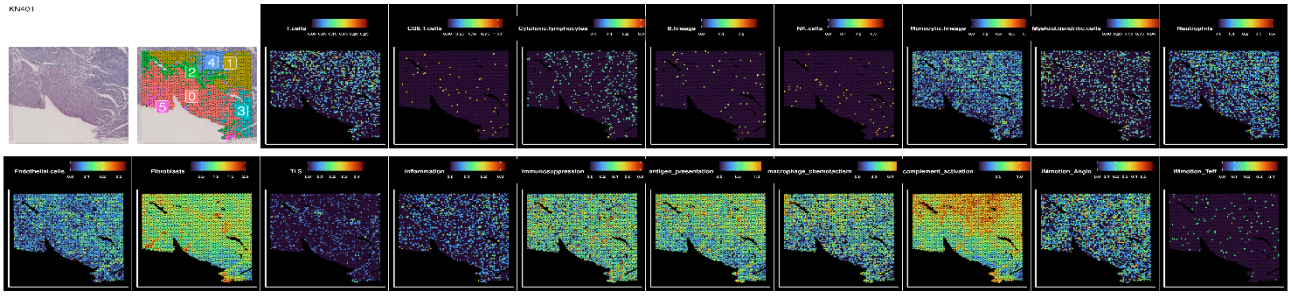
Quatrième cas : il s'agit à nouveau d'une tumeur infiltrante avec analyse à cheval de la zone tumorale et de la zone marginale d'intérêt. La zone de microdissection parait bien positionnée. Au niveau des résultats obtenus, nous n'observons aucun signal évoquant une réaction immunitaire.






```
## [1] "KO
```

#



Visium

Cette technique permet l'identification de types de cellules et voies de mécanismes immunitaires par ce biais. Des voies moléculaires spécifiques peuvent être différemment activées en fonction de la région de l'échantillon de tissu. La découverte de biomarqueurs permet d'approcher la compréhension de la maladie sous-jacente et de potentiellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette technique va également nous permettre de comparer la zone tumorale périphérique à la zone de tissu sain et de vois comment celle-ci réagit. Des différentiels d'expression peuvent ensuite être mis en évidence. Les résultats permettront le développement d'un atlas d'expression génique résolus dans l'espace.

Cette technique a largement été utilisé dans le carcinome du rein et la même procédure a été réalisé dans les sarcomes des tissus mous. Ceux-ci présentent des caractéristiques immunologiques différentes. Ces deux types de pathologies peuvent présenter un certain degré d'infiltration immunitaire et d'expression de molécules de point de contrôle immunitaire. Par exemple, il a été démontré que dans le cancer du rein, l'infiltration est faite de lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK et de macrophages. Certaines études suggèrent qu'une densité élevée de lymphocytes T intratumoraux peut être associée à une meilleure survie. En revanche dans les STM, une densité plus élevée de cellules T régulatrices et de cellules suppressives myéloides en contribuant à l'immunosuppression participent à la progression tumorale.

A noter que pour le moment 4 des 8 procédures ont été mal positionné et nécessite une nouvelle microdissection pour analyse. En effet 4 analyses n'ont pas été positionnés sur une zone charnière mais en pleine zone tumorale. Ces résultats nous montrent toutefois que dans les cas analysés nous pouvons considérés nos cas comme "froids" c'est à dire immunologiquement inactifs.

D. Conclusion et perspectives

En conclusion, le tissu péritumoral oul a capsule péritumorale apparait sous un autre jour et devient un élément important pour l'appréciation globale du pronostic du patient. Les zones péritumorales riches en macropahes M2 et plus indifférenciés pourraient être les prémices d"une évolution péjorative globale.

La présence de TLS serait plutot un facteur pronostique sans qu'un lien est pu être établi de façon significative. La présence de TLS dans le tissu péritumoral pourrait être un signal d'alerte étant donné que nous avons retrouvé un risque augmenté de présenter une rechute locale dans le groupe particulier de TLS matures.

Le Deep Learning sur lames parait être un outil très innovant, pronostic de façon plus précise que le grade. Ce système pourrait aider le clinicien face aux situations intermédiaires comme les grade de type 2. Les perspectives serait d'ouvrir une plateforme qui pourrait une fois que le clinicien ait charger la lame histologique de donner un score prédictif et ainsi de catégoriser le patient en haut ou bas risque. Le principal frein est la place nécessaire sur ordinateur mais nous parait être une piste plus qu'intéressante.

Enfin, en ce qui concerne l'analyse transcriptomique, nous cherchons à catégoriser deux groupes de R1 en fonction de leur profil évolutif. Des analyses immunohistochimiques sur le tissu sain pourrait confirmer ces résultats par la suite.

Nous avons également avancer sur la notion d'hétérogénéité intratumorale. Nous avons trouvé un gène en commun présent dans le TP, dans ceux qui présentent une rechute locale et également une évolution métastatique. Celui-ci a également été trouvé dans un autre travail de thèse qui comparait le transcriptome de tumeur primitive vs tumeur secondaire (métastase). Nous retrouvons ainsi le gène ADORA2B dont nous allons parler en perspective.

ADORA2B ou la nouvelle cible prédictive de la rechute

ADORA2B ou Adenosine A2b receptor est un récepteur de l'adénosine couplé à une protéine G.

Rationnel:

L'adénosine est un facteur soluble libéré par les cellules tumorales mourantes et qui s'accompagnent d'une hypoxie transitoire ou chronique (Figure 1). Cette protéine pourrait avoir un rôle essentiel dans la protection des tissus cancéreux contre les réponses immunitaires antitumorales (Ohta et al. 2006). Suite à leur libération dans le microenvironnement tumoral, l'ATP et L'ADP peuvent être converti en AMP par CD39, puis le CD73 transforme l'AMP en adénosine. CD39 et CD73 sont tous deux exprimés par les cellules tumorales et/ou les cellules immunitaires infiltrant la tumeur (c'est-à-dire les Treg). Quatre récepteurs de l'adénosine, existent et sont nommés A1, A2A, A2B et A3.3 L'adénosine améliore l'activité immunosuppressive des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et la différenciation des cellules dendritiques (DC) en DC tolérogènes et immunosuppressives (Morello et al. 2016)(Figure 2). L'adénosine joue également un rôle crucial dans l'accumulation de cellules suppressives dans l'environnement tumoral. En effet, le déficit en récepteurs ADORA2B (A2B) chez les souris porteuses d'un carcinome pulmonaire est corrélé à la fois à un faible nombre de ces cellules supprpessives infiltrant la tumeur et à des niveaux réduits de facteur de croissance endothélial vasculaire intratumoral (VEGF) (Ryzhov et al. 2011). De plus, le blocage des récepteurs A2B inhibe l'angiogenèse tumorale et améliore ainsi la surveillance immunitaire médiée par les cellules T dans un modèle de mélanome (Iannone et al. 2013; Morello et Miele 2014; Sorrentino et al. 2015). L'adénosine peut également inhiber directement les réponses antitumorales médiées par les cellules T et induit des Treg principalement via ADORA2A (Sitkovsky 2009; Ohta et al. 2014). Ces propriétés créent et maintiennent des conditions d'immunosuppression favorable dans le microenvironnement tumoral. En plus de ses effets immunosuppresseurs, l'adénosine dérivée de CD73 favorise la migration des cellules tumorales *in vitro* et la métastase *in vivo* via le récepteur de l'adénosine A2B (Stagg et al. 2010). Le récepteur de l'adénosine A2B a récemment été identifié comme une cible de facteur de transcription FOS-related antigen 1 (FRA1) dans le cancer du sein triple négatif (TNBC)(Desmet et al. 2013). En outre, l'expression de CD73 chez les patientes atteintes de TNBC est également corrélée à une résistance accrue à la chimiothérapie à base

d'anthracycline en raison de la suppression de l'immunité antitumorale par l'adénosine. Des preuves précliniques convaincantes ont montré que le ciblage de la signalisation, avec des antagonistes sélectifs des récepteurs de l'adénosine pouvaient avoir un intérêt (Leone, Horton, et Powell 2015; Young et al. 2014).

Les sarcomes des tissus mous sont un groupe hétérogène de tumeurs rares dont,i, malgré un traitement local optimal, près de 50 % des patients diagnostiqués mourront de leur maladie, et ce, principalement due au développement d'une maladie métastatique (Board s. d.). Bien que la connaissance moléculaire des sarcomes primitifs des tissus mous ait contribué à une meilleure compréhension de sa pathogenèse, la mortalité se produit généralement en raison de métastases à distance, dans lesquelles les processus mutationnels en cours et la pression sélective du traitement peuvent entraîner une altération des caractéristiques moléculaires. Les profils génétiques et immunologiques des tumeurs et des métastases de sarcome les plus difficiles sur le plan clinique restent mal définis. Nous menons une étude exploratoire sur les voies métastatiques du STS. En comparant le profil transcriptionnel de la tumeur primaire appariée et des métastases d'une grande cohorte de patients STS, nous avons constaté que, entre autres, A2B est surexprimé dans les métastases de certains sous-histotypes STS (Fig. 3), et des expériences de profilage transcriptomique spatial ont révélé que cette surexpression est situé sur les cellules tumorales.

Fig. 1: Adenosine-mediated effects in the hypoxic tumor microenvironment (14)

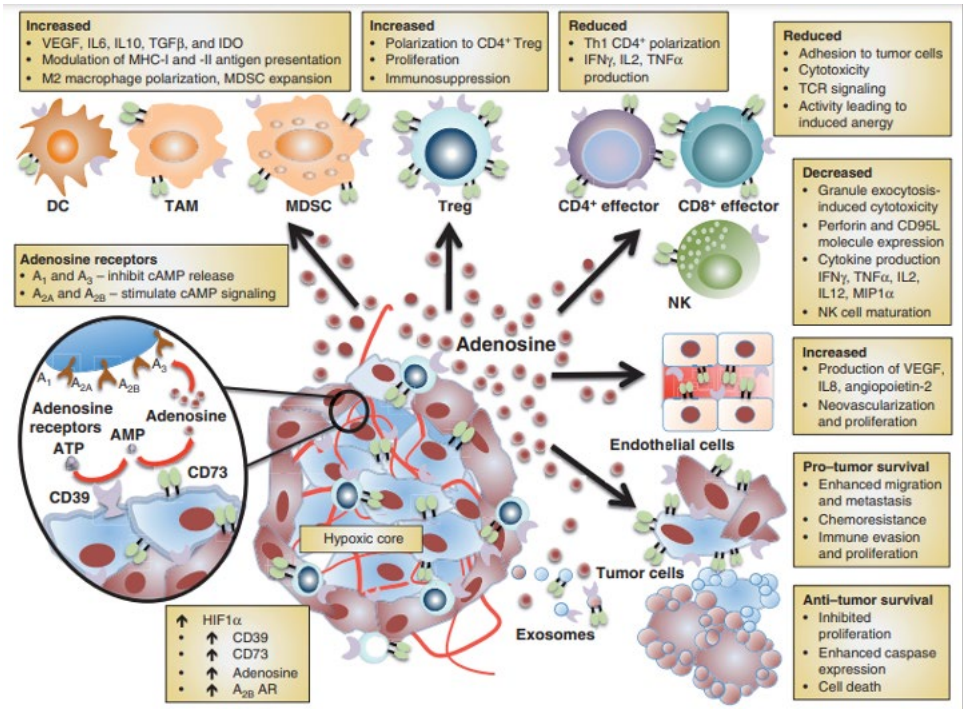


Figure 2 .issue de Morello S, et al. Oncoimmunology 2014 (7)

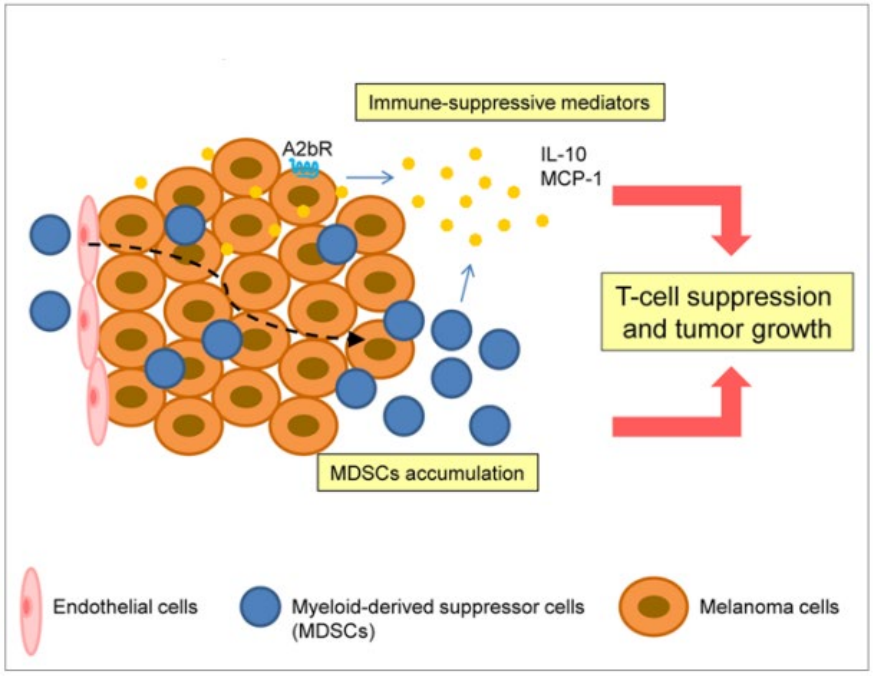
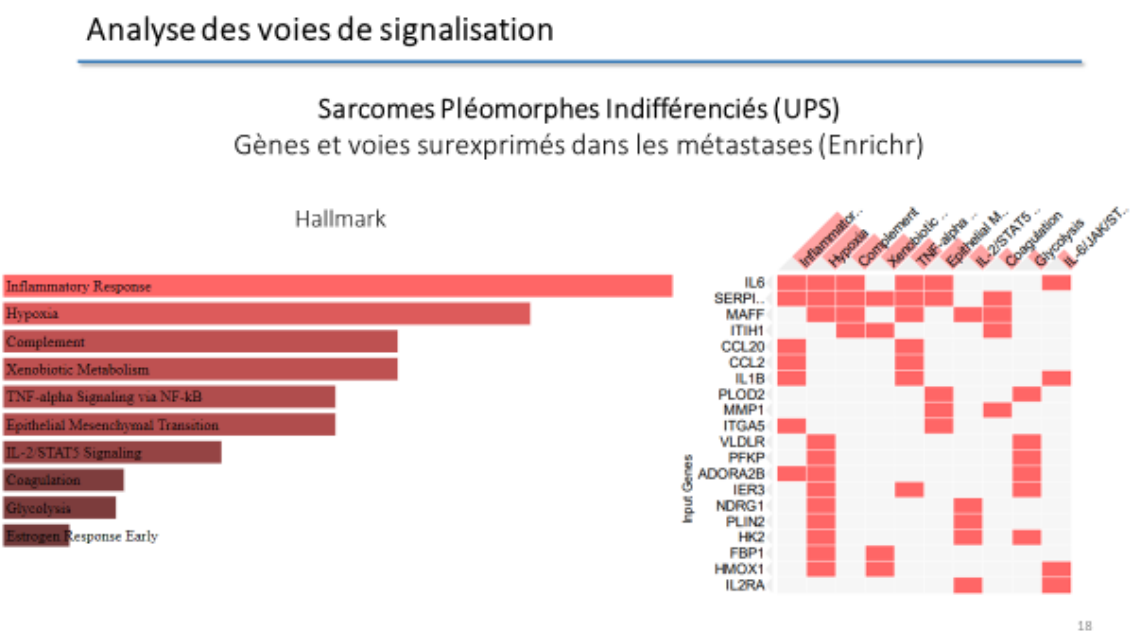


Fig.3: Overexpressed genes and pathways in STS metastases (RNAseq data)(14)



Retombées attendues / perspectives

Ces patients à risque de rechute pourraient bénéficier d'une prise en charge particulière adaptée en associant d'autres thérapeutiques à la prise en charge chirurgicale classique. De même l'identification d'un nouvel outil pronostic en intelligence artificielle pourrait permettre d'accompagner les patients en modifiant le suivi du groupe à risque de rechute.

Références

Arbiser, Z. K., A. L. Folpe, et S. W. Weiss. 2001. « Consultative (Expert) Second Opinions in Soft Tissue Pathology. Analysis of Problem-Prone Diagnostic Situations ». *American Journal of Clinical Pathology* 116 (4): 473-76. https://doi.org/10.1309/425H-NW4W-XC9A-005H.

Baldini, Elizabeth H., Axel Le Cesne, et Jonathan C. Trent. 2018. « Neoadjuvant Chemotherapy, Concurrent Chemoradiation, and Adjuvant Chemotherapy for High-Risk Extremity Soft Tissue Sarcoma ». *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American*

Society of Clinical Oncology. Annual Meeting 38 (mai): 910-15. https://doi.org/10.1200/EDBK_201421.

Bauer, H. C., C. S. Trovik, T. A. Alvegård, O. Berlin, M. Erlanson, P. Gustafson, R. Klepp, et al. 2001. « Monitoring Referral and Treatment in Soft Tissue Sarcoma: Study Based on 1,851 Patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register ». *Acta Orthopaedica Scandinavica* 72 (2): 150-59. https://doi.org/10.1080/000164701317323408.

Billingsley, K. G., M. E. Burt, E. Jara, R. J. Ginsberg, J. M. Woodruff, D. H. Leung, et M. F. Brennan. 1999. « Pulmonary Metastases from Soft Tissue Sarcoma: Analysis of Patterns of Diseases and Postmetastasis Survival ». *Annals of Surgery* 229 (5): 602-10; discussion 610-612. https://doi.org/10.1097/00000658-199905000-00002.

Blay, J.-Y., C. Honoré, E. Stoeckle, P. Meeus, M. Jafari, F. Gouin, P. Anract, et al. 2019. « Surgery in Reference Centers Improves Survival of Sarcoma Patients: A Nationwide Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (7): 1143-53. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz124.

Board, WHO Classification of Tumours Editorial. s. d. *Soft Tissue and Bone Tumours*. Consulté le 8 mai 2023. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Soft-Tissue-And-Bone-Tumours-2020.

Bonvalot, S., A. Laplanche, F. Lejeune, E. Stoeckle, C. Le Péchoux, D. Vanel, P. Terrier, et al. 2005. « Limb Salvage with Isolated Perfusion for Soft Tissue Sarcoma: Could Less TNF-Alpha Be Better? » *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 16 (7): 1061-68. https://doi.org/10.1093/annonc/mdi229.

Bonvalot, S., M.-C. Missana, A. Le Cesne, G. Missenard, D. Vanel, P. Terrier, et C. Le Péchoux. 2006. « [Function preserving surgery of limb sarcomas: history and improvements] ». *Cancer Radiotherapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique* 10 (6-7): 416-24. https://doi.org/10.1016/j.canrad.2006.05.015.

Bonvalot, Sylvie, Antonin Levy, Philippe Terrier, Dimitri Tzanis, Sara Bellefqih, Axel Le Cesne, et Cécile Le Péchoux. 2017. « Primary Extremity Soft Tissue Sarcomas: Does Local Control Impact Survival? » *Annals of Surgical Oncology* 24 (1): 194-201. https://doi.org/10.1245/s10434-016-5462-2.

Brunet, M., A. Crombé, S. Cousin, L. Vanhersecke, F. Le Loarer, A. Bessede, et A. Italiano. 2022. « Mature Tertiary Lymphoid Structure Is a Specific Biomarker of Cancer Immunotherapy and Does Not Predict Outcome to Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 33 (10): 1084-85. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.06.007.

Bruno, Tullia C. 2020. « New Predictors for Immunotherapy Responses Sharpen Our View of the Tumour Microenvironment ». *Nature* 577 (7791): 474-76. https://doi.org/10.1038/d41586-019-03943-0.

Cabrita, Rita, Martin Lauss, Adriana Sanna, Marco Donia, Mathilde Skaarup Larsen, Shamik Mitra, Iva Johansson, et al. 2020. « Tertiary Lymphoid Structures Improve Immunotherapy and Survival in Melanoma ». *Nature* 577 (7791): 561-65. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1914-8.

Callegaro, Dario, Rosalba Miceli, Sylvie Bonvalot, Peter Ferguson, Dirk C. Strauss, Antonin Levy, Anthony Griffin, et al. 2016. « Development and External Validation of Two Nomograms to Predict Overall Survival and Occurrence of Distant Metastases in Adults after Surgical Resection of Localised Soft-Tissue Sarcomas of the Extremities: A Retrospective Analysis ». *The Lancet. Oncology* 17 (5): 671-80. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00010-3.

Casali, P. G., N. Abecassis, H. T. Aro, S. Bauer, R. Biagini, S. Bielack, S. Bonvalot, et al. 2018. « Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (Suppl 4): iv51-67. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy096.

Chen, Lingling, Teniola Oke, Nicholas Siegel, Gady Cojocaru, Ada J. Tam, Richard L. Blosser, Jessica Swailes, et al. 2020. « The Immunosuppressive Niche of Soft-Tissue Sarcomas Is Sustained by Tumor-Associated Macrophages and Characterized by Intratumoral Tertiary Lymphoid Structures ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 26 (15): 4018-30. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3416.

Chibon, Frédéric, Pauline Lagarde, Sébastien Salas, Gaëlle Pérot, Véronique Brouste, Franck Tirode, Carlo Lucchesi, et al. 2010. « Validated Prediction of Clinical Outcome in Sarcomas and Multiple Types of Cancer on the Basis of a Gene Expression Signature Related to Genome Complexity ». *Nature Medicine* 16 (7): 781-87. https://doi.org/10.1038/nm.2174.

Clark, J., P. J. Rocques, A. J. Crew, S. Gill, J. Shipley, A. M. Chan, B. A. Gusterson, et C. S. Cooper. 1994. « Identification of Novel Genes, SYT and SSX, Involved in the t(X;18)(P11.2;Q11.2) Translocation Found in Human Synovial Sarcoma ». *Nature Genetics* 7 (4): 502-8. https://doi.org/10.1038/ng0894-502.

Coindre, J. M., P. Terrier, L. Guillou, V. Le Doussal, F. Collin, D. Ranchère, X. Sastre, M. O. Vilain, F. Bonichon, et B. N'Guyen Bui. 2001. « Predictive Value of Grade for Metastasis Development in the Main Histologic Types of Adult Soft Tissue Sarcomas: A Study of 1240 Patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group ». *Cancer* 91 (10): 1914-26. https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010515)91:10<1914::aid-cncr1214>3.0.co;2-3.

Coindre, J. M., M. Trojani, G. Contesso, M. David, J. Rouesse, N. B. Bui, A. Bodaert, I. De Mascarel, A. De Mascarel, et J. F. Goussot. 1986. « Reproducibility of a Histopathologic Grading System for Adult Soft Tissue Sarcoma ». *Cancer* 58 (2): 306-9. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860715)58:2<306::aid-cncr2820580216>3.0.co;2-7.

Coindre, Jean-Michel. 2006. « Grading of Soft Tissue Sarcomas: Review and Update ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130 (10): 1448-53. https://doi.org/10.5858/2006-130-1448-GOSTSR.

Correa, Hernán. 2016. « Li-Fraumeni Syndrome ». *Journal of Pediatric Genetics* 5 (2): 84-88. https://doi.org/10.1055/s-0036-1579759.

Courtiol, Pierre, Charles Maussion, Matahi Moarii, Elodie Pronier, Samuel Pilcer, Meriem Sefta, Pierre Manceron, et al. 2019. « Deep Learning-Based Classification of Mesothelioma Improves Prediction of Patient Outcome ». *Nature Medicine* 25 (10): 1519-25. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0583-3.

Croce, Sabrina, et Frédéric Chibon. 2021. « Molecular Prognostication of Uterine Smooth Muscle Neoplasms: From CGH Array to CINSARC Signature and Beyond ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 60 (3): 129-37. https://doi.org/10.1002/gcc.22906.

Crombé, Amandine, Pierre-Jean Marcellin, Xavier Buy, Eberhard Stoeckle, Véronique Brouste, Antoine Italiano, François Le Loarer, et Michèle Kind. 2019. « Soft-Tissue Sarcomas: Assessment of MRI Features Correlating with Histologic Grade and Patient Outcome ». *Radiology* 291 (3): 710-21. https://doi.org/10.1148/radiol.2019181659.

Delattre, O., J. Zucman, B. Plougastel, C. Desmaze, T. Melot, M. Peter, H. Kovar, I. Joubert, P. de Jong, et G. Rouleau. 1992. « Gene Fusion with an ETS DNA-Binding Domain Caused by Chromosome Translocation in Human Tumours ». *Nature* 359 (6391): 162-65. https://doi.org/10.1038/359162a0.

Delespaul, Lucile, Candice Merle, Tom Lesluyes, Pauline Lagarde, Sophie Le Guellec, Gaëlle Pérot, Jessica Baud, et al. 2019. « Fusion-Mediated Chromosomal Instability Promotes Aneuploidy Patterns That Resemble Human Tumors ». *Oncogene* 38 (33): 6083-94. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0859-6.

Desmet, Christophe J., Tristan Gallenne, Alexandre Prieur, Fabien Reyal, Nils L. Visser, Ben S. Wittner, Marjon A. Smit, et al. 2013. « Identification of a Pharmacologically Tractable Fra-1/ADORA2B Axis Promoting Breast Cancer Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (13): 5139-44. https://doi.org/10.1073/pnas.1222085110.

Ducimetière, F., A. Lurkin, D. Ranchère-Vince, A.-V. Decouvelaere, S. Isaac, C. Claret-Tournier, Y. Suignard, et al. 2010. « [Incidence rate, epidemiology of sarcoma and molecular biology. Preliminary results from EMS study in the Rhône-Alpes region] ». *Bulletin Du Cancer* 97 (6): 629-41. https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1117.

ESMO/European Sarcoma Network Working Group. 2014. « Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3 (septembre): iii102-112. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu254.

Farid, Mohamad, Elizabeth G. Demicco, Roberto Garcia, Linda Ahn, Pamela R. Merola, Angela Cioffi, et Robert G. Maki. 2014. « Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors ». *The Oncologist* 19 (2): 193-201. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0328.

Farzaliyev, Farhad, Rainer Hamacher, Hans-Ulrich Steinau Professor, Stefanie Bertram, et Lars Erik Podleska. 2020. « Secondary Angiosarcoma: A Fatal Complication of Chronic Lymphedema ». *Journal of Surgical Oncology* 121 (1): 85-90. https://doi.org/10.1002/jso.25598.

Ferrari, A., G. L. De Salvo, B. Brennan, M. M. van Noesel, A. De Paoli, M. Casanova, N. Francotte, et al. 2015. « Synovial Sarcoma in Children and Adolescents: The European Pediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group Prospective Trial (EpSSG NRSTS 2005) ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (3): 567-72. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu562.

Ferrari, Andrea, Alessandro Gronchi, Michela Casanova, Cristina Meazza, Lorenza Gandola, Paola Collini, Laura Lozza, Rossella Bertulli, Patrizia Olmi, et Paolo G. Casali. 2004. « Synovial Sarcoma: A Retrospective Analysis of 271 Patients of All Ages Treated at a Single Institution ». *Cancer* 101 (3): 627-34. https://doi.org/10.1002/cncr.20386.

Frebourg, Thierry, Svetlana Bajalica Lagercrantz, Carla Oliveira, Rita Magenheim, D. Gareth Evans, et European Reference Network GENTURIS. 2020. « Guidelines for the Li-Fraumeni and Heritable TP53-Related Cancer Syndromes ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 28 (10): 1379-86. https://doi.org/10.1038/s41431-020-0638-4.

Fridman, Wolf Herman, Franck Pagès, Catherine Sautès-Fridman, et Jérôme Galon. 2012. « The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (4): 298-306. https://doi.org/10.1038/nrc3245.

Galon, Jérôme, Anne Costes, Fatima Sanchez-Cabo, Amos Kirilovsky, Bernhard Mlecnik, Christine Lagorce-Pagès, Marie Tosolini, et al. 2006. « Type, Density, and Location of

Immune Cells within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795): 1960-64. https://doi.org/10.1126/science.1129139.

Grabellus, F., L. E. Podleska, S.-Y. Sheu, S. Bauer, C. Pöttgen, C. Kloeters, M. Hoiczyk, T. C. Lauenstein, K. W. Schmid, et G. Taeger. 2013. « Neoadjuvant Treatment Improves Capsular Integrity and the Width of the Fibrous Capsule of High-Grade Soft-Tissue Sarcomas ». *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 39 (1): 61-67. https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.10.009.

Gronchi, A., A. B. Miah, A. P. Dei Tos, N. Abecassis, J. Bajpai, S. Bauer, R. Biagini, et al. 2021. « Soft Tissue and Visceral Sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up☆ ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 32 (11): 1348-65. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.07.006.

Gronchi, Alessandro, Stefano Ferrari, Vittorio Quagliuolo, Javier Martin Broto, Antonio Lopez Pousa, Giovanni Grignani, Umberto Basso, et al. 2017. « Histotype-Tailored Neoadjuvant Chemotherapy versus Standard Chemotherapy in Patients with High-Risk Soft-Tissue Sarcomas (ISG-STS 1001): An International, Open-Label, Randomised, Controlled, Phase 3, Multicentre Trial ». *The Lancet. Oncology* 18 (6): 812-22. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30334-0.

Gronchi, Alessandro, Salvatore Lo Vullo, Chiara Colombo, Paola Collini, Silvia Stacchiotti, Luigi Mariani, Marco Fiore, et Paolo Giovanni Casali. 2010. « Extremity Soft Tissue Sarcoma in a Series of Patients Treated at a Single Institution: Local Control Directly Impacts Survival ». *Annals of Surgery* 251 (3): 506-11. https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181cf87fa.

Guillou, Louis, et Alain Aurias. 2010. « Soft Tissue Sarcomas with Complex Genomic Profiles ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 456 (2): 201-17. https://doi.org/10.1007/s00428-009-0853-4.

Helmink, Beth A., Sangeetha M. Reddy, Jianjun Gao, Shaojun Zhang, Rafet Basar, Rohit Thakur, Keren Yizhak, et al. 2020. « B Cells and Tertiary Lymphoid Structures Promote Immunotherapy Response ». *Nature* 577 (7791): 549-55. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1922-8.

Honoré, C., P. Méeus, E. Stoeckle, et S. Bonvalot. 2015. « Soft Tissue Sarcoma in France in 2015: Epidemiology, Classification and Organization of Clinical Care ». *Journal of Visceral Surgery* 152 (4): 223-30. https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2015.05.001.

Hoshida, Yujin, Augusto Villanueva, Masahiro Kobayashi, Judit Peix, Derek Y. Chiang, Amy Camargo, Supriya Gupta, et al. 2008. « Gene Expression in Fixed Tissues and Outcome in Hepatocellular Carcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 359 (19): 1995-2004. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804525.

Iannone, Raffaella, Lucio Miele, Piera Maiolino, Aldo Pinto, et Silvana Morello. 2013. « Blockade of A2b Adenosine Receptor Reduces Tumor Growth and Immune Suppression Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in a Mouse Model of Melanoma ». *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15 (12): 1400-1409. https://doi.org/10.1593/neo.131748.

Jensen, Trine O., Henrik Schmidt, Holger Jon Møller, Morten Høyer, Maciej Bogdan Maniecki, Pia Sjoegren, Ib Jarle Christensen, et Torben Steiniche. 2009. « Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American*

Society of Clinical Oncology 27 (20): 3330-37. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.9919.

Jo, Vickie Y., et Christopher D. M. Fletcher. 2014. « WHO Classification of Soft Tissue Tumours: An Update Based on the 2013 (4th) Edition ». *Pathology* 46 (2): 95-104. https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000050.

Kendal, Joseph K., Michael S. Shehata, Serena Y. Lofftus, et Joseph G. Crompton. 2023. « Cancer-Associated B Cells in Sarcoma ». *Cancers* 15 (3): 622. https://doi.org/10.3390/cancers15030622.

Kim, Jinho, Hyunjung Kim, Min-Seok Lee, Heetak Lee, Yeon Jeong Kim, Woo Yong Lee, Seong Hyeon Yun, et al. 2023. « Transcriptomes of the tumor-adjacent normal tissues are more informative than tumors in predicting recurrence in colorectal cancer patients ». *Journal of Translational Medicine* 21 (1): 209. https://doi.org/10.1186/s12967-023-04053-2.

Lacroix, Matthieu, Laetitia K. Linares, Natalia Rueda-Rincon, Katarzyna Bloch, Michela Di Michele, Carlo De Blasio, Caroline Fau, et al. 2021. « The Multifunctional Protein E4F1 Links P53 to Lipid Metabolism in Adipocytes ». *Nature Communications* 12 (1): 7037. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27307-3.

Lacroix, Matthieu, Romain Riscal, Giuseppe Arena, Laetitia Karine Linares, et Laurent Le Cam. 2020. « Metabolic Functions of the Tumor Suppressor P53: Implications in Normal Physiology, Metabolic Disorders, and Cancer ». *Molecular Metabolism* 33 (mars): 2-22. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002.

Le Loarer, François, Daniel Pissaloux, Sarah Watson, Catherine Godfraind, Louise Galmiche-Rolland, Karen Silva, Laetitia Mayeur, et al. 2019. « Clinicopathologic Features of CIC-NUTM1 Sarcomas, a New Molecular Variant of the Family of CIC-Fused Sarcomas ». *The American Journal of Surgical Pathology* 43 (2): 268-76. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001187.

Le Loarer, Francois, Lei Zhang, Christopher D. Fletcher, Agnes Ribeiro, Samuel Singer, Antoine Italiano, Agnes Neuville, et al. 2014. « Consistent SMARCB1 Homozygous Deletions in Epithelioid Sarcoma and in a Subset of Myoepithelial Carcinomas Can Be Reliably Detected by FISH in Archival Material ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 53 (6): 475-86. https://doi.org/10.1002/gcc.22159.

Leemans, C. René, Boudewijn J. M. Braakhuis, et Ruud H. Brakenhoff. 2011. « The Molecular Biology of Head and Neck Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (1): 9-22. https://doi.org/10.1038/nrc2982.

Leone, Robert D., Maureen R. Horton, et Jonathan D. Powell. 2015. « Something in the Air: Hyperoxic Conditioning of the Tumor Microenvironment for Enhanced Immunotherapy ». *Cancer Cell* 27 (4): 435-36. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.014.

Lesluyes, Tom, Jessica Baud, Gaëlle Pérot, Céline Charon-Barra, Axel You, Isabelle Valo, Céline Bazille, et al. 2019. « Genomic and Transcriptomic Comparison of Post-Radiation versus Sporadic Sarcomas ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 32 (12): 1786-94. https://doi.org/10.1038/s41379-019-0300-2.

Mangiola, Annunziato, Nathalie Saulnier, Pasquale De Bonis, Daniela Orteschi, Gigliola Sica, Gina Lama, Benedetta Ludovica Pettorini, et al. 2013. « Gene Expression Profile of Glioblastoma Peritumoral Tissue: An Ex Vivo Study ». *PloS One* 8 (3): e57145. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057145.

Medrek, Catharina, Fredrik Pontén, Karin Jirström, et Karin Leandersson. 2012. « The Presence of Tumor Associated Macrophages in Tumor Stroma as a Prognostic Marker for Breast Cancer Patients ». *BMC Cancer* 12 (juillet): 306. https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-306.

Mellman, Ira, George Coukos, et Glenn Dranoff. 2011. « Cancer Immunotherapy Comes of Age ». *Nature* 480 (7378): 480-89. https://doi.org/10.1038/nature10673.

Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, et A. J. Levine. 1992. « The Mdm-2 Oncogene Product Forms a Complex with the P53 Protein and Inhibits P53-Mediated Transactivation ». *Cell* 69 (7): 1237-45. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-r.

Moons, Karel G. M., Andre Pascal Kengne, Diederick E. Grobbee, Patrick Royston, Yvonne Vergouwe, Douglas G. Altman, et Mark Woodward. 2012. « Risk Prediction Models: II. External Validation, Model Updating, and Impact Assessment ». *Heart (British Cardiac Society)* 98 (9): 691-98. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-301247.

Morello, Silvana, et Lucio Miele. 2014. « Targeting the Adenosine A2b Receptor in the Tumor Microenvironment Overcomes Local Immunosuppression by Myeloid-Derived Suppressor Cells ». *Oncoimmunology* 3: e27989. https://doi.org/10.4161/onci.27989.

Morello, Silvana, Aldo Pinto, Corrado Blandizzi, et Luca Antonioli. 2016. « Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Role of Adenosine ». *Oncoimmunology* 5 (3): e1108515. https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1108515.

Munn, David H., et Andrew L. Mellor. 2016. « IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance ». *Trends in Immunology* 37 (3): 193-207. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002.

Nakano, Kenji, et Shunji Takahashi. 2018. « Current Molecular Targeted Therapies for Bone and Soft Tissue Sarcomas ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3): 739. https://doi.org/10.3390/ijms19030739.

Neuville, Agnes, Dominique Ranchère-Vince, Angelo Paolo Dei Tos, Maria Cristina Montesco, Isabelle Hostein, Luisa Toffolatti, Frédéric Chibon, et al. 2013. « Impact of Molecular Analysis on the Final Sarcoma Diagnosis: A Study on 763 Cases Collected during a European Epidemiological Study ». *The American Journal of Surgical Pathology* 37 (8): 1259-68. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31828f51b9.

Ohta, Akio, Elieser Gorelik, Simon J. Prasad, Franca Ronchese, Dmitriy Lukashev, Michael K. K. Wong, Xiaojun Huang, et al. 2006. « A2A Adenosine Receptor Protects Tumors from Antitumor T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13132-37. https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103.

Ohta, Akio, Manasa Madasu, Meenakshi Subramanian, Radhika Kini, Graham Jones, Alexander Choukèr, Akiko Ohta, et Michail Sitkovsky. 2014. « Hypoxia-Induced and A2A Adenosine Receptor-Independent T-Cell Suppression Is Short Lived and Easily Reversible ». *International Immunology* 26 (2): 83-91. https://doi.org/10.1093/intimm/dxt045.

Patel, S. R. 2000. « Radiation-Induced Sarcoma ». *Current Treatment Options in Oncology* 1 (3): 258-61. https://doi.org/10.1007/s11864-000-0037-6.

Pedeutour, F., M. P. Simon, F. Minoletti, G. Barcelo, M. J. Terrier-Lacombe, P. Combemale, G. Sozzi, N. Ayraud, et C. Turc-Carel. 1996. « Translocation, t(17;22)(Q22;Q13), in Dermatofibrosarcoma Protuberans: A New Tumor-Associated Chromosome Rearrangement ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 72 (2-3): 171-74. https://doi.org/10.1159/000134178.

Penel, Nicolas, Jean-Michel Coindre, Antoine Giraud, Philippe Terrier, Dominique Ranchere-Vince, Françoise Collin, Sophie L. E. Guellec, et al. 2018. « Presentation and Outcome of Frequent and Rare Sarcoma Histologic Subtypes: A Study of 10,262 Patients with Localized Visceral/Soft Tissue Sarcoma Managed in Reference Centers ». *Cancer* 124 (6): 1179-87. https://doi.org/10.1002/cncr.31176.

Penel, Nicolas, Sophie El Bedoui, Yves-Marie Robin, et Gauthier Decanter. 2018. « [Dermatofibrosarcoma: Management] ». *Bulletin Du Cancer* 105 (11): 1094-1101. https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.08.008.

Petitprez, Florent, Aurélien de Reyniès, Emily Z. Keung, Tom Wei-Wu Chen, Cheng-Ming Sun, Julien Calderaro, Yung-Ming Jeng, et al. 2020. « B Cells Are Associated with Survival and Immunotherapy Response in Sarcoma ». *Nature* 577 (7791): 556-60. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1906-8.

Potter, Benjamin K., Paul F. Hwang, Jonathan A. Forsberg, Chadwick B. Hampton, John C. Graybill, George E. Peoples, et Alexander Stojadinovic. 2013. « Impact of Margin Status and Local Recurrence on Soft-Tissue Sarcoma Outcomes ». *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 95 (20): e151. https://doi.org/10.2106/JBJS.L.01149.

Poultsides, George A., Thuy B. Tran, Eduardo Zambrano, Lucas Janson, David G. Mohler, Matthew W. Mell, Raffi S. Avedian, et al. 2015. « Sarcoma Resection With and Without Vascular Reconstruction: A Matched Case-Control Study ». *Annals of Surgery* 262 (4): 632-40. https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001455.

Ray-Coquard, I., M. C. Montesco, J. M. Coindre, A. P. Dei Tos, A. Lurkin, D. Ranchère-Vince, A. Vecchiato, et al. 2012. « Sarcoma: Concordance between Initial Diagnosis and Centralized Expert Review in a Population-Based Study within Three European Regions ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (9): 2442-49. https://doi.org/10.1093/annonc/mdr610.

Ryzhov, Sergey, Sergey V. Novitskiy, Anna E. Goldstein, Asel Biktasova, Michael R. Blackburn, Italo Biaggioni, Mikhail M. Dikov, et Igor Feoktistov. 2011. « Adenosinergic Regulation of the Expansion and Immunosuppressive Activity of CD11b+Gr1+ Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (11): 6120-29. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101225.

Saiag, Philippe, Jean-Jacques Grob, Celeste Lebbe, Josep Malvehy, Veronique del Marmol, Hubert Pehamberger, Ketty Peris, et al. 2015. « Diagnosis and Treatment of Dermatofibrosarcoma Protuberans. European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 51 (17): 2604-8. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.108.

Sautès-Fridman, Catherine, Florent Petitprez, Julien Calderaro, et Wolf Herman Fridman. 2019. « Tertiary Lymphoid Structures in the Era of Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews. Cancer* 19 (6): 307-25. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6.

Sitkovsky, Michail V. 2009. « T Regulatory Cells: Hypoxia-Adenosinergic Suppression and Re-Direction of the Immune Response ». *Trends in Immunology* 30 (3): 102-8. https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.002.

Sorrentino, Claudia, Lucio Miele, Amalia Porta, Aldo Pinto, et Silvana Morello. 2015. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to A2B Adenosine Receptor-Induced VEGF Production and Angiogenesis in a Mouse Melanoma Model ». *Oncotarget* 6 (29): 27478-89. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4393.

Spalato-Ceruso, Mariella, Fanny Bouteiller, Jean-Philippe Guegan, Maud Toulmonde, Alban Bessede, Michèle Kind, Sophie Cousin, et al. 2022. « Pembrolizumab Combined with

Low-Dose Cyclophosphamide and Intra-Tumoral Injection of the Toll-like Receptor 4 Agonist G100 in Patients with Advanced Pretreated Soft Tissue Sarcoma: Results from the PEMBROSARC Basket Study ». *Journal of Hematology & Oncology* 15 (1): 157. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01377-2.

Stagg, John, Upulie Divisekera, Nicole McLaughlin, Janelle Sharkey, Sandra Pommey, Delphine Denoyer, Karen M. Dwyer, et Mark J. Smyth. 2010. « Anti-CD73 Antibody Therapy Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4): 1547-52. https://doi.org/10.1073/pnas.0908801107.

Stoeckle, E., H. Gardet, J.-M. Coindre, G. Kantor, F. Bonichon, Y. Milbéo, L. Thomas, A. Avril, et B. N. Bui. 2006. « Prospective Evaluation of Quality of Surgery in Soft Tissue Sarcoma ». *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 32 (10): 1242-48. https://doi.org/10.1016/j.ejso.2006.05.005.

Stoeckle, E., A. Italiano, N. Stock, M. Kind, G. Kantor, J.-M. Coindre, et B. N. Bui. 2008. « [Surgical margins in soft tissue sarcoma] ». *Bulletin Du Cancer* 95 (12): 1199-1204. https://doi.org/10.1684/bdc.2008.0765.

Stoeckle, E., A. Michot, B. Henriques, P. Sargos, C. Honoré, G. Ferron, P. Meeus, F. Babre, et S. Bonvalot. 2016. « [Surgery for soft-tissue sarcomas of the limbs and trunk wall] ». *Cancer Radiotherapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique* 20 (6-7): 657-65. https://doi.org/10.1016/j.canrad.2016.07.068.

Stoeckle, Eberhard, Jean-Michel Coindre, Michèle Kind, Guy Kantor, et Binh N. Bui. 2009. « Evaluating Surgery Quality in Soft Tissue Sarcoma ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 179: 229-42. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77960-5_14.

Stojadinovic, A., D. P. Jaques, D. H. Leung, J. H. Healey, et M. F. Brennan. 2001. « Amputation for Recurrent Soft Tissue Sarcoma of the Extremity: Indications and Outcome ». *Annals of Surgical Oncology* 8 (6): 509-18. https://doi.org/10.1007/s10434-001-0509-3.

Sugimoto, Motokazu, Shuichi Mitsunaga, Kiyoshi Yoshikawa, Yuichiro Kato, Naoto Gotohda, Shinichiro Takahashi, Masaru Konishi, et al. 2014. « Prognostic Impact of M2 Macrophages at Neural Invasion in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of the Pancreas ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (11): 1900-1908. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.010.

Taylor, Barry S., Jordi Barretina, Robert G. Maki, Cristina R. Antonescu, Samuel Singer, et Marc Ladanyi. 2011. « Advances in Sarcoma Genomics and New Therapeutic Targets ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (8): 541-57. https://doi.org/10.1038/nrc3087.

Toulmonde, Maud, Axel Le Cesne, Jean Mendiboure, Jean-Yves Blay, Sophie Piperno-Neumann, Christine Chevreau, Corinne Delcambre, et al. 2014. « Long-Term Recurrence of Soft Tissue Sarcomas: Prognostic Factors and Implications for Prolonged Follow-Up ». *Cancer* 120 (19): 3003-6. https://doi.org/10.1002/cncr.28836.

Trojani, M., G. Contesso, J. M. Coindre, J. Rouesse, N. B. Bui, A. de Mascarel, J. F. Goussot, M. David, F. Bonichon, et C. Lagarde. 1984. « Soft-Tissue Sarcomas of Adults; Study of Pathological Prognostic Variables and Definition of a Histopathological Grading System ». *International Journal of Cancer* 33 (1): 37-42. https://doi.org/10.1002/ijc.2910330108.

Vanhersecke, Lucile, Antoine Bougouin, Amandine Crombé, Maxime Brunet, Casimir Sofeu, Marie Parrens, Hugo Pierron, et al. 2023. « Standardized Pathology Screening of

Mature Tertiary Lymphoid Structures in Cancers ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 103 (5): 100063. https://doi.org/10.1016/j.labinv.2023.100063.

Vanhersecke, Lucile, Maxime Brunet, Jean-Philippe Guégan, Christophe Rey, Antoine Bougouin, Sophie Cousin, Sylvestre Le Moulec, et al. 2021. « Mature Tertiary Lymphoid Structures Predict Immune Checkpoint Inhibitor Efficacy in Solid Tumors Independently of PD-L1 Expression ». *Nature Cancer* 2 (8): 794-802. https://doi.org/10.1038/s43018-021-00232-6.

Wu, Yan'an, Xuetao Wang, Fangbo Wu, Ruolei Huang, Fangqin Xue, Guantao Liang, Min Tao, Pengwei Cai, et Yi Huang. 2012. « Transcriptome Profiling of the Cancer, Adjacent Non-Tumor and Distant Normal Tissues from a Colorectal Cancer Patient by Deep Sequencing ». *PloS One* 7 (8): e41001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041001.

Young, Arabella, Deepak Mittal, John Stagg, et Mark J. Smyth. 2014. « Targeting Cancer-Derived Adenosine: New Therapeutic Approaches ». *Cancer Discovery* 4 (8): 879-88. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0341.

Charte de l'intégrité scientifique