

Faculté de Médecine

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 septembre 2020

Par **Leslie LEMNOS**

Née le 30 mars 1990 à Pointe-à-Pitre (Guadeloupe)

**Analyse des anomalies chromosomiques et
des gènes du cycle cellulaire dans une série de
32 chordomes**

Thèse dirigée par Henri SALLE

Examineurs :

M. François CAIRE - Professeur des universités - Chu Limoges

M. François LABROUSSE - Professeur des universités - Chu Limoges

M. Aymeric ROUCHAUD - Professeur des universités - Chu Limoges

Mme. Sylvie BOURTHOUMIEU - Maître de conférence des universités - Chu Limoges

M. Henri SALLE - Praticien hospitalier - Chu Limoges



Faculté de Médecine

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 septembre 2020

Par Leslie LEMNOS

Née le 30 mars 1990 à Pointe-à-Pitre (Guadeloupe)

**Analyse des anomalies chromosomiques et
des gènes du cycle cellulaire dans une série de
32 chordomes**

Thèse dirigée par Henri SALLE

Examineurs :

M. François CAIRE - Professeur des universités - Chu Limoges

M. François LABROUSSE - Professeur des universités - Chu Limoges

M. Aymeric ROUCHAUD - Professeur des universités - Chu Limoges

Mme. Sylvie BOURTHOUMIEU - Maître de conférence des universités - Chu Limoges

M. Henri SALLE - Praticien hospitalier - Chu Limoges



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 01 octobre 2019

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020)
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION

DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE

MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE

MOREAU Stéphane

EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

BALLOUHEY Quentin

CHIRURGIE INFANTILE

BARRAUD Olivier

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

BEN AHMED Sabrina

CHIRURGIE VASCULAIRE

BOURTHOUMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE

COUVE-DEACON Elodie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

DUCHESNE Mathilde

ANATOMIE PATHOLOGIE

DURAND Karine

BIOLOGIE CELLULAIRE

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

JACQUES Jérémie

GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE

JESUS Pierre

NUTRITION

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE et
CARDIOVASCULAIRE

LERAT Justine

O.R.L.

LIA Anne-Sophie

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

RIZZO David

HEMATOLOGIE

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

WOILLARD Jean-Baptiste

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie

(Responsable du département de Médecine
Générale)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 1^{er} septembre 2019 au 31 août 2022)

LAUCHET Nadège (du 1^{er} septembre 2017 au 31 août 2020)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 1^{er} septembre 2018 au 31 août 2021)

PROFESSEURS EMERITES

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2018 au 31.08.2020

BESSEDE Jean-Pierre du 01-09-2018 au 31-08-2020

BUCHON Daniel du 01-09-2019 au 31-08-2021

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2019

MOREAU Jean-Jacques du 01-09-2019 au 31-08-2020

TREVES Richard du 01-09-2019 au 31-08-2021

TUBIANA-MATHIEU Nicole du 01-09-2018 au 31-08-2020

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2019 au 31.08.2020

VIROT Patrice du 01.09.2019 au 31.08.2020

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2019

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

AUDITEAU Emilie	EPIDEMOLOGIE (CEBIMER)
DAURIAT Benjamin	HISTOLOGIE, EMBRIOLOGIE ET CYTOGENETIQUE
DERBAL Sophiane	CHIRURGIE ANATOMIE
DOUCHEZ Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUPONT Marine	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
DURIEUX Marie-Fleur	PARASITOLOGIE
GUYOT Anne	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HERMINEAUD Bertrand	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HUMMEL Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LEFEBVRE Cyrielle	ANESTHESIE REANIMATION
PIHAN Franck	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
RIAHI Edouard	MEDECINE NUCLEAIRE
RIVAILLE Thibaud	CHIRURGIE-ANATOMIE
SANSON Amandine	ANESTHESIE REANIMATION
TCHU HOI NGNO Princia	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ALBOUYS Jérémie	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
ARMENDARIZ-BARRIGA Matéo	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBLANC Mathilde	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BAÏSSE Arthur	REANIMATION POLYVALENTE
BEEHARRY Adil	CARDIOLOGIE

BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOSETTI Anaïs	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
BRISSET Josselin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
CHAUVET Romain	CHIRURGIE VASCULAIRE
CISSE Fatou	PSYCHIATRIE
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE
DESCHAMPS Nathalie	NEUROLOGIE
DESVAUX Edouard	MEDECINE GERIATRIQUE
DUVAL Marion	NEPHROLOGIE
EL OUAFI Zhour	NEPHROLOGIE
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
FROGET Rachel	CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (pédiatrie)
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GHANEM Khaled	ORL
GILBERT Guillaume	REANIMATION POLYVALENTE
GUTTIEREZ Blandine	MALADIES INFECTIEUSES
HANGARD Pauline	PEDIATRIE
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
HESSAS-EBELY Miassa	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
KRETZSCHMAR Tristan	PSYCHIATRE d'ADULTES
LACOSTE Marie	MALADIES INFECTIEUSES
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LAHMADI Sanae	NEUROLOGIE

LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LEGROS Maxime	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
LEHMANN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
MAURIANGE TURPIN Gladys	RADIOTHERAPIE
MEUNIER Amélie	ORL
MICLE Liviu-Ionut	CHIRURGIE INFANTILE
MOWENDABEKA Audrey	PEDIATRIE
ORLIAC Hélène	RADIOTHERAPIE
PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE ET POLYCLINIQUE
PELETTE Romain	CHIRURGIE UROLOGIE et ANDROLOGIE
PEYRAMAURE Clémentine	ONCOLOGIE MEDICALE
PLAS Camille	MEDECINE INTERNE B
QUILBE Sébastien	OPHTALMOLOGIE
SIMONNEAU Yannick	PNEUMOLOGIE
SURGE Jules	NEUROLOGIE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE
VERLEY Jean-Baptiste	PSYCHIATRIE ENFANT ADOLESCENT
VIDAL Thomas	OPHTALMOLOGIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

BERTRAND Adeline

SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

MATHIEU Pierre-Alain CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et
TRAUMATOLOGIQUE

Il n'y a pas de réussites faciles, ni d'échecs définitifs. Marcel Proust

Remerciements

À monsieur le Professeur François CAIRE,

Je vous remercie d'avoir accepté de m'enseigner la neurochirurgie et les principes de la profession de neurochirurgien et ce dès mes premiers pas d'interne. Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

À monsieur le Professeur François LABROUSSE,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger notre travail. Avec votre gentillesse et votre bienveillance, vous m'avez initié à l'anatomie pathologique et à la recherche. Je vous en remercie.

À monsieur le Professeur Aymeric ROUCHAUD,

Cela me fait vraiment très plaisir que tu aies accepté d'être membre de mon jury de thèse. Mon semestre en neuroradiologie interventionnelle a été marqué de moments inoubliables. Je t'en remercie.

À madame le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger notre travail. Merci de votre patience et de votre gentillesse durant mes travaux dans votre service de cytogénétique.

À monsieur le Docteur Henri SALLE,

Merci de m'avoir proposée de travailler avec toi sur les chordomes, d'en faire mon sujet de thèse et de partager avec moi toutes tes « astuces » au bloc.

À monsieur le Professeur Jean-Jacques MOREAU,

Je vous remercie de m'avoir transmis vos connaissances et votre rigueur de travail au début de mon internat.

À monsieur le Professeur Froelich et à madame le Professeur Adle-Biassette,

Merci pour votre collaboration essentielle à ce travail.

À madame le Docteur Karine DURAND,

Merci pour ton accompagnement durant cette année de Master 2 et ton aide pour la rédaction de ce travail.

À monsieur le Docteur Mustapha ALI BENALI,

Vous avez su me transmettre votre passion pour la neurochirurgie et son histoire pendant toutes ces années. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

À monsieur le Docteur Patrick Alain FAURE,

Grâce à ta gentillesse, ta patience et ta bonne humeur, il m'a toujours été agréable de t'assister au bloc. Merci de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas au bloc et d'avoir gardé ton calme en toutes circonstances (et ce même en cas de b...).

À monsieur le Docteur Édouard Marcel GUEYE,

Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes enseignements pendant toutes ces années.

À monsieur le Docteur Clément GANTOIS,

Ton calme et ta sérénité au bloc m'ont toujours impressionnée. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton accompagnement pendant mes premiers gestes chirurgicaux.

À l'équipe de bloc de neurochirurgie,

Grâce à vous, j'ai toujours été heureuse de descendre au bloc. Merci de votre gentillesse et de votre soutien précieux au cours de toutes ces années d'internat.

Au service de neurochirurgie,

Infirmières, infirmiers, secrétaires, aides-soignantes, agents et cadres : cela a été un plaisir de travailler avec vous.

À l'équipe d'anesthésie de neurochirurgie,

Cela a été un plaisir de travailler avec vous.

Au service d'anatomie pathologique et à la plateforme de Biologie moléculaire,

Merci de m'avoir accueillie dans votre service pendant un an et de m'avoir accompagnée durant mes travaux de recherche sur les chordomes qui m'ont permis de rédiger cette thèse.

Au service de neuroradiologie interventionnelle,

Au Professeur Mounayer et à son équipe : merci de m'avoir accueillie dans votre service durant ces 6 mois. Cela a été une joie de travailler avec vous et d'avoir l'occasion de le faire encore régulièrement.

Au service de chirurgie maxillo-faciale,

Au Professeur Brie et à son équipe : je vous remercie de m'avoir tant appris durant ce semestre.

Au service de neurochirurgie de Tours,

Ces quelques mois à vos côtés m'ont beaucoup appris. Merci pour tous vos enseignements dans cette ambiance quelque peu déconcertante !

À la Société Française de Neurochirurgie,

Je vous remercie de m'avoir attribuée cette bourse de recherche afin de réaliser ce travail.

À mes co-internes,

Grâce à vous cet internat a été plus agréable.

À mes amis,

Merci pour votre soutien tout au long de ces années marquées par ces moments inoubliables grâce à vous.

À mes parents, à mon frère et ma sœur, à toute ma famille,

Je vous remercie de m'avoir accompagnée depuis toujours et soutenue avec ferveur durant mes longues études. Je vous aime de tout cœur.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Abréviations	20
Introduction	21
I. Généralités et contexte scientifique	22
I.1. Origine embryologique : la notochorde.....	22
I.2. Caractéristiques immunohistochimiques des chordomes.....	23
I.3. Génétique des chordomes.....	27
I.4. Généralité sur le cycle cellulaire.....	30
I.4.1. Acteurs du cycle cellulaire	30
I.4.2. La régulation du cycle cellulaire.....	31
II. Objectifs	32
III. Matériel et méthodes.....	33
III.1. Cohorte de patients.....	33
III.2. Analyse histopathologique	33
III.3. Immunohistochimie	33
III.4. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) par Hybridation Genomique Comparative (aCGH)	34
III.5. Next Generation Sequencing	36
III.5.1. Préparation des librairies.....	36
III.5.2. Amplification clonale par PCR en émulsion	38
III.5.3. Chargement de la puce et réaction de séquençage.....	38
III.5.4. Analyse bioinformatique des données	39
III.6. Analyse statistique	40
IV. Résultats.....	41
IV.1. Caractéristiques cliniques de notre cohorte	41
IV.2. Histologie et immunohistochimie	42
IV.3. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN	43
IV.4. Next Generation Sequencing (NGS).....	48
IV.5. Vérifications des mutations trouvées par séquençage Sanger.....	51
V. Discussion	53
V.1. Anatomie pathologique.....	53
V.2. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN	53
V.2.1. Aspects techniques.....	53
V.2.2. Cohorte de patients.....	54
V.3. Next Generation Sequencing.....	57
V.3.1. Cohorte de patients.....	57
V.3.2. Analyse comparative avec d'autres tumeurs osseuses	59
V.4. Perspectives.....	59
V.5. Limites.....	59
Conclusion	60
Références bibliographiques	61
Annexes	65
Serment d'Hippocrate.....	77

Table des illustrations

Figure 1. Embryogénèse du tube neural. D'après https://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/diffdev1/page11.html consulté le 17/06/2019 (9).....	22
Figure 2. Segmentation du sclérotome. D'après http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Squelette/col%20vertebr.png consulté le 17/06/19 (10).....	23
Figure 3. Cas 29 - Chordome classique (grossissement 400) : cellule physaliphore (flèche) comportant une vacuole*.....	24
Figure 4. Cas 27 - Chordome chondroïde (grossissement 150) : cellule physaliphore (flèche) avec matrice chondroïde	25
Figure 5. Cas 30 - Chordome myxoïde (grossissement 200) : cellule fusiforme (flèche) avec matrice myxoïde.....	26
Figure 6. Chordome dédifférencié d'après George <i>et al.</i>	26
Figure 7. Activation du récepteur de l'EGF et des voies de signalisation en aval. D'après Lièvre <i>et al.</i> (19)	29
Figure 8. Le cycle de division cellulaire et sa régulation, adapté d'après Meijer. (27)	31
Figure 9. Étapes Hybridation Génomique Comparative array (aCGH).....	34
Figure 10. Étapes Next Generation Sequencing d'après Li <i>et al.</i>	36
Figure 11. Cas 27 - Chordome chondroïde (A) avec immunomarquage positif pour brachyury (B), AE1/AE3 (C), EMA(D), PS 100 (E) et Index KI67 à 17 % (F).....	43
Figure 12. Fréquence des CNV trouvés dans notre cohorte de patients.....	45
Figure 13. Association significative entre tumeurs primitives et présence des délétions 9p24 (p=0,023), 9q21 (p=0,045), 9q31 (p=0,031) et 9q33 (p=0,025).....	46
Figure 14. Fréquence (%) duplication 8p23.2 en fonction du sexe	47
Figure 15. Fréquence (%) de la duplication 7q31 en fonction de la localisation	47
Figure 16. Anomalies chromosomiques associés aux critères histologiques	48
Figure 17. Vérification Sanger CDKN1A c* 20C>T	51
Figure 18. Vérification Sanger PPP2R3B -84G>A	51
Figure 19. Vérification Sanger PPP2R3B c.457 G>A.....	52
Figure 20. Vérification Sanger CDKN2B -3C>A.....	52

Table des tableaux

Tableau 1 : Variations du nombre de copie (CNV) décrites dans la littérature	28
Tableau 2 : Caractéristique des patients	41
Tableau 3 : Caractéristiques histologiques	42
Tableau 4 : Liste des anomalies trouvées en NGS	49
Tableau 5 : Association entre les variants mis en évidence dans les tumeurs primitives et les données clinicopathologiques.....	50

Abréviations

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce à ADN
aCGH ou CGH array : Array Comparative Genomic Hybridization
ADN : Acide désoxyribonucléique
BCL : Base Call Format
CDC25B : Cell Division Cycle 25 homologue B
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CDKN1A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A et CDKN2B : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A et 2B
Chr : Chromosome
CK : Cytokératine
CNV : Variant du Nombre de Copies
COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
dbSNP : Single Nucleotide Polymorphism Database
Del : Délétion
Dup : Duplication
EMA : Epithelial Membrane Antigen
FISH : Hybridation *In Situ* en Fluorescence
GATK : Genome Analysis ToolKit
HPS : Hemalun Phloxine Safran
NGS : Next Generation Sequencing
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PIK3: Phosphoinositide 3-kinase
PPP2R3A : Protein Phosphatase 2 regulatory subunit B Alpha
PRB : Protéine du Rétinoblastome
PS100 : Protéine S100
PTEN : Phosphatase and TENsing homolog
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
TBX : T Box Transcriptor factor
TGFB β : Transforming Growth Factor Bêta
UTR : UnTranslated Region
VCF : Variant Call Format

Introduction

Le chordome est une tumeur osseuse rare avec une incidence de 0,08 pour 100 000 habitants (1). Cette tumeur, dérivée de vestiges embryonnaires notochordaux, est découverte le plus souvent chez l'adulte de sexe masculin (sex ratio H/F : 1,8/1) âgé entre 50 et 70 ans (2). Elle se développe aux extrémités du rachis avec une fréquence de 37 % au niveau du clivus, 51 % au niveau du sacrum et dans de rares cas sur le reste du rachis, cervical (6 %) ou dorsal (3 %) (3).

À l'heure actuelle, le traitement le plus efficace est la chirurgie. Or, une résection complète R0 sans résidu est souvent impossible à obtenir, notamment au niveau du clivus. En conséquence, le risque de récurrence reste élevé atteignant 68 % dans les localisations intracrâniennes (4). Au niveau rachidien, ce risque varie entre 14 et 80 % en fonction de la technique chirurgicale (5). Les traitements complémentaires par radiothérapie et protonthérapie semblent retarder la survenue d'une récurrence (6). Cependant, le pronostic des chordomes reste sombre avec un taux de survie à 5 ans de 67,6 %, à 10 ans de 39,9 %, à 15 ans de 39,2 %, et à 20 ans de 13,1 % (1).

Depuis quelques années, différents travaux ont porté sur l'analyse des processus oncogénétiques des chordomes. De plus, en 2016, Tauziède-Espariat *et al.* ont mis en évidence dans une série rétrospective de 287 chordomes, trois facteurs pronostics pertinents à savoir : l'index mitotique, l'index Ki67 qui reflète le nombre de cellules entrées dans le cycle mitotique et l'intensité de l'expression de la protéine p53 qui est un marqueur de l'apoptose (7). Ces résultats indiquent que les altérations du cycle cellulaire semblent jouer un rôle important dans l'oncogenèse des chordomes.

Afin de mieux préciser les mécanismes oncogénétiques des chordomes, nous avons recherché dans une série de 32 cas des anomalies chromosomiques par Hybridation Génomique Comparative sur puce à ADN (CGH array ou aCGH) et analysé un panel de 84 gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par Next Generation Sequencing (NGS) (8).

I. Généralités et contexte scientifique

I.1. Origine embryologique : la notochorde

Le chordome est dérivé des vestiges embryonnaires notochordaux. La notochorde se développe durant la 3^{ème} semaine de développement et constitue l'axe primitif de l'embryon. À ce stade, l'embryon est sous la forme d'un disque constitué d'une couche ectodermique (ectoblaste) et d'une couche endodermique (endoblaste). À partir de l'ectoblaste, des cellules migrent vers la ligne médiane pour former la ligne primitive dont l'épaississement antérieur est le nœud de Hansen (ou nœud primitif). Les cellules de la ligne primitive s'enfoncent par la suite en profondeur et latéralement en formant une 3^{ème} couche appelée mésoblaste. Les cellules de la région du nœud primitif s'invaginent en doigt de gant et migrent vers la région crâniale pour atteindre la membrane oropharyngée (région où les couches endodermique et ectodermique sont rattachées) formant la notochorde et la plaque préchordale. Au 18^{ème} jour de développement, le plancher de la notochorde fusionne avec l'endoderme. Puis, la notochorde définitive est formée par la prolifération de cellules notochordales qui s'entourent elles-mêmes d'une couche membraneuse homogène et épaisse formant une colonne solide et flexible (Figure 1).

Simultanément à la formation de la notochorde, les cellules du mésoblaste prolifèrent de chaque côté de la ligne médiane formant 3 structures : le mésoblaste para-axial se segmentant en somites, le mésoblaste intermédiaire à l'origine du cordon néphrogène et le mésoblaste latéral ébauche des cavités séreuses du tronc et de la paroi du tube digestif. L'ectoblaste devient le neuroectoderme dont une partie formera le tube neural.

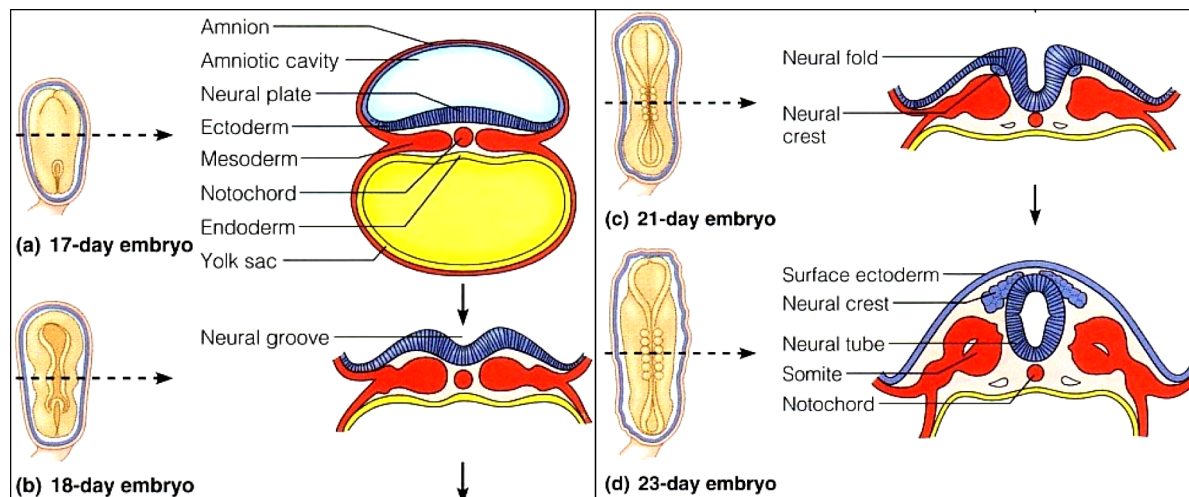


Figure 1. Embryogénèse du tube neural. D'après https://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/diffdev1/page11.html consulté le 17/06/2019 (9)

Les somites se différencient en dermatomes, myotomes, et sclérotomes. Les cellules du sclérotome migrent et vont entourer la notochorde et le tube neural en formant des segments mésenchymateux. Les segments sont séparés par des zones moins denses contenant des artères intersegmentaires. La demi-partie inférieure de chaque segment se condense et

fusionne avec la demi-partie crâniale du sclérotome sous-jacent, incorporant le tissu intersegmentaire dans le corps vertébral précartilagineux.

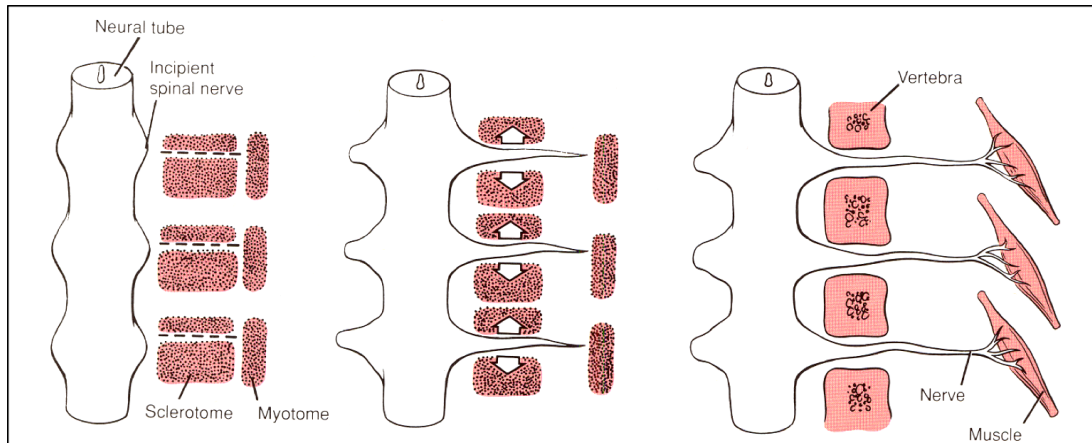


Figure 2. Segmentation du sclérotome. D'après <http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Squelette/col%20vertebr.png> consulté le 17/06/19 (10)

Les cellules venant de la partie crâniale du segment sous-jacent remplissent l'espace entre les deux corps vertébraux précartilagineux et contribuent à la formation du disque intervertébral (Figure 2).

La notochorde induit ainsi la différenciation chondroïde et la segmentation des éléments mésenchymateux des corps vertébraux. Elle persiste entre ces derniers et s'étend dans la région des disques intervertébraux sous formes d'agrégats localisés de cellules au sein d'une matrice mucoïde formant le *nucleus pulposus*.

Ces cellules notochordales dégèrent à partir du 6^{ème} mois de développement et sont progressivement remplacées par des cellules venant de la zone interne de l'anneau fibreux jusqu'à la première décennie.

Des vestiges non tumoraux de tissu notochordal ont été retrouvés aux deux extrémités lors d'étude de colonnes vertébrales *post mortem*. En effet, la notochorde durant la période embryonnaire s'étend de l'ébauche du sacrococcyx jusqu'à la selle turcique. Les vestiges notochordaux appelés *echordose physaliphore* peuvent alors persister en région sphéno-occipitale et sacrée (3).

I.2. Caractéristiques immunohistochimiques des chordomes

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit les chordomes comme des tumeurs malignes présentant une différenciation notochordale (2).

Macroscopie : Les chordomes apparaissent sous la forme d'un tissu mou et gélatineux, de couleur bleu-grise, nodulaire avec des zones hémorragiques. Des zones de nécrose et de calcification peuvent être présentes (3).

Histologie : La cellule caractéristique du chordome est la cellule physaliphore (en grec *physalis* bulle et *phero* porter). Il s'agit d'une cellule en toile d'araignée comportant de grandes vacuoles séparées par de fines cloisons intracytoplasmiques (Figure 3). On retrouve également des cellules plus petites, allongées, d'aspect étoilé qui seraient des précurseurs de ces cellules. Cependant, dans environ 10 % des cas de chordomes, les cellules physaliphores peuvent manquer.

Les cellules tumorales présentent le plus souvent un arrangement syncytial en formant des travées au sein de flaques de mucine extracellulaire (3).

Trois types histologiques sont définis par l'OMS (2): le type classique avec ou sans matrice myxoïde, le type chondroïde et le type dédifférencié. Dans notre travail, nous avons choisi d'individualiser parmi les tumeurs de type classique, celles qui présentaient plus de 50 % de matrice myxoïde qui ont été classées en chordome myxoïde.

- *Chordome classique*

Le tissu tumoral présente des lobules séparés par des *septa* fibrovasculaires. Les cellules tumorales sont de grande taille avec un cytoplasme bien délimité, éosinophile et pouvant contenir une ou plusieurs vacuoles optiquement vides refoulant le noyau. C'est l'aspect de cellule physaliphore (Figure 3).

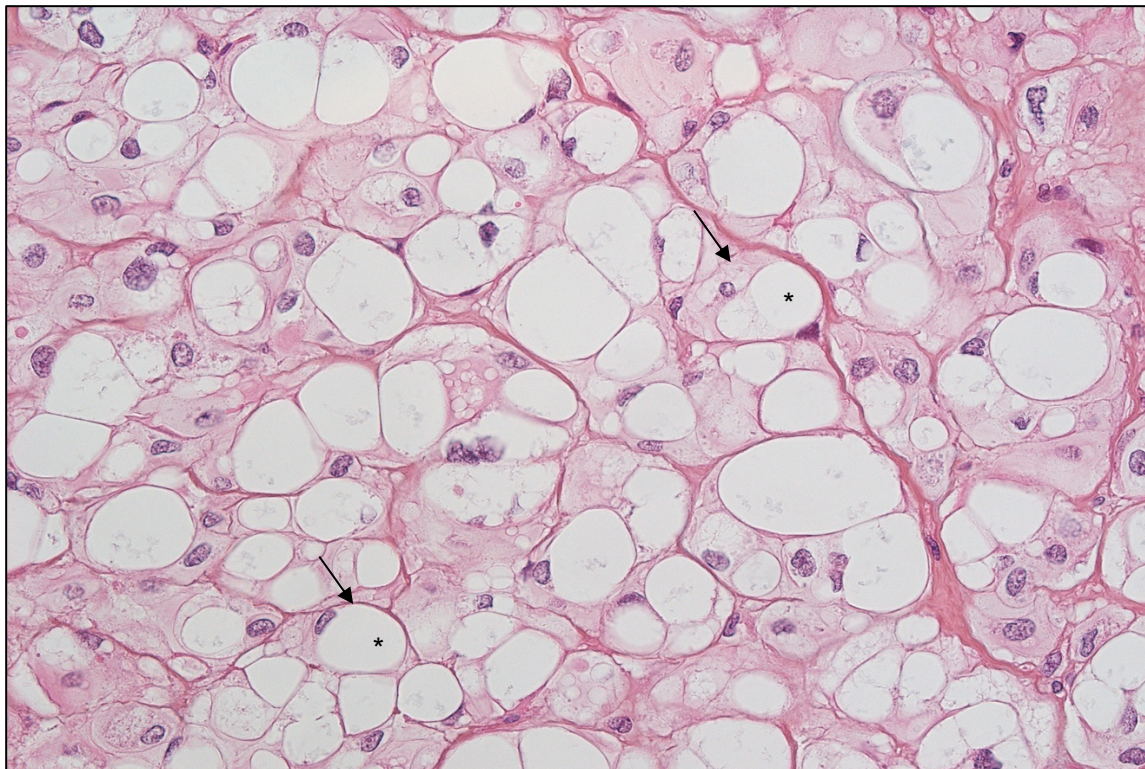


Figure 3. Cas 29 - Chordome classique (grossissement 400) : cellule physaliphore (flèche) comportant une vacuole*

- *Chordome chondroïde*

On observe une matrice d'aspect chondroïde soit focalement associée avec des secteurs myxoïdes, soit plus rarement sur l'ensemble de la tumeur (Figure 4).

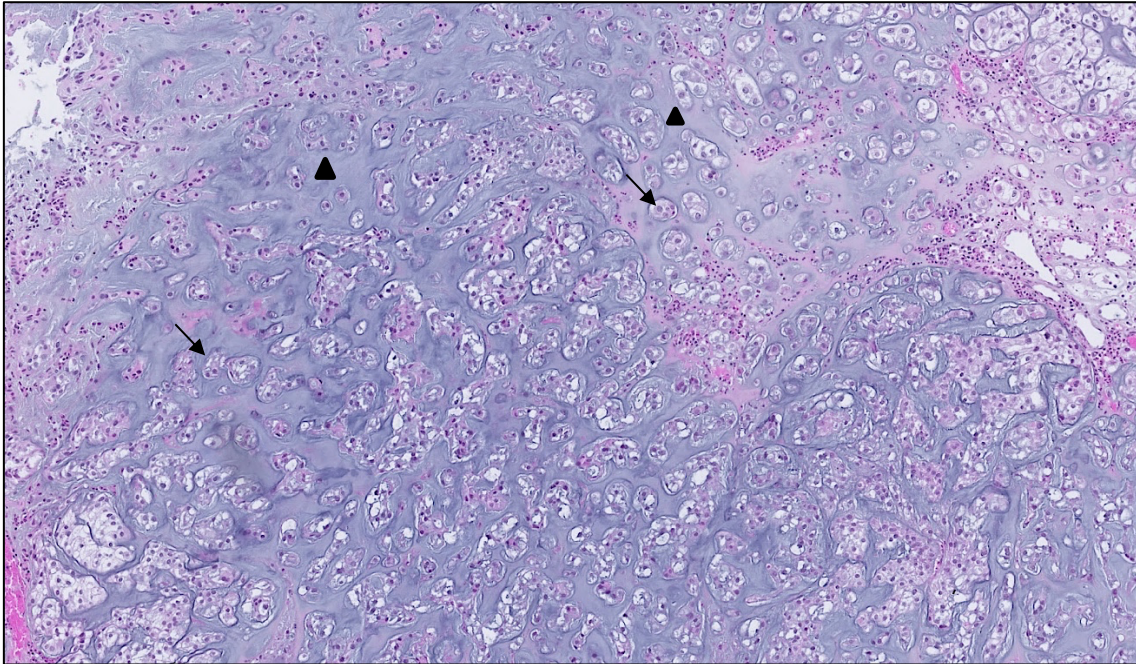


Figure 4. Cas 27 - Chordome chondroïde (grossissement 150) : cellule physaliphore (flèche) avec matrice chondroïde ▲

- *Chordome myxoïde*

Il associe les caractéristiques d'un chordome classique, des cellules tumorales fusiformes d'aspect indifférencié et une matrice myxoïde (Figure 5).

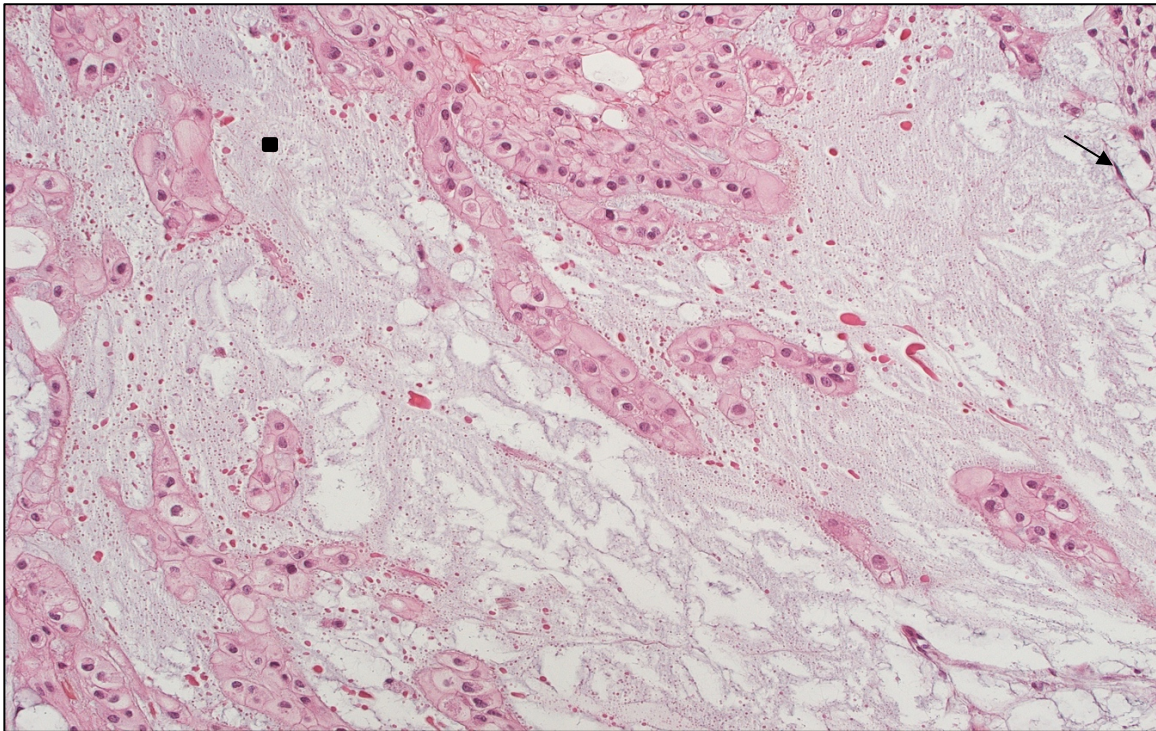


Figure 5. Cas 30 - Chordome myxoïde (grossissement 200) : cellule fusiforme (flèche) avec matrice myxoïde ■

- *Chordome dédifférencié*

Il s'agit d'une tumeur biphasique avec des cellules classiques et des cellules tumorales indifférenciées ou sarcomateuses (Figure 6).

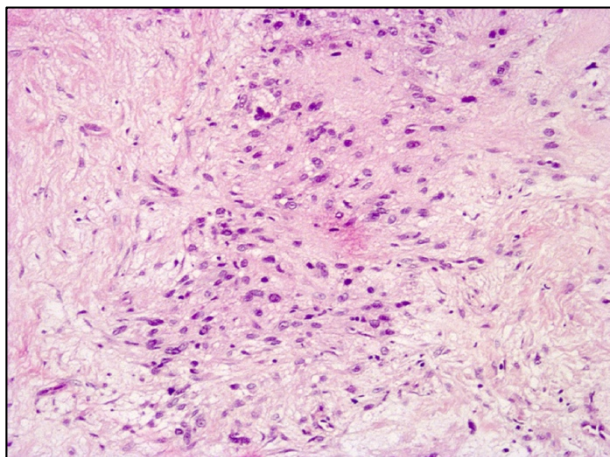


Figure 6. Chordome dédifférencié d'après George *et al.*

Immunohistochimie: L'EMA (Epithelial Membrane Antigen), la cytokératine AE1/AE3, la protéine S100 et le facteur Brachyury sont classiquement exprimés dans les chordomes.

De découverte plus récente, le facteur Brachyury est une protéine codée par le gène *TBX* (*T-box Transcription factor*) situé en 6q27. Cette protéine est impliquée dans les étapes de formation du mésoderme et de la notochorde. Elle est actuellement le marqueur le plus spécifique des chordomes (11).

I.3. Génétique des chordomes

Dans la littérature, plusieurs équipes ont analysé les chordomes par des méthodes de aCGH ou d'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) (12–17). Ces données sont résumées dans le tableau 1.

Les altérations les plus fréquemment rapportées sont la monosomie du chromosome 1 et le gain du chromosome 7 (2). Ces variations du nombre de copies chromosomiques (CNV) pourraient impliquer des gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ou certaines voies de transduction du signal. Par exemple, le gène *EGFR* situé en 7p12, est dupliqué dans environ 40 % des cas de chordomes, *CDKN2A/2B* situé en 9p21.3 est délété dans 70 % des cas, et *PTEN* situé en 10q23.31 est délété dans près de 80 % des cas (12,13,18).

Tableau 1 : Variations du nombre de copie (CNV) décrites dans la littérature

	<i>Brandal et al. 2005 (14)</i>	<i>Diaz et al. 2012 (15)</i>	<i>Hallor et al. 2008 (12)</i>	<i>Le et al. 2011 (13)</i>	<i>Sa et al. 2017 (17)</i>	<i>Scheil et al. 2001 (16)</i>
Nombre de tumeurs	6	22	21	21	10	16
Clivus	0	21	0	2	10	5
Rachis	6	1	21	19	0	11
Gains	1q23q24 (50%)		1q21.1q25.2 (38%), 1q31.3q43 (38%) 5p15.33 5q31.1q31.2, 5q35.1q35.3 (33%)			5q (38%)
	7p21p22 (50%) 7q (67%)	chr 7 (68%)	6q25.3q27 (29%) chr 7 (52%)	7p36.3p22.3 (25%)	chr 7	7q (69%)
			8q24.21q24.22	8q24.3 (35%)		
			12p13.33p12.1 (33%) 12q13.11q13.13	11q12.2q13.4 (30%)		12q (38%)
	19p13 (50%)	chr 19 (55%)	15q11.2 16q21q22 (29%) 19p13.3p13.2 19q12q13.43 (33%) 20q (29%)	17q11.1q25.3 (25%) 19p13.3q13.43 (30%)	17q	chr 20 (20%)
Déletions			1p36.33p11.1 (57%) 2q34q27.3 (33%) chr 3 (71%)		1p	1p (44%)
		chr 3 (45%)	chr 3 (71%)	3p29p26.3 (75%)		3p (50%)
			chr 4 (43%)	4p16.3q35.2 (40%) 6q21q22.3 (25%)		
	9p22p23 (50%)		8p12p11.1 (29%) 9p24.3q31.3 (76%) chr 10 (81%)	9p24.3q34.3 (25%) 10p15.3q26.3 (65%)	chr 10	
		10p (61%) 10q (57%)	11q14.3q25 (38%) 12q24.31 (33%)	11p15.5p11.12 (30%)		
		13q (61%) 14q (65%)	chr 13 (33%) chr 14 (52%)	13q11q34 (60%) 14q11.1q32.33 (65%)	chr13	13q (31%)
			16p12.3q24.3 (52%) 17p13.3p11.1 (48%) chr 18 (48%) 19p13.3p11 (43%) 20p11.21q11.21 (29%) 21q22.2q22.3 (29%)	17p13.3 p11.1 (35%) 18p11.32q23 (40%)		
		22q (71%)	chr 22 (67%) Xp22.33 (29%)	22q11.1q13.33 (45%)		

Certaines voies de transduction ont été étudiées au niveau cellulaire dans les chordomes. Les voies de transduction dépendante des récepteurs à activité Tyrosine Kinase sont les plus souvent analysées dans la littérature. Ces différentes voies telles que la voie de l'EGFR par l'intermédiaire de ses ligands EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF (Transforming Growth Factor), la voie du PDGFR par l'intermédiaire de son ligand PDGF (Platelet-derived Growth Factor) et la voie du HGFR par l'intermédiaire de c-MET (Hepatocyte Growth Factor), interviennent dans la prolifération cellulaire.

À la suite de l'activation de l'EGFR, récepteur aux Tyrosine Kinase (RTK), plusieurs voies intracellulaires sont à leur tour activées (Figure 7) :

- la voie PI3 Kinase (phosphoinositide 3-kinase), AKT, mTOR (mammalian Target of Rapamycine)

- la voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinase) comprenant les protéines RAS, MEK et ERK (extracellular signal-regulated kinase).

- la voie des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) avec notamment la protéine STAT3.

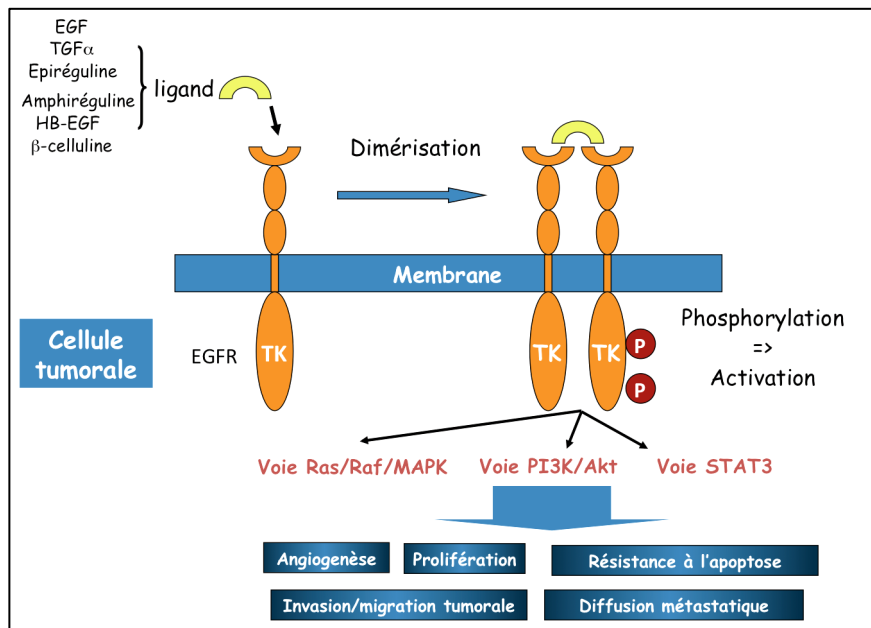


Figure 7. Activation du récepteur de l'EGF et des voies de signalisation en aval. D'après Lièvre *et al.*(19)

L'activation par mutation ou une surexpression des facteurs de croissance ou des RTK correspondant à ces voies de signalisation peut aboutir à une transformation maligne d'une cellule et favoriser sa prolifération. Une surexpression de *EGFR* a été trouvée dans 66 % des cas de chordome rapportés par Dewaele *et al.* en 2011 (20). Une activation de *PDGFRβ* a été observée dans 85 % des cas par Tamborini *et al.* en 2010 dans sa série de 22 chordomes (21).

Sur la voie PI3 Kinase-AKT-mTOR, *PTEN*, localisé en 10q23.3, est un gène suppresseur de tumeur ; il inhibe la stimulation d'AKT par la *PIK3CA* et donc la transmission du signal et l'activation cellulaire (22). Une perte ou une mutation de *PTEN* a été retrouvée dans 25 % des chordomes (6).

Dans une série de patients porteurs d'un chordome et d'une sclérose tubéreuse de Bourneville, une inactivation du gène *TSC* entrainerait une phosphorylation de m-TOR. Ce gène induirait la cascade d'activation PI3/AKT/m-TOR (22).

Une activation de la voie STAT3 a également été rapportée dans de nombreux chordomes y compris dans les formes récidivantes et métastatiques. D'après Yang *et al.*, il y aurait une corrélation entre le niveau d'expression du STAT3 et le pronostic (23).

D'autres études ont mis en évidence des mutations inactivatrices sur des gènes suppresseurs de tumeur. Choy *et al.* ont rapporté des anomalies survenant sur *ALK* (p.(Ala877Ser)), *CTNNB1* (p.(Thr41Ala)), *NRAS* (p.(Gln61Arg)), *PIK3CA* (p.(Glu545Lys)), *PTEN* (p.(Arg131Arg)), *CDKN2A* (p.(Arg58Arg)) et *SMARCB1* (p.(Arg40Arg)) dans une série de 45 cas (24).

Mobley *et al.* ont rapporté une absence d'expression de *SMARCB1* dans 3 chordomes peu différenciés et 8 AT/RT (Atypical teratoid/Rhabdoid tumor). *SMARCB1*, situé sur le

chromosome 22q est une sous-unité du complexe SWI/SNF ATP-dépendant chromatine remodeling, suppresseur de tumeur épigénétique, qui antagonise directement l'histone méthyltransférase EZH2. Il participerait également à la régulation du cycle cellulaire par l'activation de *CDKN2A* (25).

I.4. Généralités sur le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en 2 phases principales :

- L'interphase qui comprend elle-même 3 phases : la phase G₁, la phase S où a lieu la duplication de l'ADN, la phase G₂.
- La mitose ou phase M.

I.4.1. Acteurs du cycle cellulaire

Le contrôle du cycle cellulaire est sous la dépendance de protéines-kinases dépendantes des cyclines (Cdk) activées cycliquement (Figure 8).

Quatre classes de cyclines sont décrites :

- Les cyclines de la phase G₁/S comme la cycline E : elles activent les Cdk dans la phase G₁ tardive qui permet l'engagement de la cellule dans le cycle cellulaire.
- Les cyclines de la phase S comme la cycline A : elles lient les Cdk après le point de départ et aident à la stimulation de la duplication chromosomique.
- Les cyclines de la phase M comme la cycline B : elles activent les Cdk qui stimulent l'entrée en mitose au point de contrôle G₂/M.
- Les cyclines de la phase G₁ comme la cycline D : elles participent à l'action des cyclines G₁/S qui contrôlent le passage au point de départ en phase G₁ tardive.

Plusieurs types de protéines contrôlent la progression dans le cycle cellulaire :

- les kinases activatrices CAK (Cdk-activating kinase) phosphorylent les Cdk et les rendent ainsi accessibles aux substrats.
- les phosphatases CDC25 activent les complexes Cdk-cycline en les déphosphorylant.
- les protéines inhibitrices de l'action des couples cyclines/CDK : cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) comme les inhibiteurs de CDK4 (inhibitors of cdK4 [INK4]) p15^{INK4B}, p16^{INK4A} et p14^{ARF}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D} codés respectivement par les gènes *CDKN2B*, *CDKN2A*, *CDKN2C* et *CDKN2D*.
- les inhibiteurs de cyclines/kinases (CDK interacting protein / kinase inhibitory protein [CIP/KIP]) : p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} codés respectivement par les gènes *CDKN1A*, *CDKN1B* et *CDKN1C*.

I.4.2. La régulation du cycle cellulaire

Avant la transition G_1 -S, la cellule passe un point de contrôle appelé point de restriction dépendant de « pocket proteins » telles que la protéine du rétinoblastome (Rb1) ou encore la protéine p53 l'engageant irrémédiablement dans le cycle de division (26).

Pendant la phase G_1 , la protéine Rb1 est phosphorylée par CDK4/6 ce qui permet la libération du facteur de transcription E2F. Ceci entraîne la transcription de cyclines E. Le couple cycline E/CDK2 déclenche la phase S. Le couple cycline A2/CDK2 favorise la synthèse de l'ADN et la transition S- G_2 . L'entrée dans la phase M où a lieu la mitose est liée à la déphosphorylation du couple cycline B/CDK1 par les phosphatases CDC25 et l'inactivation des kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 par phosphorylation par d'autres kinases.

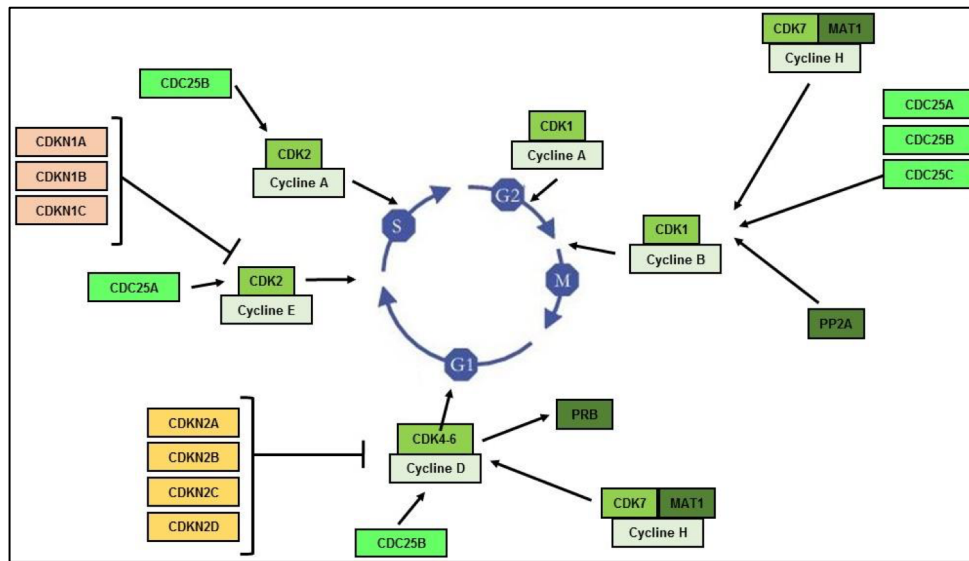


Figure 8. Le cycle de division cellulaire et sa régulation, adapté d'après Meijer. (27)

II. Objectifs

Dans une série de 32 cas de chordomes du clivus et du sacrum, nous avons recherché :

- des anomalies chromosomiques par aCGH,
- et des mutations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par NGS en utilisant un panel de 84 gènes.

Afin de mettre en évidence des marqueurs d'agressivité, les résultats moléculaires ont été analysés en fonction de données générales (sexe, âge, localisation), et de critères histopathologiques comme le type histologique, la présence ou l'absence d'atypies nucléaires, la présence ou l'absence de nécrose, l'index mitotique et l'index Ki67.

III. Matériel et méthodes

III.1. Cohorte de patients

Trente-deux tumeurs ont été étudiées. Cinq provenaient de patients opérés d'un chordome du clivus ou du sacrum au Centre Hospitalier Universitaire de Limoges et 27 de patients opérés à l'hôpital Lariboisière à Paris entre 1994 et 2017. Pour un patient, nous disposions des blocs de paraffine de la tumeur primitive et de la récidive.

Tous les échantillons tumoraux ont été analysés en immunohistochimie, aCGH et NGS.

III.2. Analyse histopathologique

Les tissus prélevés au bloc opératoire ont été fixés dans du formol tamponné, puis déshydratés dans des bains d'alcool et inclus dans de la paraffine. À partir de ces blocs, des coupes ont été faites au microtome, puis recueillies sur des lames en verre et colorées à l'hémalum phloxine safran pour une étude histopathologique. Tous les cas ont été lus par le Pr Adle-Biassette et le Pr Labrousse respectivement du CHU Lariboisière et du CHU de Limoges.

Dans chaque cas, les critères histopathologiques suivants ont été analysés : le type histologique, la présence d'atypies nucléaires évaluées sur une échelle de 1 à 3, la présence ou l'absence de nécrose et l'index mitotique calculé sur 10 champs à fort grossissement.

Les tumeurs ont été classées selon la classification de l'OMS (2). Les tumeurs de type classique qui présentaient plus de 50 % de composante myxoïde, ont été individualisées en sous-type myxoïde (Figure 5).

Pour cinq patients, les tissus ont pu être cryopréservés à -80° C après avoir été congelé dans l'azote liquide.

III.3. Immunohistochimie

Une étude immunohistochimique a été réalisée sur les coupes en paraffine avec un automate Benchmark Ultra (Ventana-Roche Medical Systems) selon les recommandations du fournisseur sur tous les échantillons avec les anticorps suivants :

- anti-Brachyury (clone RBT-TBXT, Diagnostics, BSB3494, dilution 1/50),
- anti-EMA (clone E29, Roche, 790-4463, seringue prête à l'emploi),
- anti-cytokératine AE1/AE3 (clone AE1/AE3, Dako M3515, dilution 1/200),
- anti-protéine S100 (polyclonal, Roche, 760-2523, seringue prête à l'emploi),
- anti-Ki67 (clone 30-9, Roche, 790-4286, seringue prête à l'emploi),

L'index Ki67 a été déterminé sur 300 cellules tumorales dans les zones dans lesquelles le marquage était le plus élevé (hotspots).

III.4. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA) par Hybridation Génomique Comparative (aCGH)

L'analyse chromosomique du tissu tumoral a été réalisée par aCGH : l'ADN tumoral marqué par un fluorochrome (cyanine 3) a été comparé à un ADN de référence marqué par un fluorochrome différent (cyanine 5).

Les étapes de cette technique sont résumées dans la figure 9 (28).

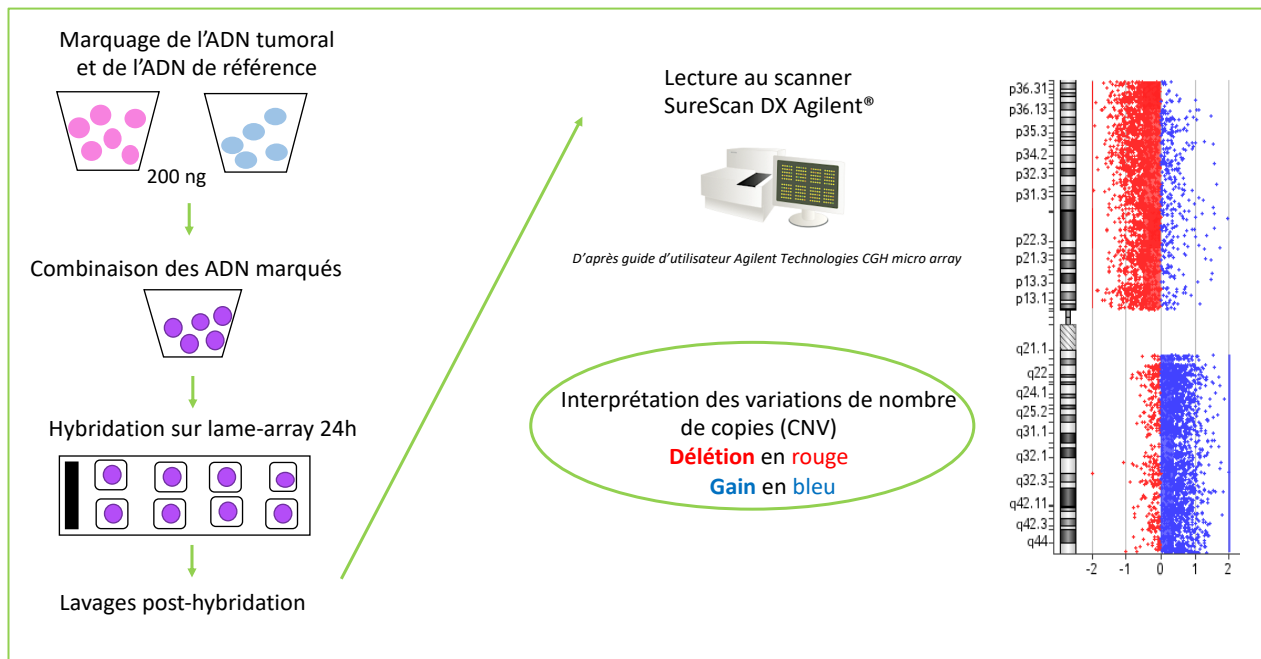


Figure 9. Étapes Hybridation Génomique Comparative array (aCGH)

1. Extraction de l'ADN

Une zone riche en cellules tumorales a été sélectionnée sur des coupes en paraffine ou sur du matériel congelé.

L'ADN a été extrait à l'aide de l'automate d'extraction Maxwell® 16 (Promega) et du kit DNA Purification Kit Maxwell® 16 FFPE Plus LEV selon les recommandations du fournisseur.

Les échantillons ont été mis à incuber dans 180 µL de tampon d'incubation et 20 µL de Protéinase K pendant 2 heures à 70° C. Pour les échantillons de tissu congelé, le temps d'incubation était de 16 h. Puis, 400 µL de tampon de lyse ont été ajoutés. Les échantillons ont été transférés dans les cartouches d'extraction de l'automate pour l'extraction de l'ADN pendant 40 minutes. À la fin de la procédure, 70 µL de solution d'élution contenant l'ADN ont été récupérés pour chaque échantillon.

La quantification de l'ADN extrait a été réalisée en fin de procédure par un système de fluorimétrie Quantus™ Fluorometer.

2. Marquage de l'ADN par Random Priming

Quinze microlitres d'ADN tumoral concentré entre 15 et 118 ng/μL ont été utilisés pour chaque échantillon et dénaturés pendant 2 minutes et 30 secondes à 98° C. De même, 13 μL d'ADN de référence ont été utilisés, à la concentration de 30 ng/μL, et fragmentés après dénaturation pendant 10 minutes à 95° C.

L'ADN tumoral a été marqué par la cyanine 3 et l'ADN de référence par la cyanine 5 à l'aide du kit Sure Tag DNA Labeling Kit (Agilent®) selon les recommandations du fournisseur.

3. Purification de l'ADN

Les ADN tumoraux et de référence ont été combinés puis précipités avec 2,5 μL de NaCl et 60 μL d'isopropanolol 100 % pendant 30 minutes entre -25° et -15° C puis centrifugés à 13000 g pendant 20 min à 4° C. Le culot a été lavé à l'éthanol 70 % puis centrifugé à 13000 g pendant 5 min. Le culot a été séché au SpeedVac pendant 10 minutes.

4. Hybridation de l'ADN

Le culot d'ADN a été resuspendu avec 19 μL de TE Low EDTA et le mix d'hybridation contenant de l'ADN Cot-1 à 1 mg/mL, de l'agent bloquant 1X et un tampon d'hybridation HI-RPM 1X (kit oligo aCGH/ChIP-on-chip hybridization Agilent®). Cette solution a été dénaturée pendant 3 min à 98° C puis préhybridée pendant 30 min à 37° C.

Les ADN combinés et marqués ont été déposés sur une lame-joint 8x60K (maximum 8 échantillons par lame). Une lame-array 8x60K SurePrint (Agilent®) a été déposée par-dessus puis l'ensemble a été monté dans la chambre d'hybridation. Le dispositif a été mis dans un incubateur pour l'hybridation réalisée à 67° C pendant 24 heures avec une rotation de 20 rpm.

5. Lavages post-hydridation

La lame-array a été désassemblée de la lame-joint dans un bac de tampon de lavage 1 oligo a CGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1. La lame-array a été lavée au tampon de lavage 1 pendant 5 minutes sous agitation puis dans un bac de tampon de lavage 2 oligo a CGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 2 à 40° C pendant 1 minute sous agitation.

La lame a été scannée par le scanner SureScan DX Agilent® G5761A en utilisant le logiciel Agilent® Microarray Scan Control. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel Cytogenomics Agilent®. Les paramètres de l'algorithme d'analyse utilisés étaient : Mosaic analysis_Method CGH, Génome hg19, threshold=6, Nombre minimum de sonde pour gain et délétion ≥ 10 . Le log₂R correspond au logarithme de base 2 du rapport de l'intensité de la cyanine 3 par celle de la cyanine 5. Une perte correspond à un log₂R inférieur à -0,1 et un gain correspond à un log₂R supérieur à 0,1.

III.5. Next Generation Sequencing

Un panel d'amorces de 84 gènes (liste des gènes en annexe 1) intervenant dans la régulation du cycle cellulaire a été réalisé au préalable par l'équipe du Pr Labrousse à l'aide de l'outil en ligne Ampliseq™ Designer (Thermo Fisher Scientific®). Celui-ci prend la forme de deux pools d'amorces. Les étapes de cette technique sont résumées dans la figure 10 (29).

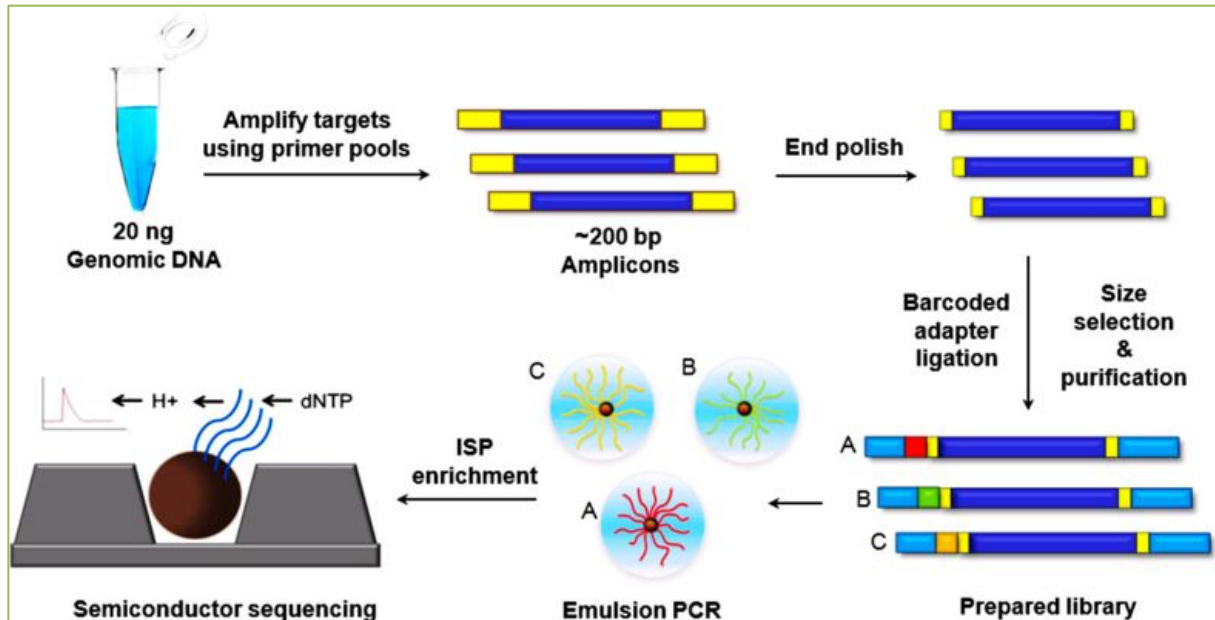


Figure 10. Étapes Next Generation Sequencing d'après Li *et al.*

III.5.1. Préparation des bibliothèques

La préparation des bibliothèques a été réalisée en utilisant le kit Ion Ampliseq Library kit 2.0 en suivant les recommandations du fournisseur.

- Amplification des cibles

Celle-ci a été réalisée à partir de 3 µL de solution contenant 4 ng/µL d'ADN associés à 2 µL d'Ion Ampliseq™ Hifi Mix et 5 µL de Ion Ampliseq™ Primer pool de chaque mélange d'amorces. L'amplification a été effectuée par PCR (Polymerase Chain Reaction) selon le programme recommandé par le fournisseur :

Étape	But	Température	Temps
Unique	Activation de l'enzyme	99° C	2 minutes
Cycles (21)	Dénaturation	99° C	15 secondes
	Élongation	60° C	8 minutes
Unique		10° C	infini

- Digestion partielle des amorces

Après unification des amplifications obtenues pour chacun des mélanges d'amorces, constituant un volume total de 20 µL, 2 µL de FuPa Reagent ont été ajoutés. La digestion partielle des amorces a été effectuée selon le programme suivant :

Température	Temps
50°C	10 minutes
55°C	10 minutes
60°C	20 minutes
10°C	1 heure maximum

- Ligation des index et adaptateurs

Afin de séquencer plusieurs échantillons sur une même puce, un index correspondant à une séquence unique de 6 à 10 nucléotides a été attribué à chacun. La ligation de ces index aux amplicons a été effectuée grâce à un mélange adaptateur/index contenant 0,5 µL de Ion P1 Adaptater, 0,5 µL de Ion Xpress™ Barcode X (X correspond au numéro de l'index choisit pour l'échantillon) et 1 µL d'eau. Puis, 4 µL de Switch Solution, 2 µL d'ADN Ligase ont été rajoutés. La ligation a été réalisée selon le programme suivant :

Température	Temps
22° C	30 minutes
72° C	10 minutes
10° C	1 heure maximum

- Purification des librairies

Après avoir ajouté 45 µL de HighPrep™ PCR Clean Up System MAGBIO® à chaque échantillon, les amplicons ont été fixés sur les billes. Deux lavages successifs avec 150 µL d'éthanol 70° ont été réalisés, selon les recommandations du fournisseur.

- Quantification des librairies amplifiées

Afin de réaliser une nouvelle étape d'amplification des cibles grâce à des amorces universelles, les amplicons fixés sur les billes ont été récupérés par élution avec 50 µL de Platinum Pcr SuperMix High Fidelity et 2 µL de Library Amplification Primer Mix. Le surnageant obtenu a été placé dans un thermocycleur et l'amplification a été réalisée selon le programme suivant :

Étape	Température	Temps
Unique	98° C	2 minutes
5 cycles	98° C	15 secondes
	64° C	1 minute
Unique	10° C	Infini

Puis, deux séries de purification ont été effectuées à l'aide du kit HighPrep™ PCR Clean Up System MAGBIO®, en respectant scrupuleusement les indications de volumes recommandées par le fournisseur. La quantification des librairies a été réalisée avec le fluorimètre Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific®) à l'aide du kit Qubit® dsDNA HS Assay à partir de 10 µL de chaque échantillon.

Chacune des librairies a été diluée à 15 ng/mL, avant de réaliser un mélange équimolaire des librairies.

III.5.2. Amplification clonale par PCR en émulsion

Cette étape a été réalisée par l'ingénieur en charge de l'unité de séquençage du CHU Limoges. La PCR en émulsion a été réalisée à l'aide du kit Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 (Thermo Fisher Scientific®). Les librairies ont été mélangées aux particules ISP (Ion Sphere™ particles, Thermo Fisher Scientific®) et à un mix contenant les éléments nécessaires à la PCR puis le mélange a été placé dans le filtre de l'Ion One Touch™ 2 System (Thermo Fisher Scientific®). Le principe de cette réaction est le suivant : lorsque la solution contenant les librairies passe à travers le filtre, des microréacteurs contenant idéalement une sphère et un fragment d'ADN sont générés dans l'huile. La réaction PCR se produit dans ces microréacteurs. Les sphères possèdent à leur surface des fragments d'ADN qui permettent la liaison des ADN synthétisés aux sphères via les adaptateurs P1. Chaque matrice est amplifiée de manière monoclonale à la surface d'une ISP afin de rendre les signaux détectables lors du séquençage (environ un million de copies d'un fragment d'ADN sur une sphère). Une étape d'enrichissement des sphères est réalisée afin d'éliminer celles ne contenant pas de fragment d'ADN à leur surface à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Les fragments d'ADN complémentaires de ceux liés aux sphères portent à leurs extrémités une biotine. Le mélange des billes magnétiques avec le produit de la PCR grâce au couplage biotine/streptavidine permet de conserver uniquement des sphères portant des fragments d'ADN à leur surface. Puis, une étape de dénaturation est effectuée pour éliminer les brins d'ADN portant la biotine. Ainsi, les sphères obtenues sont recouvertes à leur surface d'ADN simple brin. Le fluorimètre Qubit 2.0 a permis de vérifier le chargement des sphères et de procéder au chargement de la puce lorsque le ratio de sphères liées à l'ADN sur les sphères non liées était suffisant (10 à 25 %) (30).

III.5.3. Chargement de la puce et réaction de séquençage

Le séquenceur utilisé est l'Ion Proton™ System de Life Technologies (Thermo Fisher Scientific®). Sa capacité de lecture est d'environ 10 giga bases par séquençage.

Son principe de fonctionnement est le suivant : la réaction de séquençage effectuée par l'Ion Proton est une technique de séquençage massivement parallèle, également appelée nouvelle génération, qui permet de suivre en même temps la réplique de milliers de fragments d'ADN. Elle repose sur un principe de technologie semi-conductrice (Ion Torrent™) basée sur les propriétés de l'ADN polymérase qui lorsqu'elle incorpore un nucléotide au brin d'ADN en cours de synthèse crée une liaison phosphodiester, entraînant la libération d'un ion Hydrogène (H⁺).

Les sphères contenant les fragments d'ADN à séquencer sont chargées sur la puce Ion PI™ Chip v3 (Thermo Fisher Scientific®) qui contient 163 millions de micro-puits. Chaque puit accueille une sphère après une brève étape de centrifugation. Ces micro-puits contiennent un milieu réactionnel ainsi qu'une mince couche pH-mètre au fond du puit. Des nucléotides non modifiés (A, T, G, C) sont successivement injectés dans chaque micro-puit. Lorsqu'un nucléotide est incorporé par la polymérase selon le principe de complémentarité des bases, la libération d'un ion H⁺ entraîne une variation de pH dans le puit qui, une fois détectée est transformée en signal numérique, converti en base dans la séquence pour l'interprétation par l'utilisateur. Lorsque 2 nucléotides identiques sont incorporés à la suite, le signal est doublé puis enregistré en 2 bases identiques. Cette interprétation est fiable pour un maximum de 5 à 6 nucléotides identiques successifs ce qui peut être problématique pour l'analyse des homopolymères.

III.5.4. Analyse bioinformatique des données

i. Obtention des données brutes

Le NGS permet de mettre en évidence des mutations, des insertions ou délétions de petite taille (INDELs) et des variations du nombre de copies d'un gène ou d'un locus donné (CNV). Les rapports récupérés après chaque NGS donnent des informations sur la qualité du séquençage : le chargement de la puce, le nombre de bases analysées, le nombre total de lectures « reads », le score de qualité relié à la probabilité d'erreur d'identification d'une base (Phred Score) permettant de s'assurer de la validité des résultats.

Les signaux acquis par le séquenceur Ion Torrent Browser du CHU Limoges ont d'abord été convertis en nucléotides (base calling) sous forme d'un fichier BCL (Base Call Files).

Le démultiplexage avec repérage des index et attribution des lectures à chaque échantillon a permis d'obtenir des fichiers FASTQ.

Le fichier BED (Browser Extensible Data) fourni lors de la réalisation du panel d'amorces a été utilisé pour restreindre l'analyse bio-informatique aux régions ciblées par ce panel.

ii. Alignement sur génome de référence.

Les « reads » contenus dans les fichiers FASTQ ont été alignés sur le génome de référence Hg 19 (Human Genome 19 ou GRCh37) grâce au logiciel d'alignement TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) et ont permis l'obtention de fichiers BAM pour chaque patient.

iii. Appel de variants

L'objectif de cette étape a été d'identifier les variants définis comme une modification de la séquence d'ADN dans les tissus tumoraux par rapport au génome de référence.

L'appel de variant a été effectué par le logiciel Torrent Variant Caller (TVC version 5.8-17) en mode « Somatic » ce qui a permis de stocker les variants somatiques de chaque échantillon dans des fichiers aux formats VCF (Variant Call Format). Ces derniers ont été transmis pour analyse à la Cellule Bioinformatique du Service Commun de Biologie intégrative Santé Chimie Environnement (BISCEm).

Les variants, avec une fréquence allélique inférieure ou égale à 5% et dont la profondeur de lecture (« reads ») était inférieure ou égale à 50, ont été identifiés par Genome Analyse ToolKit (GATK) Variant Filtration puis supprimés avec VCFTools (31,32).

iv. Annotation des variants

L'outil SnpEff a été utilisé pour annoter les fichiers VCF (33). De multiples annotations pour chaque variant telles que le gène sur lequel se situe le variant, le chromosome concerné, la localisation selon le génome de référence hg19, le nucléotide de référence, le nucléotide variant, la fréquence allélique, le changement induit par le variant (synonyme, faux-sens, non-sens), la position du variant au sein de l'amplicon, ont été renseignées.

L'outil SnpSift a permis d'indiquer si le variant identifié était déjà référencé dans les bases de données dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database), COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), gnomAD (genome Aggregation Database) et ClinVar (34).

Le logiciel R a été utilisé pour trier les VCF annotés, permettant de distinguer les variants présents dans les tumeurs primitives d'une part, et dans les récurrences d'autre part, ainsi que le nombre de récurrence de chaque variant parmi ces deux groupes de tumeurs. Enfin, le tableau a été converti en fichier Excel.

III.6. Analyse statistique

Le logiciel STATA 12 a été utilisé par le Centre d'Épidémiologie, de Biostatistique, et de Méthodologie de la Recherche (Cébimer) du CHU de Limoges pour l'analyse de nos données obtenues par aCGH. Devant un grand nombre de données, seuls les *loci* pour lesquels les effectifs étaient supérieurs ou égaux à 50 % ont été pris en compte pour une analyse statistique en réalisant un test de régression logistique.

Le logiciel STATVIEW 5.0 (SAS Institute) a été utilisé pour la comparaison des variants NGS selon le statut, le sexe, l'âge, le type histologique et la localisation en réalisant un test de Chi-2.

IV. Résultats

IV.1. Caractéristiques cliniques de notre cohorte

Trente-deux tumeurs ont été incluses dans notre étude. Vingt-huit (87,5 %) étaient localisées au niveau du clivus et quatre (12,5 %) au niveau du sacrum. La moyenne d'âge des patients était de $51,75 \pm 14,57$ ans [20 – 74 ans] avec 21 hommes (59 %). Pour dix cas (31,25 %), il s'agissait de récurrences (Tableau 2). Aucun des patients inclus n'avait bénéficié de traitement par radiothérapie ou protonthérapie au préalable.

Tableau 2 : Caractéristique des patients

Patients	Âge	Sexe	Localisation	Statut
1	72 ans	Féminin	Clivus	Primitif
2	56 ans	Masculin	Sacrum	Primitif
3	74 ans	Masculin	Sacrum	Primitif
4	59 ans	Masculin	clivus	Primitif
5	69 ans	Masculin	Sacrum	Récidive
6	67 ans	Masculin	Sacrum	Primitif
7	48 ans	Masculin	Clivus	Primitif
8	45 ans	Féminin	Clivus	Primitif
9	55 ans	Féminin	Clivus	Primitif
10	53 ans	Masculin	Clivus	Primitif
11	66 ans	Féminin	Clivus	Récidive
12	56 ans	Masculin	Clivus	Primitif
13	35 ans	Féminin	Clivus	Récidive
14	48 ans	Féminin	Clivus	Récidive
15	49 ans	Masculin	Clivus	Primitif
16	60 ans	Féminin	Clivus	Récidive
17	57 ans	Masculin	Clivus	Primitif
18	66 ans	Masculin	Clivus	Primitif
19	59 ans	Masculin	Clivus	Récidive
20	36 ans	Masculin	Clivus	Récidive
21	33 ans	Masculin	Clivus	Primitif
22	66 ans	Masculin	Clivus	Primitif
23	53 ans	Masculin	Clivus	Primitif
24	67 ans	Masculin	Clivus	Récidive
25	55 ans	Masculin	Clivus	Récidive
26	64 ans	Masculin	Clivus	Primitif
27	38 ans	Masculin	Clivus	Primitif
28	27 ans	Féminin	Clivus	Primitif
29	20 ans	Féminin	Clivus	Primitif
30	43 ans	Féminin	Clivus	Primitif
31	23 ans	Féminin	Clivus	Primitif
32	37 ans	Masculin	Clivus	Récidive

IV.2. Histologie et immunohistochimie

Notre série comportait 24 tumeurs de type classique, 5 tumeurs de type myxoïde et 3 tumeurs de type chondroïde.

Toutes les tumeurs exprimaient Brachyury, les cytokératines AE1/AE3 et l'EMA. Deux cas étaient négatifs pour la PS 100. L'index Ki67 variait entre 1 % et 39 % avec une médiane à 5 %.

Les données histologiques et immunohistochimiques sont résumées dans le tableau 3 et illustrées dans la figure 11.

Tableau 3 : Caractéristiques histologiques

Patients	Histologie	Index mitotique*	Atypies nucléaires	Nécrose	Brachyury	CK AE1/AE3	PS100	EMA	Index Ki 67 (%)♦
1	myxoïde	1	2	+	+	+	+	+	39
2	classique	1	1	-	+	+	+	+	2
3	classique	1	1	-	+	+	+	+	4
4	classique	0	1	-	+	+	+	+	NA
5	classique	1	1	-	+	+	-	+	6
6	classique	1	1	-	+	+	+	+	1
7	classique	1	1	-	+	+	+	+	1
8	chondroïde	1	1	-	+	+	+	+	1
9	classique	1	2	-	+	+	+	+	2
10	myxoïde	4	2	-	+	+	+	+	15
11	classique	7	1	-	+	+	+	+	2
12	classique	7	2	+	+	+	+	+	5
13	classique	1	1	-	+	+	+	+	12
14	classique	2	1	-	+	+	+	+	12
15	classique	1	2	-	+	+	+	+	2
16	classique	1	1	-	+	+	+	+	2
17	classique	1	1	-	+	+	+	+	15
18	classique	2	3	-	+	+	+	+	8
19	myxoïde	2	2	-	+	+	-	+	10
20	myxoïde	1	2	-	+	+	+	+	4
21	classique	1	1	-	+	+	+	+	8
22	classique	1	2	-	+	+	+	+	2
23	classique	1	1	-	+	+	+	+	2
24	classique	1	1	-	+	+	+	+	5
25	classique	1	2	-	+	+	+	+	10
26	classique	1	2	-	+	+	+	+	2
27	chondroïde	12	2	-	+	+	+	+	17
28	classique	2	2	-	+	+	+	+	15
29	classique	1	1	+	+	+	+	+	10
30	myxoïde	1	1	-	+	+	+	+	8
31	chondroïde	1	2	-	+	+	+	+	2
32	classique	1	1	-	+	+	+	+	8

*index mitotique : nombre de mitoses pour 10 champs au grossissement 400

♦index Ki67 (%) : déterminé dans les zones de « hotspots » de 300 cellules tumorales

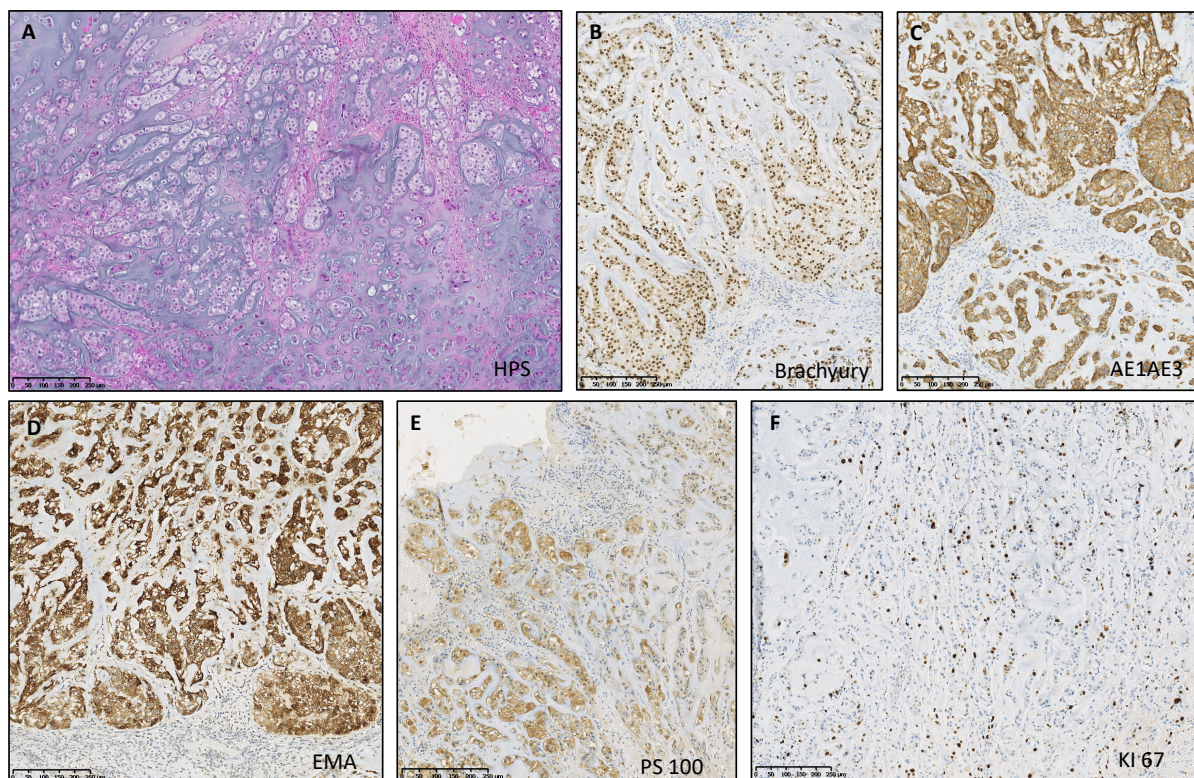


Figure 11. Cas 27 - Chordome chondroïde (A) avec immunomarquage positif pour brachyury (B), AE1/AE3 (C), EMA(D), PS 100 (E) et Index KI67 à 17 % (F)

IV.3. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN

Tous les patients présentaient une variation du nombre de copies. Seuls les chromosomes X et Y ne présentaient pas d'anomalies. L'ensemble des CNV sont illustrées par l'annexe 2.

1) Fréquence des CNV

(a) Les délétions chromosomiques

Dans notre série, les délétions étaient plus fréquentes que les gains. Les chromosomes les plus souvent concernés étaient les chromosomes 1p, 3, 4, 9, 10, 13q, 14q, 15q, 18, 19 et 22q. Les délétions de chromosomes entiers concernaient les chromosomes 3, 4, 9, 10, 11, 12, 16 et 18.

Les régions suivantes étaient délétées chez plus de 50 % des patients notre série : 1p36p35 (63 %), 3p22p21 (53,5 %), 9p24p21.1 (53 %), 9q21q34 (53,3 %), 10q21q26 (57 %), 14q11 (50 %), et 14q21q32.33 (57,8 %).

Les régions suivantes étaient délétées chez 30 % à 50 % des patients de notre série : 1p34p13.2 (39,3 %), 3p26p23 (43,3 %), 3p14p11 (43,3 %), 3q (43,5 %), 4p16p13 (37 %), 4q12q35 (34,8 %), 9p13 (47 %), 9q13 (29 %), 10p (44,9 %), 10q11 (47 %), 11q13 (32 %), 12q13 (33%), 13q (43,3 %), 14q12q20 (47 %), 18p11.3p11.2 (44 %), 18q (42 %), 19p13.3p13.2 (35 %), 19q13.q13.4 (32 %), 22q11 (32 %), 22q12 (35 %) et 22q13 (35 %).

Dans notre série, les bras chromosomiques 1q et 20p n'étaient jamais délétés.

(b) Les gains de type duplication chromosomique

Les chromosomes les plus souvent concernés étaient les chromosomes 1q, 5, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 20 et 21q.

Les duplications de chromosomes entiers concernaient les chromosomes 2, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 17, 19 et 20.

Les régions suivantes étaient dupliquées chez plus de 50 % des patients de notre série : 1q21 (50 %), 1q23.3 (54 %), 1q25 (50 %), 1q32q44 (60 %), 5p15p13 (66 %), 7p21.3p21.2 (52 %), 7q21.11q31 (58,5 %), 8p23 (57 %), 12q14q15 (54 %).

Les régions suivantes étaient dupliquées chez 30 % à 50 % : 1q22 (47 %), 1q24 (47 %), 2p25, 5p12 (38 %), 5q34 (32 %), 6p22 (44 %), 7p22 (35 %), 7p15p11 (36,2 %), 7q11 (41 %), 7q32q36 (41 %), 8p22 (47 %), 8p21 (44 %), 8q22q24 (38 %), 10q21 (35 %), 12q14.1 (44 %), 13q14q32 (31,5 %), 17q21.3 (32 %), 20p12 (47 %), 20p11 (44 %) et 21q21 (32 %).

Les bras chromosomiques 14q et 21p n'étaient jamais concernés par les gains.

La figure 12 résume ces données.

Légende figure 12

Fréquence délétions (%)	Fréquence duplications (%)
0	0
$\% < 10$	$< 10 \%$
$10 \leq \% < 30$	$10 \leq \% < 30$
$30 \leq \% < 50$	$30 \leq \% < 50$
$\% \geq 50$	$\% \geq 50$

2) Analyse statistique multivariée

Devant le nombre important de variables, nous avons décidé de porter notre analyse sur les *loci* ayant une fréquence supérieure ou égale à 50 %.

Chacun de ces *loci* a d'abord été analysé en analyse univariée selon chaque critère : statut tumoral (tumeur primitive ou récidive), localisation, sexe, type histologique, atypie nucléaire, index mitotique, index Ki67 puis une régression logistique multinomiale a été réalisée pour les variables où le p était inférieur à 0,250.

L'analyse multivariée par régression logistique multinomiale a concerné par conséquent les *loci* suivants : 1p36, 1q23, 1q25, 1q31, 1q41, 5p15, 5p13p12, 7p21, 7q31, 8p23.2, 9p24, 9p23, 9p22, 9p21, 9q21, 9q31, 9q33, 9q34, 12q15, 12q11.

=> Comparaison selon le statut tumoral

Dans les 22 (68,75 %) tumeurs primitives, la moyenne d'âge était de $51,09 \pm 15,35$ [20 – 74 ans]. Dans les dix (31,25 %) cas de récidives, la moyenne d'âge était de $53,2 \pm 13,35$ [35 – 69 ans].

Nous avons retrouvé une association significative entre le statut tumoral et la délétion des loci 9p24 ($p=0,023$), 9q21 ($p=0,045$), 9q31 ($p=0,031$) et 9q33 ($p=0,025$). La délétion 9p24 était retrouvée dans 68,2 % des tumeurs primitives et 10 % des récidives, 9q21 dans 63,7 % des tumeurs primitives et 20 % des récidives, 9q31 dans 68,2 % des tumeurs primitives et dans 20 % des récidives, 9q33 dans 72,7 % des tumeurs primitives et dans 30 % des récidives (Figure 13).

Dans le cas n°1, nous avons analysé la tumeur primitive et la récidive : il n'y avait pas de modification du profil des CNV entre les deux.

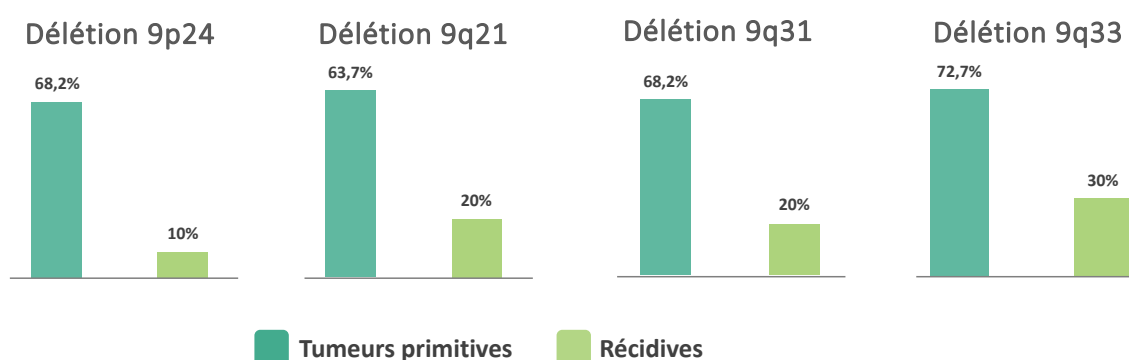


Figure 13. Association significative entre tumeurs primitives et présence des délétions 9p24 ($p=0,023$), 9q21 ($p=0,045$), 9q31 ($p=0,031$) et 9q33 ($p=0,025$)

=>Comparaison selon le sexe

La moyenne d'âge était de $44,91 \pm 17,44$ [20 – 72 ans] pour les femmes et de $55,33 \pm 11,74$ [33–74 ans] pour les hommes. On retrouvait une association significative entre le sexe masculin et la duplication de 8p23.2 ($p=0,043$). La duplication 8p23.2 était retrouvée chez 36,4 % des femmes et 66,7 % des hommes (Figure 14).

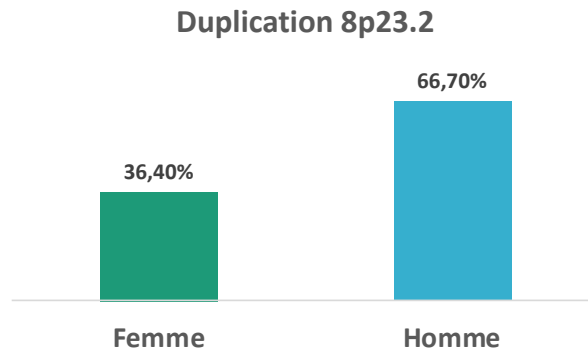


Figure 14. Fréquence (%) duplication 8p23.2 en fonction du sexe

=>Comparaison selon la localisation

La moyenne d'âge était de $49,64 \pm 14,16$ [20–72 ans] pour les tumeurs du clivus et de $66,5 \pm 7,59$ [56–74 ans] pour les tumeurs du sacrum. Une association significative entre la localisation au niveau du clivus et la duplication 7q31 ($p=0,031$) a été observée. Elle était présente dans 75 % des tumeurs du clivus et dans 25 % des tumeurs du sacrum (Figure 15).

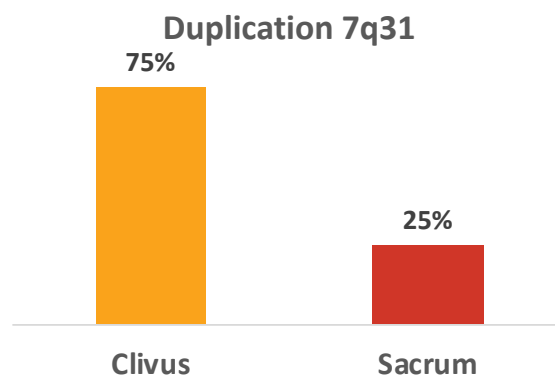


Figure 15. Fréquence (%) de la duplication 7q31 en fonction de la localisation

=>Comparaison selon les critères histologiques

Nous avons retrouvé une association significative entre les types histologiques classique et chondroïde et le gain du *locus* 1q23 ($p=0,036$), entre un index Ki67 supérieur à 5 % et le gain 1q41 ($p=0,037$) et également entre la présence d'atypies nucléaires de grade 2-3 et la délétion du *locus* 9p21 ($p=0,039$).

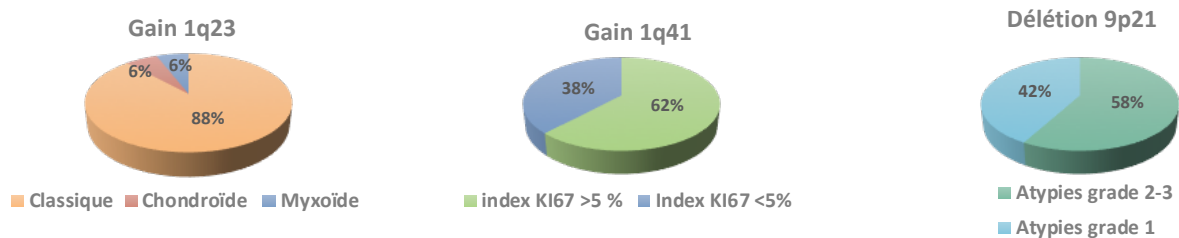


Figure 16. Anomalies chromosomiques associées aux critères histologiques

IV.4. Next Generation Sequencing (NGS)

La technique NGS nous a permis de rechercher des anomalies de type SNP (Single Nucleotide Polymorphisme), insertion, ou délétion, sur 84 gènes intervenant sur la régulation du cycle cellulaire.

Après l'analyse bioinformatique des données, nous avons décidé de retenir pour l'analyse statistique uniquement les variants retrouvés au moins 3 fois parmi les tumeurs primitives et les récidives. Tous les variants mis en évidence 2 fois ou plus dans les tumeurs sont listés en annexe 3 et 4.

Dans les récidives, aucun variant n'a été observé comme étant présent au moins 3 fois, ce qui ne nous a pas permis de réaliser une étude statistique pour ce paramètre biologique dans ces tumeurs. Les variants mis en évidence sont cependant présentés en annexe 4.

En revanche, parmi les vingt-deux tumeurs primitives, 15 variants ont été retrouvés dans au moins 3 échantillons tumoraux (Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des anomalies trouvées en NGS

Variant	Gène	Chr	Position génomique	Mutation	Protéine	Type	Localisation	Patient (fréquence allélique en %)	Cosmic	dbSNP
1	<i>CDKN2B</i>	9p21.3	22006273	n.-3C>A		snp	intronique	12 (42), 15 (59), 18 (53), 21 (51), 22 (34) et 27 (30)	-	rs2069426
2	<i>CDC25B</i>	20p13	3780865	n.-853 G>A		snp	intronique	12 (8,4) , 15 (8,2), 22 (6,9), 30 (8,1) et 31 (5,3)	-	rs80262984
3	<i>CDC25B</i>	20p13	3780867	n.-851 G>A		snp	intronique	12 (8,4) , 15 (8,2), 22 (5,7), 30 (8,3) et 31 (5,6)	-	rs74515351
4	<i>PPP2R2C</i>	4p16.1	6415585	c.50-32764A>G		snp	intronique	9 (44), 22 (53), 23 (42) et 29 (50)	-	rs10213664
5	<i>CDKN1A</i>	6p21.1	36653597	c.*20C>T		snp	variant 3 prime UTR	8 (50), 17 (53), 22 (47) et 31 (46)	-	rs1059234
6	<i>PPP2CB</i>	8p12	30651335	c.-2540A>G		snp	intronique	18 (56), 21 (44), 22 (50), 23 (50)	-	rs981406803
7	<i>PPP2R3B</i>	Xq27.1	322193	c.457G>A	p.Ala157Thr	snp	variant faux sens	3 (47), 8 (50), 21 (48) , 31 (99)	COSM7229806;COSM7229807	rs3813593
8	<i>PPP2R3B</i>	Xp22.33	322335	n.-84G>A		snp	intronique	3 (47), 8 (47), 21 (40), 31 (100)	COSM7229913;COSM7229914	rs73178045
9	<i>E2F7</i>	12q21.2	77438436	c.969A>G	p.Pro323Pro	snp	variant synonyme	6 (100), 7 (99) et 10 (100)	-	rs2242384
10	<i>MKI67</i>	10q26.2	129906445	c.3659C>T	p.Ala1220Val	snp	intronique	3 (5,4), 15 (5,4) et 26 (5,7)	-	rs997246
11	<i>TGFB1</i>	19q13.2	41858876	c.74G>C	p.Arg25Pro	snp	variant faux sens	27 (50), 29 (56), 30 (58)	-	rs1800471
12	<i>CDC25B</i>	20p13	3780864	n.-854_-853insAGACCTGGTGCTAGGGACTGG		insertion	intronique	15 (79), 28 (75), 30 (81)	-	-
13	<i>PPP2R3A</i>	3q22.3	135806811	n.-56 T>C		snp	intronique	4 (26), 18 (98) et 27 (66)	-	rs3772390
14	<i>PPP2R3A</i>	3q22.3	135742058	c.-3829_-3828insGTTTT		snp	intronique	12 (15), 22 (34) et 27 (38)	-	-
15	<i>CCNE2</i>	8q22.1	95906034	c.-3350G>T		snp	intronique	15 (50), 23 (57) et 29 (61)	-	rs28399556



Le variant *CDKN2B* n.-3C>A était uniquement présent chez les hommes ($p=0,04$). De plus, la présence des variants *CDKN1A* c.*20C>T ($p=0,01$), *PPP2R3B* c.457G>A ($p=0,01$) et *PPP2R3B* n.-84G>A ($p=0,01$) était associée de manière significative avec le sous-type histologique, puisqu'ils n'ont pas été observés dans le sous-type myxoïde (Tableau 5). Aucune association significative n'a été mise en évidence avec les autres données clinico-pathologiques.

Tableau 5 : Association entre les variants mis en évidence dans les tumeurs primitives et les données clinico-pathologiques

Variant	Statut	Statut			Sexe			Âge (année)			Histologie				Localisation		
		Prim	Réci	p	F	H	p	≤ 55	> 55	p	Cl	Chon	Myx	p	Clivus	Sacrum	p
<i>CDC25B</i> n-853G>A	Présent	4	0	0,15	2	2	0,58	3	1	0,35	2	1	1	0,4	4	0	0,42
	Absent	18	10		10	18		14	14		22	2	4		28	4	
<i>CDC25B</i> n-851G>A	Présent	5	0	0,1	2	3	0,9	3	2	0,74	3	1	1	0,62	5	0	0,36
	Absent	17	10		10	17		14	13		21	2	4		23	4	
<i>RP11-30504.3</i> n-56T>C	Présent	3	0	0,22	0	3	0,16	1	2	0,47	2	1	0	0,28	3	0	0,49
	Absent	19	10		12	17		16	13		22	2	5		25	4	
<i>CDKN2B</i> n-3C>A	Présent	6	0	0,07	0	6	0,04	3	3	0,86	5	1	0	0,44	6	0	0,3
	Absent	16	10		12	14		14	12		19	2	5		22	4	
<i>MKI67</i> c.3659C>T	Présent	3	0	0,22	0	3	0,16	1	2	0,47	3	0	0	0,58	2	1	0,25
	Absent	19	10		12	17		16	13		21	3	5		26	3	
<i>PPP2R2C</i> c.50-32764A>G	Présent	1	0	0,49	1	0	0,19	1	0	0,34	1	0	0	0,84	1	0	0,7
	Absent	21	10		11	20		16	15		23	3	5		27	4	
<i>CDKN1A</i> c.*20C>T	Présent	4	0	0,15	2	2	0,58	2	2	0,89	2	2	0	0,01	4	0	0,42
	Absent	18	10		10	18		15	13		22	1	5		24	4	
<i>PPP2CB</i> c.-2540A>G	Présent	4	0	0,15	0	4	0,1	2	2	0,89	4	0	0	0,47	4	0	0,42
	Absent	18	10		12	16		15	13		20	3	5		24	4	
<i>PPP2R3B</i> c.457G>A	Présent	4	0	0,15	2	2	0,58	3	1	0,35	2	2	0	0,01	3	1	0,42
	Absent	18	10		10	18		14	14		22	1	5		25	3	
<i>PPP2R3B</i> n.-84G>A	Présent	4	0	0,15	2	2	0,58	3	1	0,35	2	2	0	0,01	3	1	0,42
	Absent	18	10		10	18		14	14		22	1	5		25	3	
<i>E2F7</i> c.969A>G	Présent	3	0	0,22	1	2	0,88	2	1	0,62	2	0	1	0,6	2	1	0,25
	Absent	19	10		11	18		15	14		22	3	4		26	3	
<i>TGFB1</i> c.74G>C	Présent	3	0	0,22	2	1	0,27	3	0	0,09	1	1	1	0,18	3	0	0,49
	Absent	19	10		10	19		14	15		23	2	4		25	4	
<i>CDC25B</i> n.-854_-853ins	Présent	3	0	0,22	2	1	0,27	3	0	0,09	2	0	1	0,6	3	0	0,49
	Absent	19	10		10	19		14	15		22	3	4		25	4	
<i>PPP2R3A</i> c.-3829_-3828ins	Présent	3	0	0,22	0	3	0,16	1	2	0,47	2	1	0	0,28	3	0	0,49
	Absent	19	10		12	17		16	13		22	2	5		25	4	
<i>CCNE</i> c.-3350G>T	Présent	3	0	0,22	1	2	0,88	3	0	0,09	3	0	0	0,56	3	0	0,49
	Absent	19	10		11	18		14	15		21	3	5		25	4	

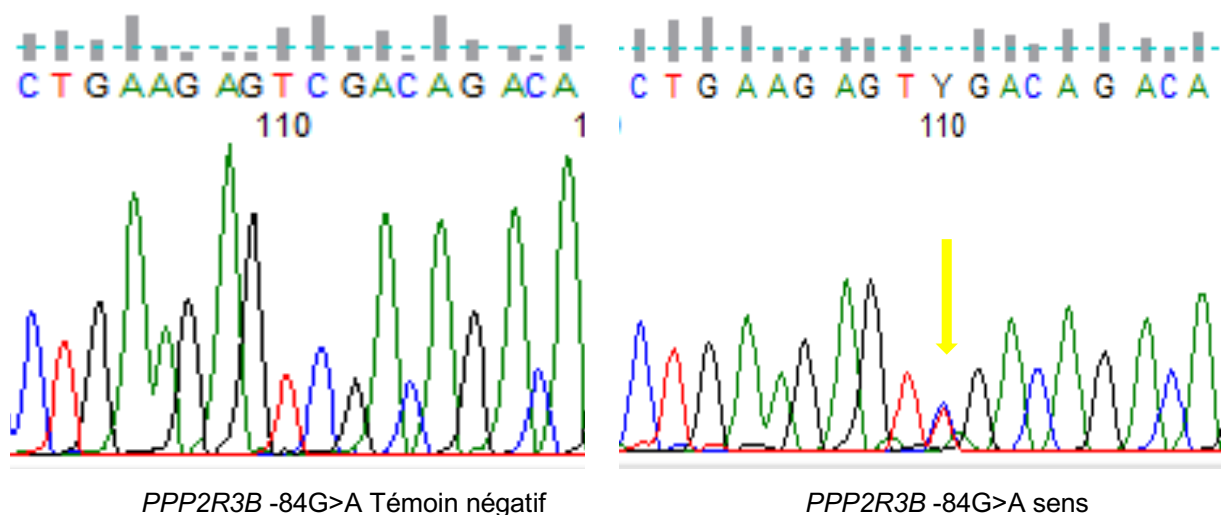
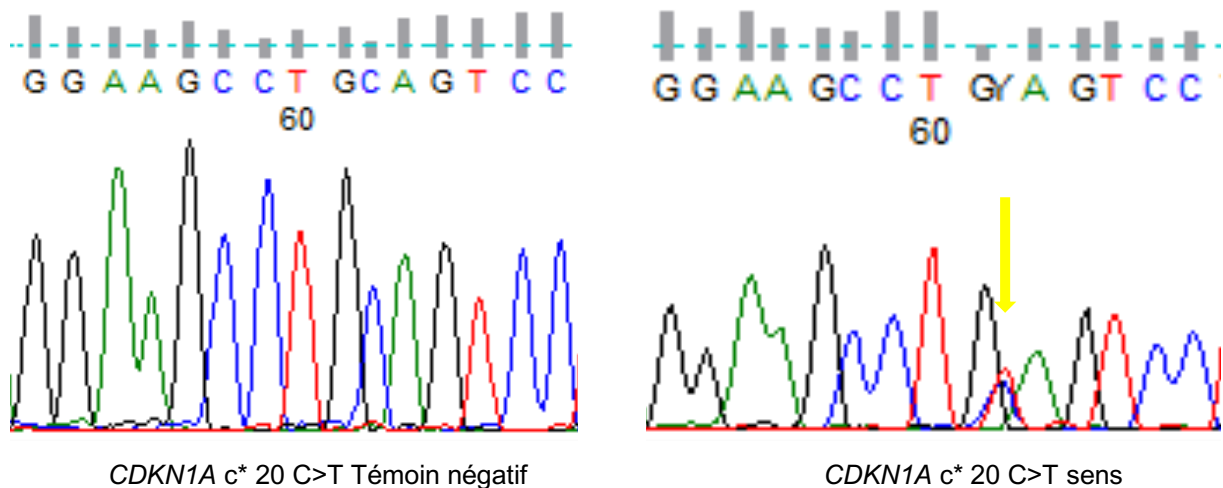


IV.5. Vérifications des mutations trouvées par séquençage Sanger

Nous avons vérifié par un séquençage Sanger les mutations trouvées en NGS et pour lesquelles nous avons une différence significative :

- selon le type histologique : *CDKN1A* c* 20C>T, *PPP2R3B* -84G>A et *PPP2R3B* c. 457G>A
- selon le sexe : *CDKN2B* -3C>A.

Ces 4 mutations ont bien été confirmées lors du séquençage Sanger (Figure 17, 18, 19 et 20).



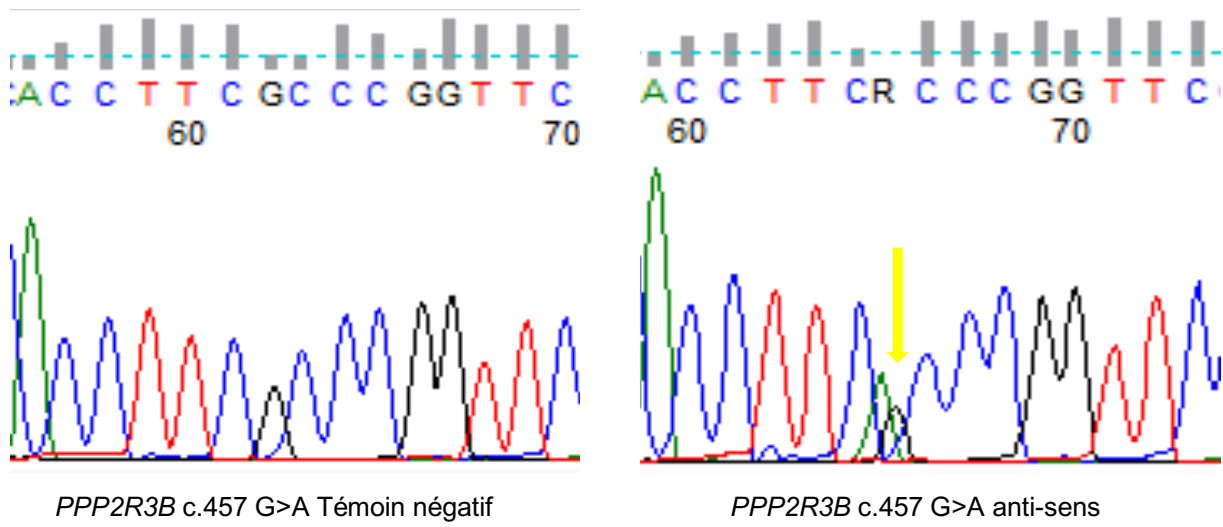


Figure 19. Vérification Sanger *PPP2R3B* c.457 G>A

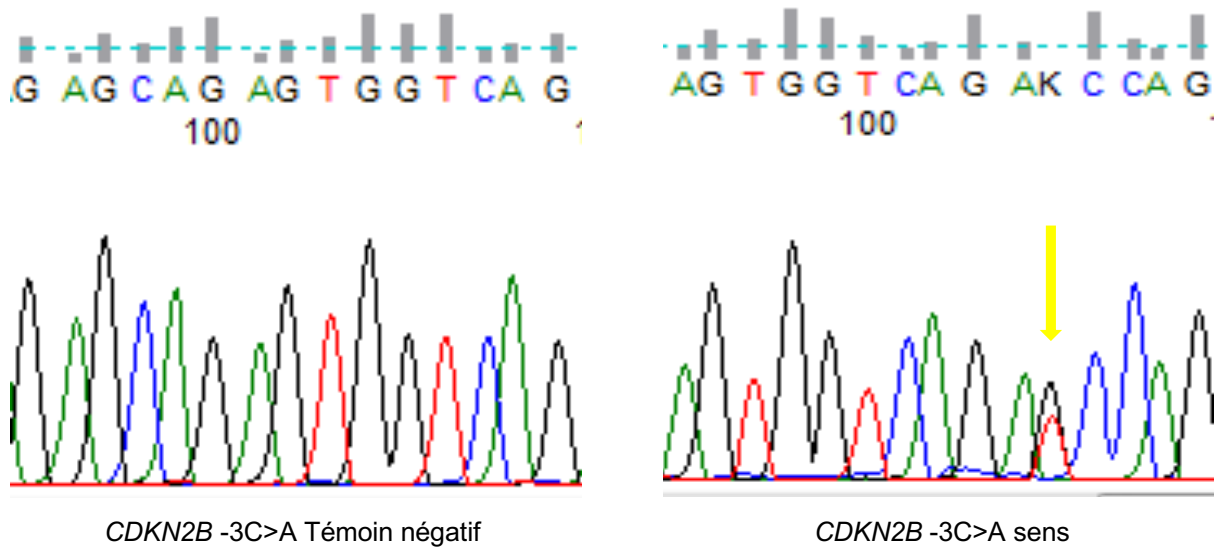


Figure 20. Vérification Sanger *CDKN2B* -3C>A

V. Discussion

V.1. Anatomie pathologique

Tous les cas inclus dans notre étude exprimaient Brachyury, le marqueur diagnostique le plus spécifique des chordomes actuellement. Les données de notre série sont proches de celles de Tauziède-Espariat *et al.* (7). Par exemple, 3 de nos cas présentaient des zones de nécrose soit 9,4 % contre 11, 1 % dans la série de Tauziède-Espariat *et al.* (7).

Cependant, nous n'avions que 4 tumeurs avec un index mitotique supérieur à 3 (12,5 %) alors que dans la série de Tauziède-Espariat *et al.*, 37 % de chordomes étudiés avaient un index mitotique supérieur ou égal à 3 (7).

Dans notre étude, l'index Ki67 moyen était de 7,5 % [1 – 39 %] avec 15 (46, 9 %) tumeurs présentant un index supérieur à 6 %. Tauziède-Espariat *et al.* rapportaient 55 (49,5 %) tumeurs avec un Ki67 supérieur ou égal à 6 % avec une moyenne de 8 % [1 – 37 %].

V.2. Analyse Chromosomique sur Puce à ADN

V.2.1. Aspects techniques

Nous avons rencontré deux principales difficultés. La première concernait l'utilisation d'acide chlorhydrique, contenu dans le Rapide Décalcifiant Osseux (RDO), lors de la décalcification de certains prélèvements opératoires, entraînant une dégradation des acides nucléiques. La seconde concernait l'analyse en aCGH nécessitant une quantité d'ADN relativement importante (minimum 200 ng) ce qui peut être délicat à obtenir à partir de matériel en paraffine. Ces difficultés avaient déjà été rapportées par Alers *et al.* en 1999 et Brandal *et al.* en 2005 (14,35).

Initialement, notre série comportait 40 tumeurs. Huit échantillons n'ont pas pu être analysés en raison de ces aspects techniques. Dans notre étude, l'ADN tumoral a été obtenu pour cinq patients à partir de tissu tumoral congelé. Une extraction d'ADN à partir de bloc de paraffine a été réalisée pour les autres patients.

En raison des difficultés techniques que nous avons rencontrées, il nous semble important d'éviter l'utilisation de RDO lorsque cela est possible et d'effectuer des prélèvements congelés systématiques à visée de recherche pour ces tumeurs rares, lorsque la quantité de matériel le permet.

Le nombre de CNV peut varier en fonction des seuils utilisés pour la détection des gains et des délétions, notamment en mosaïque avec la présence d'anomalies clonales. Nous avons réalisé une analyse pour rechercher des mosaïques avec des log ratio $\geq |0,1|$ pour les délétions et les gains, le nombre minimum de sondes était de 10.

V.2.2. Cohorte de patients

Notre série de trente-deux chordomes fait partie des études les plus importantes de la littérature, qui ne concernent au maximum, qu'une vingtaine de cas (22 cas pour Diaz *et al.*, 21 cas pour Hallor *et al.* et Le *et al.*, 16 cas pour Scheil *et al.*, 10 cas pour Sa *et al.*, et 6 cas pour Brandal *et al.*) (12–17).

La localisation tumorale de la majeure partie de nos observations était le clivus (28 soit 87,5 %). Seuls Diaz *et al.* rapportaient 21 tumeurs du clivus et Sa *et al.* 10 tumeurs du clivus tandis que dans les autres séries, cette localisation ne dépassait pas 6 observations (12–17).

- Délétions chromosomiques

Dans notre étude, les anomalies chromosomiques les plus fréquentes étaient les délétions, ce qui est concordant avec les données de Diaz *et al.* et Hallor *et al.* (12,15) mais à l'inverse, Brandal *et al.* et Scheil *et al.* ont rapporté plus de gains (14,16).

Les délétions des chromosomes 1p, 3, 4, 9, 10, 13q, 14q, 18, 19 et 22q étaient les plus fréquentes.

Plus de 60 % des tumeurs présentaient une délétion de la région 1p36. Cette anomalie a été rapportée par Hallor *et al.* et Miozzo *et al.* et pourrait être impliquée dans l'oncogenèse des chordomes familiaux et sporadiques (12,36). Dans cette région, se situent en effet plusieurs gènes d'intérêt. L'un d'entre eux est le gène suppresseur de tumeur *RUNX3* impliqué dans la maturation des chondrocytes (37). On retrouve également le gène suppresseur de tumeur *E2F2* qui est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en codant pour des protéines nécessaires à l'entrée en phase S et des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN et la réplication chromosomique (26). Le gène *CAMTA1*, également localisé en 1p36, est un gène suppresseur de tumeur, impliqué dans l'oncogenèse de tumeurs d'origine neurale ou neuroectodermique (38).

La délétion 1p36 est un évènement fréquent en pathologie tumorale. Elle est présente dans différents types tumoraux comme les oligodendrogliomes (70 à 85 % des cas), les astrocytomes (20 à 30 %), les neuroblastomes (30 %), les sarcomes d'Ewing (15 %) mais aussi dans 30 à 40 % des carcinomes ovariens et 30 % d'adénome parathyroïdien (39,40).

Une délétion de 9p21 était présente dans plus de 50 % des tumeurs de notre série. Cette anomalie a été rapportée dans près de 70 % des chordomes d'après l'OMS (2). Le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* y est localisé. *CDKN2A* participe à la régulation du cycle cellulaire en inhibant le complexe cycline D/CDK4 à la phase G1/S (27). Sa délétion pourrait favoriser la prolifération des cellules tumorales.

Nous avons retrouvé une association significative entre les atypies nucléaires et la délétion 9p21. Zenonos *et al.* ont montré en 2018 une association significative entre la délétion homozygote de 9p21 et la réduction de la durée de survie sans progression (41). La délétion 9p21 pourrait être un marqueur d'agressivité des chordomes.

Il existait une association significative entre le statut tumoral, tumeur primitive ou récidive, et la délétion des *loci* 9p24, 9q21, 9q31, 9q33.

La délétion 9p24 était retrouvée dans 68,2 % des primitives et 10 % des récidives, 9q31 dans 68,2 % des primitives et dans 20 % des récidives, 9q33 dans 72,7 % des primitives et dans 30 % des récidives.

Le gène *JAK2* situé en 9p24 participe à l'activation des voies STAT3 et Pi3K et à la prolifération cellulaire. Dans le cas du patient 1 où nous avons la tumeur primitive puis la récidive, il n'y a pas de différence entre les deux au niveau des CNV. Ces résultats pourraient être dûs à un biais lié à l'effectif de notre population.

Une délétion de 10q23 où est localisé le gène *PTEN* a également été observée dans plus de 50 % de nos observations. Cette anomalie, déjà rapportée dans la littérature, pourrait être un des mécanismes physiopathologiques de l'oncogenèse des chordomes (13,22). En effet, l'absence de ce gène suppresseur de tumeur pourrait être un facteur de stimulation de la voie PI3K/AKT favorisant la prolifération cellulaire. Cette anomalie a déjà été rapportée dans les cancers de prostate, les glioblastomes, les mélanomes (42–44).

Dans notre série, nous avons observé 25 % de délétions des bras courts du chromosome 16 et du chromosome 17 et moins de 5 % de délétions du bras long du chromosome 2. Ces résultats diffèrent de ceux des études de Hallor *et al.* et Le *et al.* dans lesquelles plus du tiers des tumeurs présentaient une de ces altérations chromosomiques (12,13). En revanche, nos résultats sont similaires à ceux de Diaz *et al.* qui ont retrouvé respectivement 16 % et 14% de délétion de 16p et 17p (15).

Ces différences pourraient être liées à la localisation tumorale. En effet, la série Diaz *et al.* comportait 21 tumeurs du clivus et une seule du rachis tandis qu'à l'inverse, celles de Hallor *et al.* et de Le *et al.* ont quasi-exclusivement concerné des localisations rachidiennes (100% et 95 %) (12,13). La fréquence des délétions chromosomiques pourrait varier en fonction de la localisation tumorale, les pertes 16p, 17p et 2q étant plus fréquentes dans les localisations rachidiennes qu'au niveau du clivus.

- Duplications chromosomiques

Dans notre série, les duplications étaient moins fréquentes que les délétions et concernaient les chromosomes 1q, 5, 6p, 7, 8, 10q, 12q, 13q, 17q, 20p et 21q.

Le locus 7p12 était dupliqué dans près de 35 % de nos cas. La duplication du chromosome 7 est l'une des plus fréquentes dans les chordomes d'après l'OMS (2). Le gène *EGFR* est localisé en 7p12 et son activation pourrait être un mécanisme important dans la physiopathologie des chordomes. En effet, ce gène joue un rôle capital dans l'activation des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT, toutes deux participant à la prolifération, la différenciation cellulaire, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose (19).

Le *locus* 7q31 était dupliqué dans près de 63 % de nos observations avec une fréquence significativement plus élevée dans les tumeurs du clivus. Le proto-oncogène *c-MET* est localisé en 7q31. D'autres auteurs ont déjà montré une forte expression de ce proto-oncogène dans des chordomes (45). Cette voie a déjà été décrite comme étant impliquée dans d'autres

processus oncogéniques (mitogénique, motogénique, morphogénique et anti-apoptotique), dans les cancers du poumon par exemple (46).

Le *locus* 1q41 était dupliqué dans près de 63 % des cas. Une association significative entre l'index Ki67 et la duplication 1q41 a été retrouvée. Le gène *TGFB2*, localisé en 1q41, est une protéine activatrice des SMAD et participe à la régulation du cycle cellulaire et à l'angiogenèse (26).

Nous avons retrouvé une association significative entre le type histologique myxoïde et la duplication du *locus* 1q23 ainsi qu'entre le sexe et la duplication 8p23.2. Celles-ci n'ont pas été rapportées dans la littérature à notre connaissance.

Contrairement aux données de la littérature, nous avons retrouvé des fréquences plus élevées de duplications du bras court du chromosome 6 en 6p22 (44 %) et du chromosome 21 en 21q21 (32 %). Seul Diaz *et al.* ont des résultats comparables aux nôtres avec près de 30 % de duplications en 6p et 14 % en 21q (15). Ces anomalies pourraient être liées à la localisation au niveau du clivus. En effet, nous n'avons retrouvé aucune duplication 6p22 et 21q21 dans les quatre cas de tumeurs du sacrum. Le bras court du chromosome 6 contient plusieurs gènes *CCND3* (6p21.1), *CDKN1A* (6p21.2), *E2F3* (6p22.3) impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (27).

- Analyse comparative avec d'autres tumeurs osseuses

L'un des principaux diagnostics différentiels du chordome myxoïde du clivus est le chondrosarcome. Il s'agit de la troisième tumeur osseuse maligne la plus fréquente affectant le plus souvent des patients âgés de plus de 50 ans avec une légère prédominance masculine (2). Contrairement aux chordomes, dans les chondrosarcomes, une plus grande fréquence des gains était rapportée par Larramendy *et al.* lors d'une analyse en aCGH sur 29 tumeurs (47). Ils concernaient le plus souvent les régions 1q, 8q, 12q, 14q, 16q, 17p, les chromosomes 20 et 21. Hameed *et al.* retrouvaient dans leur série de 23 patients, des délétions associées statistiquement à des tumeurs de haut grade sur les chromosomes 5q14.2q21.3, 6q16q25, et 9p24q12 (48).

L'autre diagnostic différentiel du chordome différencié est l'ostéosarcome, la tumeur osseuse maligne la plus fréquente (2). Dans ces tumeurs, les délétions les plus fréquemment retrouvées étaient en 3q13, 8p21, 9p13, et 13q14. Cependant, une délétion en 9p21 et du gène *CDKN2A* était rapportée dans 15 % des cas et était associée à une réduction de survie (49). Une délétion en 3q13 incluant le gène *LSAMP* a été rapportée par Kresse *et al.* comme étant corrélée à une réduction de la survie et concernait les patients atteints d'une maladie évolutive (50). Nous n'avons pas pu réaliser de tests statistiques en fonction des durées de survie dans notre étude.

Des gains du chromosome 6 et 8 ont également été rapportés dans les ostéosarcomes. Dans 40 à 50 % d'ostéosarcome, une amplification en 6p12p21 et en 8q24q21 a été retrouvée. Le gène *RUNX2*, impliqué dans la différenciation terminale en ostéoblaste, y est localisé. Sa surexpression était corrélée à une mauvaise réponse thérapeutique aux chimiothérapies (51).

Le gène *VEGFA* aussi situé en 6p12p21 favoriserait l'angiogénèse. L'oncogène *MYC*, situé en 8q24.2, était le plus fréquemment amplifié (dans 45 à 55 % des cas) (52).

Les duplications en 12q avaient déjà été rapportées dans les tumeurs mésenchymateuses et les ostéosarcomes de haut grade. En 12q13, le gène *CYP27B1* du cytochrome P450 jouerait un rôle important dans la croissance osseuse et le métabolisme du calcium. Gisselsson *et al.* en 2002, ont montré la présence d'une duplication 12p dans 9 cas d'ostéosarcomes de haut grade sur 19 et dans un ostéosarcome de bas grade (53).

V.3. Next Generation Sequencing

V.3.1. Cohorte de patients

Aucune des mutations que nous avons retrouvées n'a été rapportée dans les chordomes. À notre connaissance, aucun travail n'a été effectué en utilisant un panel NGS ne ciblant que les gènes du cycle cellulaire. Nous ne discuterons que les variants retrouvés chez au moins 3 patients. Dans notre série, il y en avait quinze. Nous les discuterons en fonction de leur type (faux-sens, synonyme, intronique). Aucun variant n'a été retrouvé au moins 3 fois parmi les récidives.

Notre analyse a montré une association significative entre la présence des variants *CDKN1A* c.*20C>T, *PPP2R3B* c.457G>A et *PPP2R3B* n.-84G>A et les types histologiques classique et chondroïde. Ils n'ont pas été observés dans le type histologique myxoïde. De plus, une association statistiquement significative a été mise en évidence entre la présence du variant *CDKN2B* n.-3C>A et le sexe, ce variant n'étant présent que chez les hommes.

Certains des SNP étaient des variants faux-sens (*TGFβ1* et *PPP2R3B*) où le codon muté code pour un autre acide aminé, ce qui modifie potentiellement la conformation de la protéine et donc sa fonction physiologique. En effet, les TGFβ constituent une grande famille de protéines impliquées dans la régulation immunitaire et dans la réparation tissulaire. Ils comprennent également des protéines impliquées dans la morphogénèse osseuse (BMP, Bone Morphogenetic Proteins). Le variant *TGFβ1* c.74G>C a été rapporté dans la maladie de Camurati-Engelmann (ou dysplasie diaphysaire progressive) caractérisée par une hyperostose des os longs, du crâne et du rachis (54). Les protéines phosphatases 2 (*PPP2R3B*) participent à l'activation du cycle cellulaire par le biais de CDK1. Le variant *PPP2R3B* a été retrouvé sur la base de données dbSNP, cependant aucune signification clinique pathogénique n'a été rapportée dans la littérature.

D'autres SNP étaient des variants synonymes (*E2F7*), dans lesquels le codon muté code pour le même acide aminé. Même si ce type de variants n'entraîne pas de changement d'acide aminé, ils pourraient être importants pour la régulation de l'expression génique en entraînant par exemple un changement de la conformation locale de l'ADN qui peut modifier son accessibilité à diverses protéines régulatrices ou son enroulement autour des histones ou d'autres nucléoprotéines. Aucune signification clinique n'a été rapportée dans la littérature concernant la mutation *E2F7*, cependant le rôle activateur des protéines E2F dans le cycle cellulaire est bien connu.

Enfin, huit des variants concernaient des modifications introniques sur les gènes *CCNE2*, *CDC25B*, *CDKN2B* ou dans les parties non traduites (5'UTR ou 3'UTR) de gènes comme *CDKN1A*.

Les mêmes remarques que pour les mutations synonymes peuvent être appliquées, c'est-à-dire un rôle possible dans la régulation d'expression génique même si ces altérations ne se situent pas dans les séquences codantes. Ces types de variants introniques peuvent entraîner, selon leur localisation, des modifications de l'épissage alternatif pouvant aboutir à des protéines différentes à partir d'un même gène. Il s'agit de gènes importants pour l'activation du cycle cellulaire (*CDC25B*, *CCNE2*, *MKI*) ou son inhibition (*CDKN2B*, *CDKN1A*). Le variant *CDKN2B* n.-3C>A a été rapporté dans les leucémies aiguës lymphoblastiques dans des précurseurs des cellules B (55). D'autre part, le variant *CDKN1A* n.*20C>T a été rapporté dans les cancers de la prostate, de l'ovaire, de l'endomètre, du colon, les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ou encore dans le rétinoblastome. Cependant, seule une association significative entre la présence de ce variant et la survenue de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou a été retrouvée (56). Aucune signification pathogénique n'a été rapportée dans la littérature concernant *CCNE2*, *CDC25B* et *MKI67*.

Wang *et al.* ont réalisé en 2016 une analyse NGS par capture sur une série de 23 chordomes. Après analyse des variations du nombre de copies et des mutations observées par séquençage, seul le gène *SETD2* était le plus souvent altéré, par mutation ou délétion (57). Ce gène ne faisait pas partie de notre panel NGS.

Fischer *et al.* ont réalisé en 2015 une analyse NGS par amplicons sur une série de 9 chordomes. Trois mutations ont été mises en évidence : *KIT* c.1621A>C chez un patient, *KDR* c.1416A>T chez 2 patients, et *TP53* c.215C>G chez 8 patients (58). Seul *TP53* était présent dans notre panel NGS. Différents variants ont été retrouvés dans ce gène dans moins de 3 tumeurs. Nous avons observé un variant c.639A>G chez les patients 13 et 16, n.-808C>A chez le patient 5, c.*3796C>T (patient 15), c.656C>T (patient 6), c.574C>T et c.572C>T (patient 23), n.-858A>T (patient 4), n.-990C>G (patient 28). Ces variants n'ont pas été rapportés dans les chordomes.

Les anomalies retrouvées dans notre série ont été validées par une autre méthode de séquençage de type Sanger. Elles devront être confirmées dans une série plus importante. Par ailleurs, ces SNP comme les altérations génomiques mises en évidence au cours de ce travail pourraient modifier l'expression génique qu'il est alors possible d'étudier en RNASeq. Une analyse en RNASeq réalisée par Bell *et al.* sur une série de 37 chordomes avec une puce de 294 transcrits de gènes a permis de mettre en évidence 5 gènes surexprimés par rapport au tissu sain contrôle : *T* (*T brachyury transcription factor*), *LMX1A*, *ZIC4*, *LHX4* et *HOXA1* (59). Sa *et al.* ont également réalisé une analyse en RNA Seq sur une série de 10 chordomes et ont retrouvé des altérations sur *MUC4*, *NBPF1*, *NPIP15* et *SAMD5-SASH1* (17).

V.3.2. Analyse comparative avec d'autres tumeurs osseuses

Cette technique d'analyse est peu rapportée dans la littérature concernant les autres tumeurs osseuses. Aucune des mutations que nous avons retrouvées n'a été rapporté dans les ostéosarcomes et chondrosarcomes. Gao *et al.* rapportaient dans un cas de récurrence de chondrosarcome une mutation de *TP53* et une délétion de *PTEN* en NGS (60). Chiappetta *et al.* rapportaient des mutations des gènes *KIF1B*, *NEB* et *KMT2C* dans une série de 8 ostéosarcomes analysés en Whole Exome Sequencing (WES) (61).

V.4. Perspectives

Depuis la découverte du marqueur Brachyury, le diagnostic des chordomes est beaucoup plus aisé notamment pour la distinction avec les chondrosarcomes ou les ostéosarcomes. Les analyses en aCGH et NGS n'apportent pas d'éléments supplémentaires au diagnostic. Cependant, pour la classification des types histologiques, les analyses biomoléculaires pourraient être utiles. En effet, nous avons retrouvé une association significative entre la présence des variants *CDKN1A* et *PPP2R3A* et les types histologiques classique et chondroïde.

Par ailleurs, l'implication des variations de nombre de copies de certains gènes clés de la régulation du cycle cellulaire devrait être explorée de manière plus approfondie en les corrélant aux durées de survie globale et sans récurrence des patients. L'analyse du niveau d'expression de certains gènes clés du cycle cellulaire pourrait permettre d'évaluer le niveau de leur implication dans les mécanismes oncogénétiques des chordomes.

Certaines thérapies ciblées tels que les anti-*EGFR*, les inhibiteurs mTOR, utilisées dans d'autres types de cancers pourraient être indiquées si le rôle de l'activation des voies de l'*EGFR* était confirmé. De nouvelles cibles thérapeutiques pourraient également émerger de toutes ces explorations.

V.5. Limites

La première limite de notre étude était son caractère rétrospectif. L'absence des données de suivi clinique et de survie permettant d'évaluer nos variables comme facteur pronostique était également une limite importante à prendre en compte. En effet, 80 % de nos patients ont été opérés entre 2016 et 2018 ce qui ne nous permettait pas d'évaluer la survie des patients avec un recul suffisant.

Par ailleurs, le nombre de tumeur du clivus était plus important que celui des tumeurs du sacrum ou du rachis. Un complément d'étude est actuellement en cours avec l'ajout d'une dizaine de chordomes sacrés dans notre étude.

Conclusion

Trente-deux tumeurs ont été analysées par Hybridation Génomique Comparative array (aCGH) et par Next Generation Sequencing (NGS).

L'analyse en aCGH montrait un nombre plus important de délétions que de duplications. Les pertes concernaient les chromosomes : 1p, 3, 4, 9, 10, 13q, 14q, 15q, 18, 19 et 22q. Les duplications portaient sur les chromosomes : 1q, 5, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 20 et 21q.

Nous avons retrouvé une association significative entre le statut et la délétion des *loci* 9p24, 9q21, 9q31, 9q33, entre le sexe masculin et la duplication de 8p23.2, entre la localisation au niveau du clivus et la duplication 7q31. Nous avons également observé une association significative entre les atypies nucléaires de type 2-3 et la délétion du *locus* 9p21, entre le type histologique myxoïde et la duplication du *locus* 1q23 et entre l'index Ki67 > 5 % et la duplication 1q41.

Lors de l'analyse en NGS, quinze variants ont été mis en évidence. Une association significative entre la présence des variants *CDKN1A* et *PPP2R3A* et les types histologiques classique et chondroïde a été observée, tandis que la présence d'un variant *CDKN2B* était significativement associée au sexe masculin. La présence de ces variants a été confirmée par séquençage Sanger.

En conclusion, les analyses chromosomique et moléculaire pourraient être utiles pour classer plus précisément les chordomes sur le plan histomoléculaire. La principale limite de notre étude a été l'absence de corrélation de nos résultats avec les données de survie des patients. Une étude prospective avec un panel histologique et de localisation tumorale plus équilibré pourrait être utile.

Références bibliographiques

1. McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM. Chordoma: Incidence and Survival Patterns in the United States, 1973-1995. *Cancer Causes Control*. 2001;12(1):1-11.
2. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. 4th Edition. IARC : Lyon; 2013.
3. Salisbury JR. Embryologie et pathologie de la notochorde humaine. *Ann Pathol*. déc 2001;21(6).
4. Jian BJ, Bloch OG, Yang I, Han SJ, Aranda D, Tihan T, et al. Adjuvant radiation therapy and chondroid chordoma subtype are associated with a lower tumor recurrence rate of cranial chordoma. *J Neurooncol* 2010;98(1):101-8.
5. Ruggieri P, Angelini A, Ussia G, Montalti M, Mercuri M. Surgical Margins and Local Control in Resection of Sacral Chordomas. *Clin Orthop Relat Res*. nov 2010;468(11):2939-47.
6. George B, Bresson D, Bouazza S, Froelich S, Mandonnet E, Hamdi S, et al. Les chordomes. *Neurochirurgie* 2014;60(3):63-140.
7. Tauziède-Espariat A, Bresson D, Polivka M, Bouazza S, Labrousse F, Aronica E, et al. Prognostic and Therapeutic Markers in Chordomas: A Study of 287 Tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2016;75(2):111-20.
8. Salle H. Développement d'un modèle de xénogreffe primaire de chordome en milieu orthotopique [Thèse de Doctorat en Médecine]. Université de Limoges; 2015.
9. Embryogénèse du tube neural.
https://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/diffdev1/page11.html
10. Université Catholique de Louvain. Segmentation du sclérotome.
<http://www.md.ucl.ac.be/didac/anat110/Squelette/col%20vertebr.png>
11. Oakley GJ, Fuhrer K, Seethala RR. Brachyury, SOX-9 and podoplanin, new markers in the skull base chordoma vs chondrosarcoma differential: a tissue microarray-based comparative analysis. *Mod Pathol* 2008;21(12):1461-9.
12. Hallor KH, Staaf J, Jönsson G, Heidenblad M, Vult von Steyern F, Bauer HCF, et al. Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer* 2008;98(2):434-42.
13. Le LP, Nielsen GP, Rosenberg AE, Thomas D, Batten JM, Deshpande V, et al. Recurrent Chromosomal Copy Number Alterations in Sporadic Chordomas. Aziz SA, éditeur. *PLoS One* 2011;6(5):e18846.
14. Brandal P, Bjerkehagen B, Danielsen H, Heim S. Chromosome 7 abnormalities are common in chordomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;160(1):15-21.
15. Diaz RJ, Guduk M, Romagnuolo R, Smith CA, Northcott P, Shih D, et al. High-resolution Whole-Genome Analysis of Skull Base Chordomas Implicates FHIT Loss in Chordoma Pathogenesis. *Neoplasia* 2012;14(9):788-IN4.
16. Scheil S, Brüderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, et al. Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1: Cytogenetics in Chordomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32(3):203-11.
17. Sa JK, Lee I-H, Hong SD, Kong D-S, Nam D-H. Genomic and transcriptomic characterization of skull base chordoma. *Oncotarget* 2017;8(1).
18. Shalaby A, Presneau N, Ye H, Halai D, Berisha F, Idowu B, et al. The role of epidermal

growth factor receptor in chordoma pathogenesis: a potential therapeutic target. *J Pathol* 2011;223(3):336-46.

19. Lièvre A, Laurent-Puig P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro dig.* 2010;II(1):38-42.

20. Dewaele B, Maggiani F, Floris G, Ampe M, Vanspauwen V, Wozniak A, et al. Frequent activation of EGFR in advanced chordomas. *Clin Sarcoma Res* 2011

21. Tamborini E, Viridis E, Negri T, Orsenigo M, Brich S, Conca E, et al. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream pathways in chordomas. *Neuro-Oncol* 2010;12(8):776-89.

22. Presneau N, Shalaby A, Idowu B, Gikas P, Cannon SR, Gout I, et al. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. *Br J Cancer* 2009;100(9):1406-14.

23. Yang C, Schwab JH, Schoenfeld AJ, Hornicek FJ, Wood KB, Nielsen GP, et al. A novel target for treatment of chordoma: signal transducers and activators of transcription 3. *Mol Cancer Ther* 2009;8(9):2597-605.

24. Choy E, MacConaill LE, Cote GM, Le LP, Shen JK, Nielsen GP, et al. Genotyping Cancer-Associated Genes in Chordoma Identifies Mutations in Oncogenes and Areas of Chromosomal Loss Involving CDKN2A, PTEN, and SMARCB1. *Duensing A, éditeur. PLoS One* 2014;9(7):e101283.

25. Mobley BC, McKenney JK, Bangs CD, Callahan K, Yeom KW, Schneppenheim R, et al. Loss of SMARCB1/INI1 expression in poorly differentiated chordomas. *Acta Neuropathol* 2010;120(6):745-53.

26. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologie moléculaire de La Cellule*. Cinquième édition. Lavoisier; 2011.

27. Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*. 2003;(5):311-26.

28. Agilent Technologies. *CGH Microarray Solutions For Genome-Wide Genetic Analysis*. 2016.

29. Li Z, Huang J, Zhao J, Chen C, Wang H, Ding H, et al. Rapid molecular genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy by semiconductor sequencing. *J Transl Med*. 2014;12(1):173.

30. Guyot A. *Étude des marqueurs moléculaires du cycle cellulaire dans des méningiomes récidivants et non récidivants [Thèse de Doctorat en Médecine]*. Université de Limoges; 2017.

31. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 2010;20(9):1297-303.

32. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 2011;27(15):2156-8.

33. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly* 2012;6(2):80-92.

34. Cingolani P, Patel VM, Coon M, Nguyen T, Land SJ, Ruden DM, et al. Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Frontiers in Genetics*. 2012;3.

35. Alers JC, Krijtenburg P-J, Vissers KJ, van Dekken H. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: EDTA Is Highly Preferable to a Routinely Used Acid Decalcifier. *J Histochem Cytochem* 1999;47(5):703-9.

36. Miozzo M, Dalprà L, Riva P, Volontà M, Macciardi F, Pericotti S, et al. A tumor

- suppressor locus in familial and sporadic chordoma maps to 1p36. *Int J Cancer*. 2000;87(1):68-72.
37. Soung DY, Dong Y, Wang YJ, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. Runx3/AML2/Cbfa3 Regulates Early and Late Chondrocyte Differentiation. *J Bone Miner Res* 2007;22(8):1260-70.
38. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic Losses at 1p36 and 19q13 in Gliomas: Correlation with Histologic Classification, Definition of a 150-kb Minimal Deleted Region on 1p36, and Evaluation of CAMTA1 as a Candidate Tumor Suppressor Gene. *Clin Cancer Res* 2005;11:1119-28.
39. Alvarez AA, Lambers AR, Lancaster JM, Maxwell GL, Ali S, Gumbs C, et al. Allele Loss on Chromosome 1p36 in Epithelial Ovarian Cancers. *Gynecol Oncol* 2001;82(1):94-8.
40. Shan L, Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Miyauchi A, Tsujimoto M, et al. Frequent Loss of Heterozygosity at 1p36.3 and p73 Abnormality in Parathyroid Adenomas. *Mod Pathol* 2001;14(4):273-8.
41. Zenonos GA, Fernandez-Miranda JC, Mukherjee D, Chang Y-F, Panayidou K, Snyderman CH, et al. Prospective validation of a molecular prognostication panel for clival chordoma. *J Neurosurg* 2019;130(5):1528-37.
42. Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, Koumakpayi IH, Katz RL, Khanna A, et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* 2009;218(4):505-13.
43. Guldberg P. Disruption of the MMAC1/PTEN Gene by Deletion or Mutation Is a Frequent Event. *Cancer Res* 1997;(57):3360-663.
44. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, et al. PTEN (MMAC1) Mutations are frequent in primary glioblastoma (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57(7):684-9.
45. Weinberger PM, Yu Z, Kowalski D, Joe J, Manger P, Psyrris A, et al. Differential Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, c-Met, and HER2/neu in Chordoma Compared With 17 Other Malignancies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131(8):707.
46. Ruppert A-M, Beau-Faller M, Belmont L, Lavolé A, Gounant V, Cadranet J, et al. Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique: MET. *Rev Mal Respir*. 2011;28(10):1241-9.
47. Larramendy ML, Valle J, Kivioja AH, Ervasti H, Karaharju E, Salmivalli T, et al. Gains, Losses, and Amplifications of DNA Sequences Evaluated by Comparative Genomic Hybridization in Chondrosarcomas. *Am J Pathol*. 1997;150(2):685-91.
48. Hameed M, Ulger C, Yasar D, Limaye N, Kurvathi R, Streck D, et al. Genome profiling of chondrosarcoma using oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;192(2):56-9.
49. Lopez-Guerrero JA, Lopez-Ginés C, Pellin A, Carda C, Llombart-Bosch A. Deregulation of the G1 to S-Phase Cell Cycle Checkpoint Is Involved in the Pathogenesis of Human Osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2004;13(2):81-91.
50. Kresse SH, Ohnstad HO, Paulsen EB, Bjerkehagen B, Szuhai K, Serra M, et al. *LSAMP*, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48(8):679-93.
51. Sadikovic B, Thorner P, Chilton-MacNeill S, Martin JW, Cervigne NK, Squire J, et al. REexseparchearstisclieon analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;(10).

52. Tarkkanen M, Elomaa I, Blomqvist C, Kivioja AH, Kellokumpu-Lehtinen P, Böhling T, et al. DNA sequence copy number increase at 8q: A potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer* 1999;84(2):114-21.
53. Gisselsson D, Pålsson E, Höglund M, Domanski H, Mertens F, Pandis N, et al. Differentially amplified chromosome 12 sequences in low- and high-grade osteosarcoma: Chromosome 12 Amplification in Osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33(2):133-40.
54. Wallace SE, Wilcox WR. *Camurati-Engelmann Disease*. Seattle: GeneReviews; 2004.
55. Hungate EA, Vora SR, Gamazon ER, Moriyama T, Best T, Hular I, et al. A variant at 9p21.3 functionally implicates CDKN2B in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia aetiology. *Nat Commun* 2016;7(1).
56. Li J, Li Z, Kan Q, Sun S, Li Y, Wang S. Association of p21 3' UTR gene polymorphism with cancer risk: Evidence from a meta-analysis. *Scientific Reports* 2015;5(1).
57. Wang L, Zehir A, Nafa K, Zhou N, Berger MF, Casanova J, et al. Genomic aberrations frequently alter chromatin regulatory genes in chordoma: copy number and mutation profiling of chordoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55(7):591-600.
58. Fischer C, Scheipl S, Zopf A, Niklas N, Deutsch A, Jorgensen M, et al. Mutation Analysis of Nine Chordoma Specimens by Targeted Next-Generation Cancer Panel Sequencing. *J Cancer*. 2015;6(10):984-9.
59. Bell D, Raza SM, Bell AH, Fuller GN, DeMonte F. Whole-transcriptome analysis of chordoma of the skull base. *Virchows Arch* 2016;469(4):439-49.
60. Gao L, Hong X, Guo X, Cao D, Gao X, DeLaney TF, et al. Targeted next-generation sequencing of dedifferentiated chondrosarcoma in the skull base reveals combined *TP53* and *PTEN* mutations with increased proliferation index, an implication for pathogenesis. *Oncotarget* 2016;7(28).
61. Chiappetta C, Mancini M, Lessi F, Aretini P, De Gregorio V, Puggioni C, et al. Whole-exome analysis in osteosarcoma to identify a personalized therapy. *Oncotarget* 2017;8(46).

Annexes

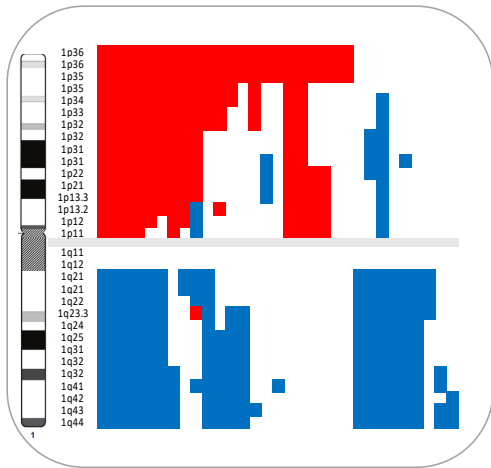
Annexe 1. Quatre-vingt-quatre gènes constituant le panel NGS	66
Annexe 2. CNV trouvés en aCGH.....	67
Annexe 3. Variants mis en évidence par NGS présents uniquement sur les tumeurs primitives	71
Annexe 4. Variants mis en évidence par NGS présents uniquement sur les récurrences	74

Annexe 1. Quatre-vingt-quatre gènes constituant le panel NGS

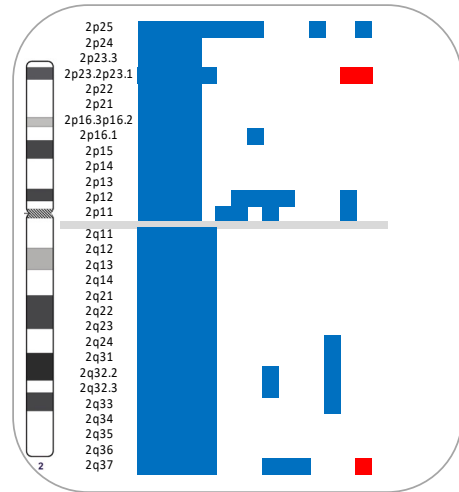
Noms	Chromosome	Localisation	Coordonnées Ensemble
CDKN2C	chr1	1p32.3	1: 51,426,417-51,440,305
E2F2	chr1	1p36.12	1: 23,832,922-23,857,712
TGFB2	chr1	1q41	1: 218,519,577-218,617,961
PPP2R5A	chr1	1q32.3	1: 212,458,879-212,535,200
YWHA5	chr1	1p36.11	1: 27,189,633-27,190,947
PLK3	chr1	1p34.1	1: 45,265,897-45,271,662
ZBTB17	chr1	1p36.13	1: 16,268,364-16,302,627
E2F6	chr2	2p25.1	2: 11,584,501-11,606,297
YWHAQ	chr2	2p25.1	2: 9,724,101-9,771,143
STRN	chr2	2p22.2	2: 37,070,783-37,193,615
CDC25A	chr3	3p21.31	3: 48,198,636-48,229,892
TFDP2	chr3	3q23	3: 141,663,277-141,868,386
PPP2R3A	chr3	3q22.3	3: 135,684,515-135,866,733
CCNA2	chr4	4q27	4: 122,737,599-122,745,087
PPP2R2C	chr4	4p16.1	4: 6,322,305-6,565,327
PLK4	chr4	4q28.2	4: 128,802,016-128,820,350
CCNG1	chr5	5q34	5: 162,864,575-162,873,157
CDC25C	chr5	5q31.2	5: 137,620,954-137,674,044
CDK7	chr5	5q13.2	5: 68,530,668-68,573,250
CCNH	chr5	5q14.3	5: 86,687,311-86,708,836
CCNB1	chr5	5q13.2	5: 68,462,837-68,474,072
PPP2R2B	chr5	5q32	5: 145,967,936-146,464,347
PPP2CA	chr5	5q31.1	5: 133,530,025-133,561,833
NIM1	chr5	5p12	5: 43,192,173-43,280,952
PLK2	chr5	5q11.2	5: 57,749,809-57,756,087
CCND3	chr6	6p21.1	6: 41,902,671-42,018,095
CDKN1A	chr6	6p21.2	6: 36,644,305-36,655,116
E2F3	chr6	6p22.3	6: 20,402,398-20,493,941
FBXO5	chr6	6q25.2	6: 153,291,654-153,304,714
PPP2R5D	chr6	6p21.1	6: 42,952,237-42,980,080
CDK6	chr7	7q21.2	7: 92,234,235-92,465,908
YWHAG	chr7	7q11.23	7: 75,956,116-75,988,348
E2F5	chr8	8q21.2	8: 86,089,460-86,129,387
CCNE2	chr8	8q22.1	8: 95,891,998-95,908,906
PPP2CB	chr8	8p12	8: 30,631,973-30,671,830
YWHAZ	chr8	8q22.3	8: 101,928,753-101,965,616
PPP2R2A	chr8	8p21.2	8: 26,149,007-26,230,196
CDKN2A	chr9	9p21.3	9: 21,967,751-21,995,300
CDKN2B	chr9	9p21.3	9: 22,002,902-22,009,362
PPP2R4	chr9	9q34.11	9: 131,873,229-131,911,225
CDK1	chr10	10q21.2	10: 62,538,089-62,554,610
MKI67	chr10	10q26.2	10: 129,894,923-129,924,649
MLLT10	chr10	10p12.31	10: 21,823,094-22,032,559
PPP2R2D	chr10	10q26.3	10: 133,747,955-133,773,331
WEE1	chr11	11p15.4	11: 9,595,228-9,615,004
CCND1	chr11	11q13.3	11: 69,455,855-69,469,242
CDKN1C	chr11	11p15.4	11: 2,904,443-2,907,111
E2F8	chr11	11p15.1	11: 19,245,610-19,263,167
CHEK1	chr11	11q24.2	11: 125,495,036-125,546,150
PPP2R1B	chr11	11q23.1	11: 111,597,632-111,637,151
PPP2R5B	chr11	11q13.1	11: 64,685,025-64,701,945
CDK4	chr12	12q14.1	12: 58,141,510-58,149,796
CDK2	chr12	12q13.2	12: 56,360,553-56,366,568
CCND2	chr12	12p13.32	12: 4,382,938-4,414,516
CDKN1B	chr12	12p13.1	12: 12,867,992-12,875,305
E2F7	chr12	12q21.2	12: 77,415,027-77,459,360
MDM2	chr12	12q15	12: 69,201,956-69,239,214
TFDP1	chr13	13q34	13: 114,239,013-114,295,785
RB1	chr13	13q14.2	13: 48,877,887-49,056,122
PPP2R3C	chr14	14q13.2	14: 35,554,673-35,591,723
PPP2R5C	chr14	14q32.31	14: 102,228,135-102,394,326
PPP2R5E	chr14	14q23.2	14: 63,838,075-64,010,092
CDKN3	chr14	14q22.2	14: 54,863,567-54,886,936
STRN3	chr14	14q12	14: 31,363,005-31,495,607
MNAT1	chr14	14q23.1	14: 61,201,460-61,436,671
PKMYT1	chr16	16p13.3	16: 3,018,025-3,030,540
RBL2	chr16	16q12.2	16: 53,467,889-53,525,561
CCNF	chr16	16p13.3	16: 2,479,395-2,508,855
E2F4	chr16	16q22.1	16: 67,226,072-67,232,821
PLK1	chr16	16p12.2	16: 23,688,977-23,701,688
TP53	chr17	17p13.1	17: 7,565,097-7,590,856
YWHAE	chr17	17p13.3	17: 1,247,566-1,303,672
CDKN2D	chr19	19p13.2	19: 10,677,138-10,679,735
CCNE1	chr19	19q12	19: 30,302,805-30,315,215
TGFB1	chr19	19q13.2	19: 41,807,492-41,859,816
PPP2R1A	chr19	19q13.41	19: 52,693,292-52,730,687
PLK5	chr19	19p13.3	19: 1,524,073-1,535,455
CDC25B	chr20	20p13	20: 3,767,578-3,786,762
RBL1	chr20	20q11.23	20: 35,724,188-35,725,581
E2F1	chr20	20q11.22	20: 32,263,489-32,274,210
YWHAB	chr20	20q13.12	20: 43,514,317-43,537,173
YWHAH	chr22	22q12.3	22: 32,340,447-32,353,590
CDR1	chrX	Xq27.1	X: 139,865,425-139,866,723
PPP2R3B	chrX	Xp22.33	X: 294,698-347,690

Annexe 2. CNV trouvés en aCGH

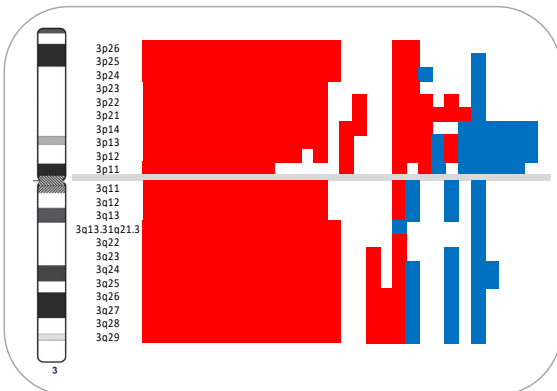
Légende : rouge=délétion, bleu=gain



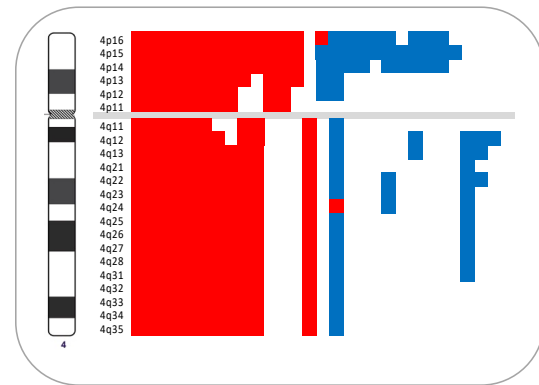
Chr 1



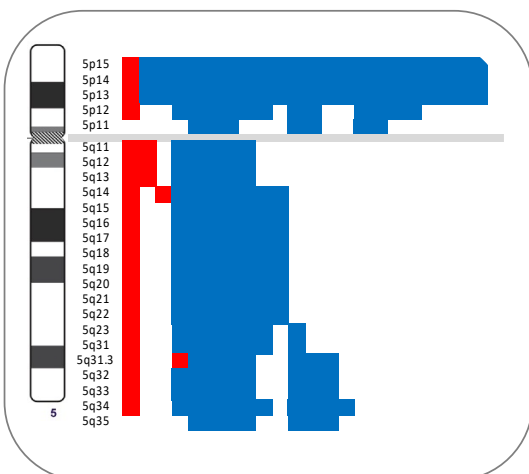
Chr 2



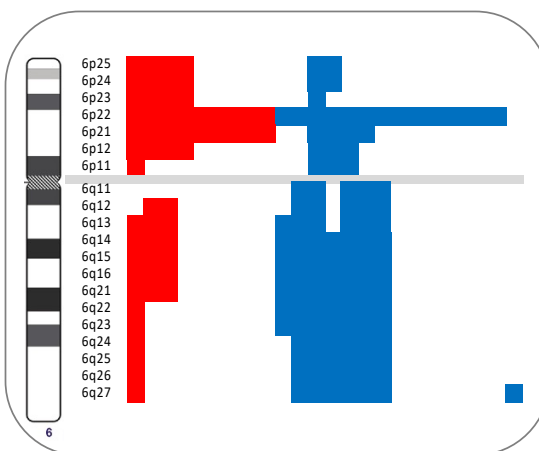
Chr 3



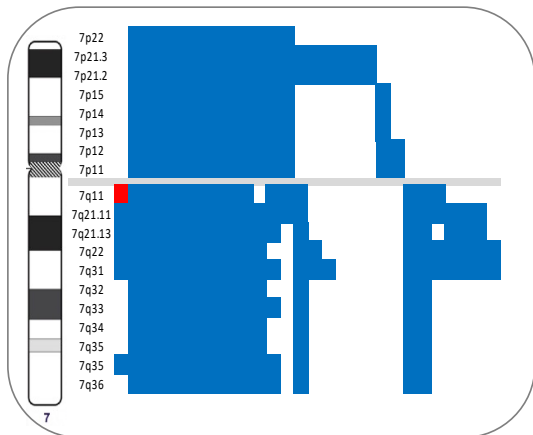
Chr 4



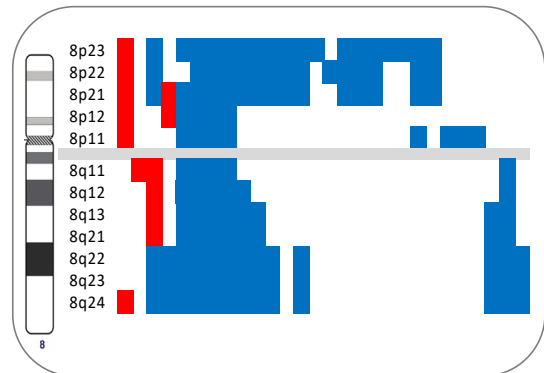
Chr 5



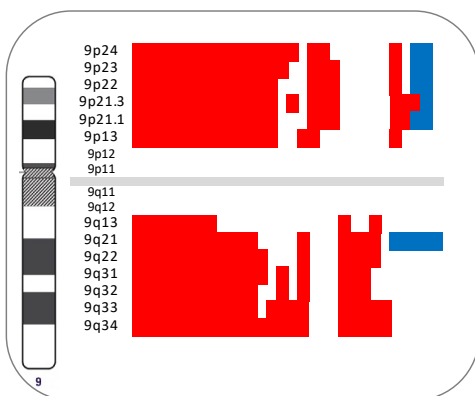
Chr 6



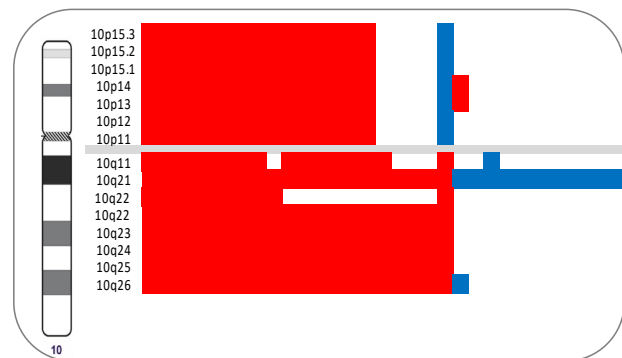
Chr 7



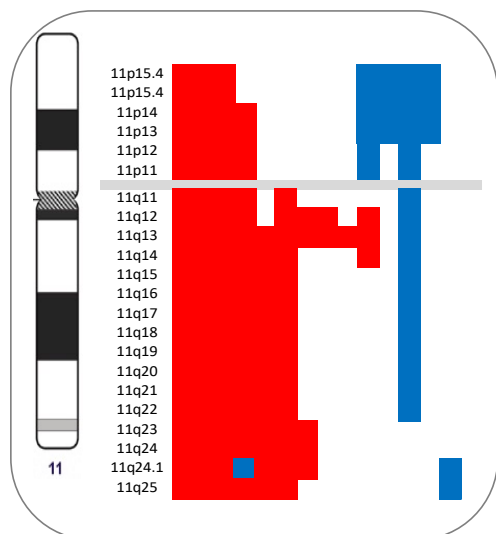
Chr 8



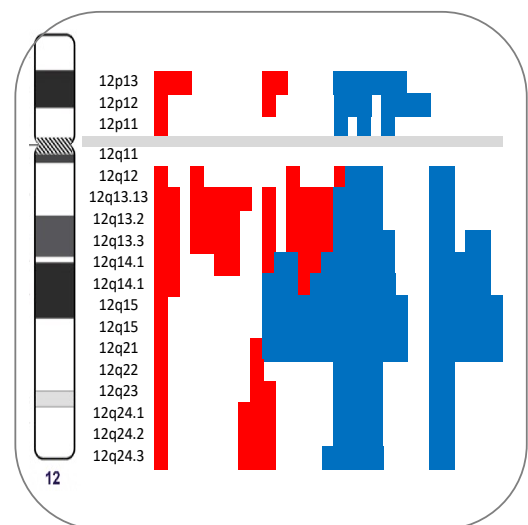
Chr 9



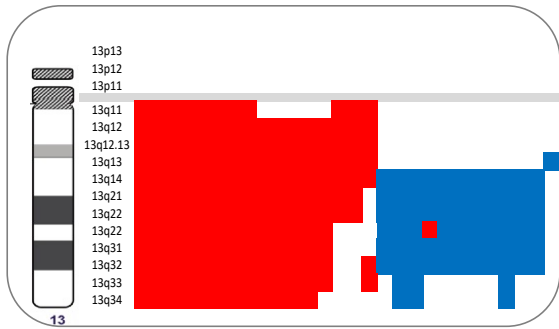
Chr 10



Chr 11



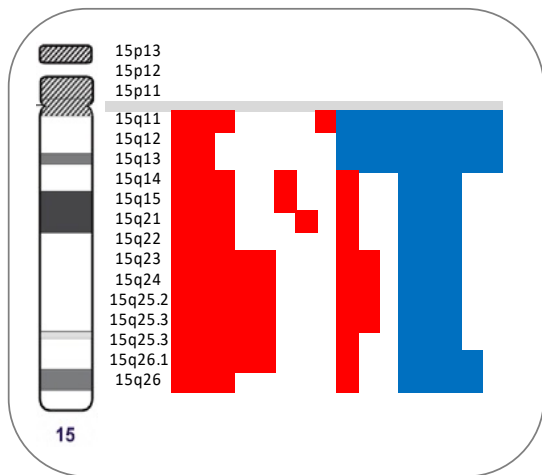
Chr 12



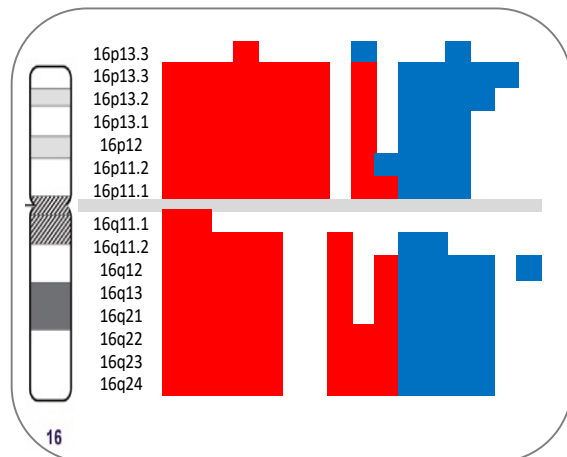
Chr 13



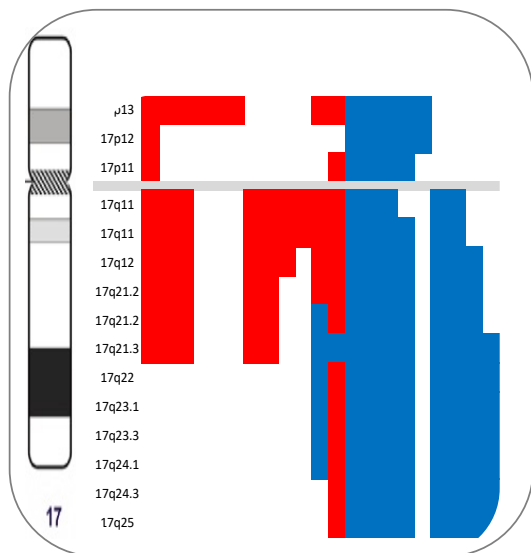
Chr 14



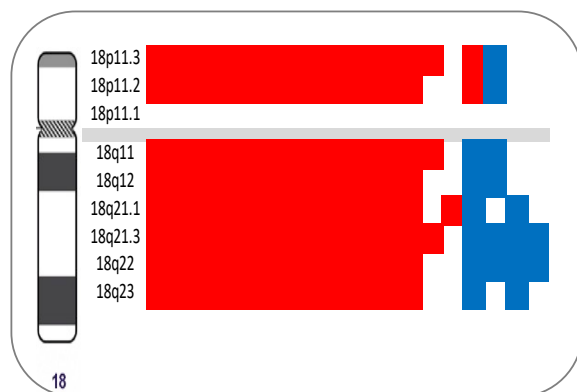
Chr 15



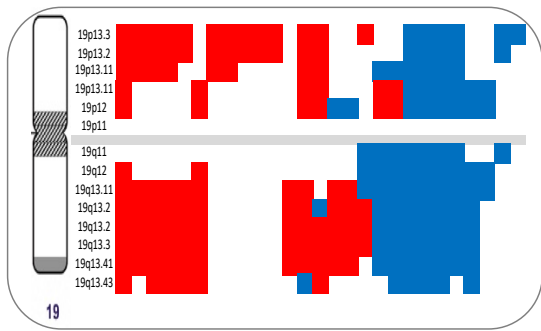
Chr 16



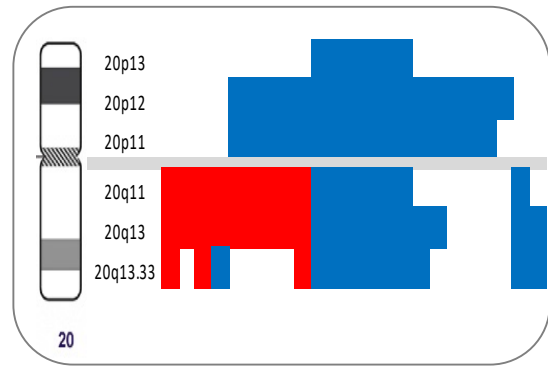
Chr 17



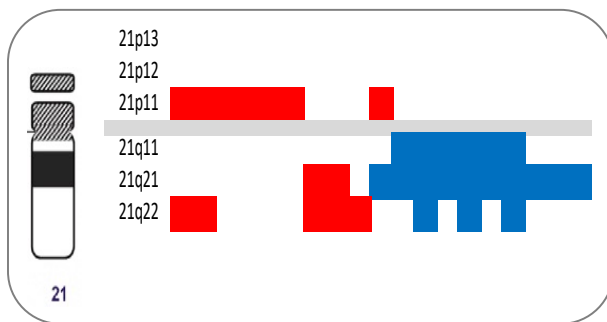
Chr 18



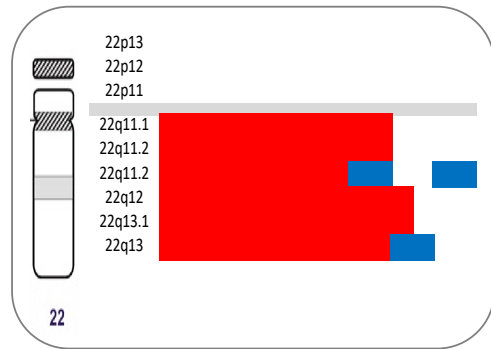
Chr 19



Chr 20



Chr 21



Chr 22

Annexe 3. Variants mis en évidence par NGS présents uniquement sur les tumeurs primitives

patients	Chr	Position	Ref	Alt	Gene	Type	Annotation	HGVS.c	HGVS.p	dbSNP	COSMIC	gnomad	clinvar
21, 22, 28, 15, 31, 12, 30	chr20	3780865	G	A	CDC25B	snp	upstream_gene_variant	n.-853G>A		-	-	-	-
21, 22, 28, 15, 31, 12, 30	chr20	3780867	G	A	CDC25B	snp	upstream_gene_variant	n.-851G>A		-	-	-	-
21, 27, 18, 4, 7, 12	chr3	135806811	A	G	RP11-305O4.3	snp	upstream_gene_variant	n.-56T>C		rs3772390	-	True	-
21, 22, 27, 15, 18, 12	chr9	22006273	G	T	CDKN2B	snp	upstream_gene_variant	n.-3C>A		rs2069426	-	True	-
22, 15, 31, 12, 30	chr20	3780877	G	A	CDC25B	snp	upstream_gene_variant	n.-841G>A		-	-	-	-
22, 26, 29, 30	chr16	23690157	T	C	PLK1	snp	5_prime_UTR_variant	c.-97T>C		-	-	-	-
22, 26, 29, 30	chr16	23690219	G	T	PLK1	snp	5_prime_UTR_variant	c.-35G>T		rs113553976	-	True	-
21, 27, 15, 18	chr19	30314458	GAAAAAAAAAAT	GAAAAAAAAAAT	CCNE1	ins	downstream_gene_variant	c.*1795dupA		-	-	-	-
15, 26, P0, 4	chr8	26217856	A	C	PPP2R2A	snp	upstream_gene_variant	n.-260A>C		-	-	-	-
2, 15, 3, 26	chr10	129906445	G	A	MKI67	snp	missense_variant	c.3659C>T	p.Ala1220Val	rs1020326417	-	-	-
18, 3, 7, 12	chr19	30303379	GA	GG	CCNE1	snp	upstream_gene_variant	c.-238A>G		-	-	-	-
22, 23, 9, 29	chr4	6415585	TG	CG	PPP2R2C	snp	intron_variant	c.50-32764A>G		rs10213664	-	True	-
22, 23, 9, 29	chr4	6415585	TG	T	PPP2R2C	del	intron_variant	c.50-32765delC		-	-	-	-
22, 31, 17, 8	chr6	36653597	C	T	CDKN1A	snp	3_prime_UTR_variant	c.*20C>T		rs1059234	-	True	-
21, 22, 23, 18	chr8	30651335	T	C	PPP2C8	snp	upstream_gene_variant	c.-2540A>G		rs981406803	-	-	-
21, 31, 8, 3	chrX	322193	C	T	PPP2R3B	snp	missense_variant	c.457G>A	p.Ala153Thr	rs3813593	COSM7229807	True	-
21, 31, 8, 3	chrX	322335	C	T	PPP2R3B	snp	upstream_gene_variant	n.-84G>A		rs73178045	-	True	-
22, 17, 10	chr10	129910475	T	G	MKI67	snp	missense_variant	c.1891A>C	p.Ile631Leu	rs997983	COSM146358	True	-
9, 31, 17	chr1	45271156	C	T	PLK3	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.1750-3C>T		rs376069887	-	True	-
P0, 4, 7	chr10	129901318	C	T	MKI67	snp	missense_variant	c.8786G>A	p.Gly2929Asp	-	-	-	-
3, 26, 29	chr10	129911767	A	T	MKI67	snp	missense_variant	c.1580T>A	p.Leu527His	-	-	-	-
22, 17, 4	chr12	4383155	A	C	CCND2	snp	5_prime_UTR_variant	c.-52A>C		-	-	-	-
6, 7, 10	chr12	77438436	T	C	E2F3	snp	synonymous_variant	c.969A>G	p.Pro323Pro	rs2242384	COSM147566	True	-
21, 7, 30	chr14	54878450	G	C	CDKN3	snp	intron_variant	c.416+26G>C		-	-	-	-
27, 8, 4	chr16	2482943	G	C	CCNF	snp	upstream_gene_variant	n.-3044G>C		-	-	-	-
27, 29, 30	chr19	41858876	C	G	TGFB1	snp	missense_variant	c.74G>C	p.Arg25Pro	rs1800471;3890	-	True	True
22, 23, 29	chr2	9727575	G	C	YWHAQ	snp	missense_variant	c.646C>G	p.Leu216Val	-	-	-	-
28, 15, 30	chr20	3780864	G	GAGACCTGGTGCTAGGGACTGG	CDC25B	ins	upstream_gene_variant	n.-854_-853insAGACCTGGTGCTAGGGACTGG		-	-	-	-
22, 27, 12	chr3	135742058	T	TGTTTT	PPP2R3A	ins	upstream_gene_variant	c.-3829_-3828insGTTTT		-	-	-	-
22, 27, 12	chr3	135742059	G	GTTTTGT	PPP2R3A	ins	upstream_gene_variant	c.-3828_-3827insTTTTGT		-	-	-	-
3, P0, 7	chr4	6382689	C	T	PPP2R2C	snp	intron_variant	c.168+35G>A		-	-	-	-
23, 15, 29	chr8	95906034	C	A	CCNE2	snp	upstream_gene_variant	c.-3350G>T		-	-	-	-
22, 3, P0	chrX	139865795	T	C	CDR1	snp	missense_variant	c.737A>G	p.Asp246Gly	-	-	-	-
22, 27	chr10	129904736	C	T	MKI67	snp	missense_variant	c.5368G>A	p.Gly1790Ser	-	-	-	-



18, 29	chr16	2499786	GTCCCTCCATCCCTCCAC	GTCCCTCCACTCCCTCCATCCCTCCAC	RP11-715J2.3	ins	downstream_gene_variant	n.*2786_*2787insTGGAGGGAG	-	-	-	-		
9, 8	chr1	16269020	G	A	ZBTB17	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.2038+4C>T	rs746081749	-	-	True	-	
23, 4	chr1	16271629	C	T	ZBTB17	snp	missense_variant	c.730G>A	p.Gly244Ser	-	-	-	-	
7, 12	chr1	16273607	C	T	ZBTB17	snp	missense_variant	c.217G>A	p.Val73Met	-	-	-	-	
3, 4	chr1	16273689	A	G	ZBTB17	snp	upstream_gene_variant	n.-4472T>C	-	-	-	-	-	
P0, 4	chr1	212459470	G	C	PPP2R5A	snp	synonymous_variant	c.18G>C	p.Pro6Pro	rs140143936	-	-	True	-
31, 4	chr1	45267456	GGGGAGGGAGGGAGGGAGGG	GGGGAGAGAGGGAGGGAGGG	PLK3	snp	upstream_gene_variant	n.-1478G>A	-	-	-	-	-	
31, 4	chr1	45267456	GGGGAGGGAGGGAGGGAGGG	GGGGAGGGAGGGAGGG	PLK3	del	upstream_gene_variant	n.-1468_-1465delAGGG	-	-	-	-	-	
31, 4	chr1	45267456	GGGGAGGGAGGGAGGGAGGG	GGGGAGGGAGGGAGGGAGGA	PLK3	snp	upstream_gene_variant	n.-1465G>A	rs746382553	-	-	True	-	
23, 7	chr1	45267470	G	A	PLK3	snp	upstream_gene_variant	n.-1470G>A	-	-	-	-	-	
P0, 6	chr10	129901371	C	T	MKI67	snp	synonymous_variant	c.8733G>A	p.Lys2911Lys	-	-	-	-	
P0, 6	chr10	129901375	T	C	MKI67	snp	missense_variant	c.8729A>G	p.Glu2910Gly	-	-	-	-	
23, 4	chr10	129901761	AG	A	MKI67	del	frameshift_variant	c.8342delC	p.Thr2781fs	-	-	-	-	
23, 4	chr10	129903010	C	T	MKI67	snp	missense_variant	c.7094G>A	p.Arg2365Lys	rs770317602	-	-	True	-
23, 3	chr10	129904154	G	A	MKI67	snp	missense_variant	c.5950C>T	p.Pro1984Ser	-	-	-	-	
4, 7	chr10	129904739	C	T	MKI67	snp	missense_variant	c.5365G>A	p.Val1789Ile	-	-	-	-	
22, P0	chr10	129905541	T	C	MKI67	snp	synonymous_variant	c.4563A>G	p.Glu1521Glu	rs1476933769;r s531121799	-	-	True	-
22, 17	chr10	129906443	G	A	MKI67	snp	synonymous_variant	c.3661C>T	p.Leu1221Leu	-	-	-	-	
8, 3	chr10	129906459	C	T	MKI67	snp	synonymous_variant	c.3645G>A	p.Lys1215Lys	rs1295705917	-	-	True	-
27, 3	chr10	129906466	G	A	MKI67	snp	missense_variant	c.3638C>T	p.Thr1213Ile	rs1214572385	-	-	True	-
21, 8	chr10	129906480	T	C	MKI67	snp	synonymous_variant	c.3624A>G	p.Lys1208Lys	-	-	-	-	
P0, 4	chr10	129907002	C	T	MKI67	snp	synonymous_variant	c.3102G>A	p.Val1034Val	rs138126066	-	-	True	-
22, 2	chr10	21901270	C	A	MLLT10	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.406-7C>A	-	-	-	-	-	
22, 3	chr10	62551883	ATTTTAA	ATTTTGT	CDK1	mnp	downstream_gene_variant	c.*162_*163delAAinsGT	-	-	-	-	-	
22, 26	chr11	111608258	C	G	PPP2R1B	snp	missense_variant	c.1825G>C	p.Val609Leu	rs45568137	COSM7352965	True	-	
4, 7	chr11	111630660	C	T	PPP2R1B	snp	synonymous_variant	c.555G>A	p.Leu185Leu	-	-	-	-	
9, 12	chr11	111635619	A	G	PPP2R1B	snp	synonymous_variant	c.216T>C	p.Tyr72Tyr	rs61757743	-	-	True	-
9, 12	chr11	111636950	G	C	PPP2R1B	snp	upstream_gene_variant	c.-360C>G	rs117554466	-	-	True	-	
4, 10	chr11	2905904	G	A	CDKN1C	snp	synonymous_variant	c.816C>T	p.Ile272Ile	-	-	-	-	
26, 4	chr11	9595944	G	A	WEE1	snp	missense_variant	c.464G>A	p.Gly155Glu	-	-	-	-	
27, 8	chr12	56365285	A	G	PMEL	snp	upstream_gene_variant	c.-5490T>C	rs2069412	-	-	True	-	
3, 10	chr12	77440011	C	G	E2F7	snp	synonymous_variant	c.636G>C	p.Arg212Arg	rs61754234	COSM3753497	True	-	
P0, 6	chr13	114285999	C	T	TFDP1	snp	missense_variant	c.248C>T	p.Thr83Ile	FALSE	-	-	-	
4, 7	chr13	48878154	G	A	RB1	snp	missense_variant	c.106G>A	p.Asp36Asn	rs745822791;45 8113	COSM7349816	True	True	
15, 17	chr14	102323093	T	C	PPP2R5C	snp	splice_region_variant&non_coding_transcript_exon_v ariant	n.456T>C	rs61735777	rs986503833; rs145432131	COSM23137	True	-	
29, 12	chr16	2493623	C	T	CCNF	snp	upstream_gene_variant	c.-81C>T	-	-	-	True	-	
12, 30	chr16	2499777	A	G	RP11-715J2.3	snp	downstream_gene_variant	n.*2805T>C	-	-	-	-	-	



21, 10	chr16	2506862	G	A	CCNF	snp	synonymous_variant	c.2202G>A	p.Ser734Ser	rs115100621	-	True	-
17, 4	chr16	3023108	C	T	PAQR4	snp	3_prime_UTR_variant	c.*1159C>T	-	-	-	-	-
P0, 6	chr16	53495646	T	C	RBL2	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.1347-TT>C	-	COSM5913789	-	-	-
18, P0	chr17	7576501	G	A	TP53	snp	downstream_gene_variant	c.*352C>T	rs77697176	-	-	True	-
6, 7	chr17	7576942	G	A	TP53	snp	upstream_gene_variant	c.-39C>T	-	-	-	-	-
15, 7	chr17	7578145	CT	C	TP53	del	upstream_gene_variant	c.-1243delA	-	-	-	-	-
15, 7	chr17	7578145	CT	CC	TP53	snp	upstream_gene_variant	c.-1243A>G	rs34949160	COSM4775026	True	True	-
23, 12	chr19	1527036	G	A	PLK5	snp	sequence_feature	c.2+39G>A	rs2656859	-	True	-	-
3, P0	chr19	1527038	G	A	PLK5	snp	sequence_feature	c.2+41G>A	rs184594773	-	True	-	-
21, 3	chr19	1528254	G	A	PLK5	snp	upstream_gene_variant	n.-82G>A	-	-	-	-	-
21, 26	chr19	52716143	G	A	PPP2R1A	snp	downstream_gene_variant	c.*12578G>A	-	-	-	-	-
27, 3	chr20	32266134	C	T	E2F1	snp	missense_variant	c.598G>A	p.Gly200Ser	rs35385772	-	True	-
27, P0	chr20	32274102	G	A	E2F1	snp	5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant	c.-32C>T	-	-	-	-	-
22, 7	chr20	35661254	G	A	RBL1	snp	synonymous_variant	c.2196C>T	p.Ile732Ile	rs758882251	-	True	-
17, 4	chr20	35696609	GA	G	RBL1	del	upstream_gene_variant	c.-154delT	-	-	-	-	-
28, 30	chr20	3780864	G	GAGACCTGGTGCTAGGGACTG	CDC25B	ins	upstream_gene_variant	n.-854_-853insAGACCTGGTGCTAGGGACTG	-	-	-	-	-
23, 3	chr20	3784231	C	T	CDC25B	snp	downstream_gene_variant	n.*127C>T	-	-	-	-	-
31, 12	chr3	135720984	T	G	PPP2R3A	snp	missense_variant	c.644T>G	p.Leu215Trp	-	-	-	-
4, 6	chr3	135742057	G	GTGTTT	PPP2R3A	ins	upstream_gene_variant	c.-3830_-3829insGTGTTT	-	-	-	-	-
22, 27	chr3	135742058	T	TGTTTT	PPP2R3A	ins	upstream_gene_variant	c.-3829_-3828insGTTTT	-	-	-	-	-
P0, 6	chr3	141671391	C	A	TFDP2	snp	missense_variant	c.1305G>T	p.Glu435Asp	-	-	-	-
7, 10	chr3	48200412	G	A	CDC25A	snp	3_prime_UTR_variant	c.*23C>T	rs559315178	-	True	-	-
26, 12	chr4	128811117	G	C	PLK4	snp	missense_variant	c.1556G>C	p.Trp519Ser	rs56043017	COSM6469283	True	-
1, 12	chr4	6330938	C	G	PPP2R2C	snp	downstream_gene_variant	n.*4435G>C	rs6829844	-	True	-	-
22, 3	chr4	6349558	G	A	PPP2R2C	snp	downstream_gene_variant	n.*95C>T	-	-	-	-	-
4, 7	chr4	6349568	C	T	PPP2R2C	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.790+5G>A	-	-	-	-	-
4, 7	chr4	6382668	C	T	PPP2R2C	snp	intron_variant	c.168+56G>A	-	-	-	-	-
28, 9	chr5	137627623	A	G	CDC25C	snp	downstream_gene_variant	c.*51T>C	rs11567991	-	True	-	-
28, 9	chr5	137627625	G	T	CDC25C	snp	downstream_gene_variant	c.*49C>A	rs11567990	-	True	-	-
22, 15	chr5	146258290	AGCTGC	AGCTGCTGCTGC	PPP2R2B	ins	5_prime_UTR_variant	c.-272_-267dupGCAGCA	-	-	-	-	-
22, 15	chr5	146258290	AGCTGC	AGCTGCTGCTGC	PPP2R2B	ins	5_prime_UTR_variant	c.-275_-267dupGCAGCAGCA	-	-	-	-	-
9, 17	chr6	153296753	C	A	FBXO5	snp	missense_variant	c.107G>T	p.Cys36Phe	rs41302049	-	True	-
29, 10	chr6	42975913	CAAGA	C	PPP2R5D	del	upstream_gene_variant	n.-103_-100delAAGA	rs60380024	-	True	-	-
P0, 6	chr7	92462405	C	T	CDK6	snp	structural_interaction_variant	c.233G>A	-	-	-	-	-
3, 30	chr8	26223857	C	T	PPP2R2A	snp	synonymous_variant	c.1029C>T	p.Leu343Leu	rs34109536	-	True	-
23, 6	chr9	21968712	C	A	CDKN2A	snp	3_prime_UTR_variant	c.*12G>T	rs34011899	-	True	-	-
27, 12	chr9	21970916	C	T	CDKN2A	snp	missense_variant	c.442G>A	p.Ala148Thr	rs3731249	COSM3774362	True	True
23, 7	chr9	21994411	C	T	CDKN2A	snp	missense_variant	c.43G>A	p.Gly15Arg	rs1346908645	-	True	-
3, 26	chrX	139866477	T	C	CDR1	snp	missense_variant	c.55A>G	p.Ile19Val	rs41299075	COSM3759379	True	-
8, P0	chrX	295129	G	A	PPP2R3B	snp	synonymous_variant	c.1701C>T	p.Cys567Cys	rs140273319	-	True	-
21, 31	chrX	308117	T	A	PPP2R3B	snp	upstream_gene_variant	n.-58A>T	rs3813597	-	True	-	-

Annexe 4. Variants mis en évidence par NGS présents uniquement sur les récidives

Patients	Chr	Position	Ref	Alt	Gene	Type	Annotation	HGVS.c	HGVS.p	dbSNP	COSMIC	gnomad	clinvar
25, R1, P3, 13	chr10	62551889	AA	AT	CDK1	snp	downstream_gene_variant	c.*16A>T		rs2456778	-	True	-
24, P3, R5	chr10	129903178	T	A	MKI67	snp	missense_variant	c.6926A>T	p.Lys2309Met	-	-	-	-
5, R5, 11	chr19	30308385	T	C	CCNE1	snp	synonymous_variant	c.399T>C	p.Phe133Phe	rs3218045	-	True	-
33, 24, 11	chr20	32274101	AGGC	A	E2F1	del	5_prime_UTR_variant	c.-34_-32delGCC		rs1463207453	-	True	-
R1, P3, 13	chr4	6537068	A	G	PPP2R2C	snp	5_prime_UTR_variant	c.-22T>C		rs73086920	-	True	-
5, R5	chr6	41903798	C	A	CCND3	snp	stop_gained	c.379G>T	p.Glu127*	rs33966734	COSM5019335	True	-
19, P3	chr1	16271166	G	A	ZBTB17	snp	sequence_feature	c.1070+26C>T		-	-	-	-
25, 19	chr1	45267456	GGGGAGGGAGGGAGGGAG	GGGGAGGGAGGGAG	PLK3	del	upstream_gene_variant	n.-1470_-1467delGGAG		-	-	-	-
P3, 32	chr1	45267465	G	A	PLK3	snp	upstream_gene_variant	n.-1475G>A		rs747813654	-	True	-
P3, R5	chr1	45268986	C	T	PLK3	snp	missense_variant	c.995C>T	p.Pro332Leu	-	-	-	-
16, 19	chr10	129901066	C	A	MKI67	snp	missense_variant	c.9038G>T	p.Arg3013Leu	rs114687140	-	True	-
16, 19	chr10	129902368	T	A	MKI67	snp	missense_variant	c.7736A>T	p.Asp2579Val	rs79661992	COSM328282	True	-
P3, R5	chr10	129903255	C	T	MKI67	snp	missense_variant	c.6849G>A	p.Met2283Ile	rs1292752348	-	True	-
R1, P3	chr10	129906017	C	G	MKI67	snp	missense_variant	c.4087G>C	p.Val1363Leu	rs150019738	-	True	-
P3, 5	chr10	129906449	G	A	MKI67	snp	stop_gained	c.3655C>T	p.Gln1219*	-	-	-	-
R1, P3	chr10	129910132	T	A	MKI67	snp	downstream_gene_variant	n.*3642A>T		rs74159190	-	True	-
5, R5	chr10	129914162	G	C	MKI67	snp	missense_variant	c.510C>G	p.Asp170Glu	rs143381225	-	True	-
P3, R5	chr10	133769312	G	A	PPP2R2D	snp	missense_variant	c.1114G>A	p.Val372Met	-	-	-	-
P3, R5	chr11	111630678	G	A	PPP2R1B	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.540-3C>T		rs555202142	-	True	-
P3, R5	chr11	19258986	G	A	E2F8	snp	missense_variant	c.326C>T	p.Ser109Phe	rs752795277	-	True	-
P3, R5	chr11	64693151	C	T	PPP2R5B	snp	5_prime_UTR_variant	c.-56C>T		-	-	-	-
P3, 13	chr11	69458702	G	A	CCND1	snp	missense_variant	c.517G>A	p.Glu173Lys	-	-	-	-
P3, R5	chr12	77426840	C	T	E2F7	snp	missense_variant	c.1372G>A	p.Asp458Asn	-	-	-	-
R1, P3	chr13	114277613	G	C	TFDP1	snp	intron_variant	c.186+12G>C		rs372474062	-	True	-
R1, P3	chr13	114291057	T	TG	TFDP1	ins	upstream_gene_variant	n.-409_-408insG		rs140823881	-	True	-
P3, R5	chr13	48947503	C	T	RB1	snp	intron_variant	c.1128-38C>T		rs376410236	-	True	-
P3, R5	chr13	49030412	G	A	RB1	snp	synonymous_variant	c.1887G>A	p.Glu629Glu	-	-	-	-
P3, R5	chr13	49039402	C	T	RB1	snp	missense_variant	c.2387C>T	p.Pro796Leu	rs1158706854	-	True	-
P3, R5	chr14	102349751	G	A	PPP2R5C	snp	upstream_gene_variant	c.-123G>A		-	-	-	-
5, R5	chr14	102375852	C	G	PPP2R5C	snp	sequence_feature	c.1245-74C>G		-	-	-	-
P3, R5	chr14	31374809	C	T	STRN3	snp	intron_variant	c.1889-45G>A		-	-	-	-
P3, R5	chr14	31381368	G	A	STRN3	snp	synonymous_variant	c.1395C>T	p.Ala465Ala	-	-	-	-
P3, R5	chr14	61263119	C	T	MNAT1	snp	intron_variant	c.242+32C>T		-	-	-	-
P3, 5	chr14	63848809	G	A	PPP2R5E	snp	synonymous_variant	c.1269C>T	p.Asp423Asp	rs776642897	-	True	-
R1, P3	chr14	63863220	C	T	PPP2R5E	snp	intron_variant	c.680+84G>A		rs1156805648	-	-	-
P3, R5	chr16	2489340	G	A	CCNF	snp	upstream_gene_variant	c.-4364G>A		rs1295166974	-	-	-
P3, R5	chr16	53504205	G	A	RBL2	snp	downstream_gene_variant	c.*214G>A		-	-	-	-
R1, P3	chr17	1264321	G	A	YWHAE	snp	downstream_gene_variant	n.*644C>T		-	-	-	-
P3, R5	chr17	7576784	G	A	TP53	snp	downstream_gene_variant	c.*69C>T		-	-	-	-
P3, R5	chr17	7578154	G	A	TP53	snp	upstream_gene_variant	c.-1251C>T		-	-	-	-
16, 13	chr17	7578210	T	C	TP53	snp	structural_interaction_variant	c.639A>G		rs1800372	COSM249885	-	True
5, R5	chr17	7579619	G	T	TP53	snp	upstream_gene_variant	n.-808C>A		rs17883323	-	True	True
R1, P3	chr19	1531869	C	T	PLK5	snp	missense_variant	c.701C>T	p.Ala234Val	rs118008362	COSM4593309	True	-
R1, P3	chr19	1533854	G	A	PLK5	snp	downstream_gene_variant	n.*4807G>A		-	-	-	-

R1, P3	chr19	1534999	C	T	PLK5	snp	intron_variant	c.826-65C>T	-	-	-	-
P3, 32	chr19	30303378	G	A	CCNE1	snp	upstream_gene_variant	c.-240G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr19	30312925	C	T	CCNE1	snp	missense_variant	c.728C>T	p.Pro243Leu	-	-	-
P3, R5	chr19	52729096	G	A	PPP2R1A	snp	3_prime_UTR_variant	c.*24G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr2	37082490	C	T	STRN	snp	missense_variant	c.1843G>A	p.Gly615Arg	-	-	-
R1, P3	chr2	37088475	T	G	STRN	snp	intron_variant	c.1548-79A>C	-	-	-	-
P3, R5	chr2	9725343	C	T	YWHAQ	snp	3_prime_UTR_variant	c.*72G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr2	9725403	C	T	YWHAQ	snp	3_prime_UTR_variant	c.*12G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr20	32265984	C	T	NECAB3	snp	upstream_gene_variant	c.-3826G>A	-	-	-	-
P3, 32	chr20	32267695	C	T	E2F1	snp	synonymous_variant	c.438G>A	p.Ser146Ser	rs200021458	-	True
R1, P3	chr20	35632297	TAG	T	RBL1	del	intron_variant	c.2872-30_2872-29delCT	-	rs150400342	-	True
R1, P3	chr20	35632297	TAG	TAT	RBL1	snp	intron_variant	c.2872-30C>A	-	rs763038524	-	True
P3, R5	chr20	35683942	G	A	RBL1	snp	downstream_gene_variant	c.*621C>T	-	-	-	-
5, R5	chr20	35689445	G	A	RBL1	snp	intron_variant	c.1250+61C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr20	35695448	G	A	RBL1	snp	synonymous_variant	c.633C>T	p.Ala211Ala	-	-	-
P3, R5	chr3	135721456	C	T	PPP2R3A	snp	synonymous_variant	c.1116C>T	p.Asn372Asn	-	-	-
P3, R5	chr3	135721948	C	T	PPP2R3A	snp	synonymous_variant	c.1608C>T	p.Asn536Asn	-	-	-
P3, R5	chr3	141678764	G	A	TFDP2	snp	downstream_gene_variant	c.*3898C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr3	48225296	G	A	CDC25A	snp	synonymous_variant	c.321C>T	p.Ser107Ser	-	-	-
P3, R5	chr4	128819589	C	T	PLK4	snp	splice_region_variant&intron_variant	c.2811-5C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr4	6325247	C	T	PPP2R2C	snp	missense_variant	c.1126G>A	p.Glu376Lys	-	-	-
R1, 24	chr4	6415618	GC	AC	PPP2R2C	snp	intron_variant	c.50-32797C>T	-	rs4689000	-	True
R1, P3	chr5	137625228	C	G	CDC25C	snp	missense_variant	c.889G>C	p.Gly297Arg	rs11567997	-	True
P3, R5	chr5	137665328	G	A	CDC25C	snp	missense_variant	c.203C>T	p.Pro68Leu	-	-	-
13, 32	chr5	146258323	A	T	PPP2R2B	snp	5_prime_UTR_variant	c.-294T>A	-	-	-	-
24, R5	chr5	57750349	GC	GG	PLK2	snp	3_prime_UTR_variant	c.*60G>C	-	-	-	-
R1, P3	chr5	57752965	G	A	PLK2	snp	upstream_gene_variant	n.-2022C>T	-	rs2291634	-	True
P3, R5	chr5	86695200	C	T	CCNH	snp	intron_variant	c.872+11G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr5	86707056	C	T	CCNH	snp	start_lost	c.3G>A	p.Met1?	rs1394377885	-	-
P3, R5	chr6	20481406	C	T	E2F3	snp	intron_variant	c.506-31C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr6	36653453	C	T	CDKN1A	snp	downstream_gene_variant	n.*1165C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr6	42974636	G	A	PPP2R5D	snp	upstream_gene_variant	n.-114G>A	-	-	-	-
P3, R5	chr6	42976497	C	T	PPP2R5D	snp	upstream_gene_variant	c.-355C>T	-	-	-	-
P3, R5	chr8	26212111	C	T	PPP2R2A	snp	missense_variant	c.338C>T	p.Pro113Leu	-	-	-
P3, R5	chr8	86114460	GA	AA	E2F5	snp	missense_variant	c.313G>A	p.Glu105Lys	-	-	-
R1, P3	chr8	95906486	G	A	CCNE2	snp	upstream_gene_variant	c.-3802C>T	-	rs28399555	-	True
P3, 5	chr9	131909794	C	T	PPP2R4	snp	3_prime_UTR_variant	c.*51C>T	-	-	-	-
P3, 14	chr9	21971016	G	A	CDKN2A	snp	missense_variant	c.508C>T	p.Arg170Cys	rs878853648	COSM4993334	True
P3, R5	chr9	22008907	C	T	CDKN2B	snp	missense_variant	c.46G>A	p.Glu16Lys	rs1263390814	-	True
R1, P3	chrX	295079	CGGCGGCGTTCTCGCG	C	PPP2R3B	del	3_prime_UTR_variant	c.*8_*22delCGCGAGAACGCCCGCC	-	rs1133534	-	True
R1, P3	chrX	306214	G	C	PPP2R3B	snp	upstream_gene_variant	n.-3768C>G	-	rs117050855	-	True
R1, P3	chrX	306267	C	T	PPP2R3B	snp	synonymous_variant	c.1020G>A	p.Ala340Ala	rs73613875	-	True
P3, R5	chrX	308110	G	A	PPP2R3B	snp	upstream_gene_variant	n.-51C>T	-	-	-	-
R1, P3	chrX	308132	C	T	PPP2R3B	snp	upstream_gene_variant	n.-73G>A	-	-	-	-



Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Analyse des anomalies chromosomiques et des gènes du cycle cellulaire sur une série de 32 chordomes

Introduction : Le chordome est une tumeur rare affectant principalement le clivus et le sacrum avec un taux de récurrence important. Une élévation des index mitotique et Ki67 sont des facteurs péjoratifs et traduisent une activation du cycle mitotique. Dans une série de chordomes, nous avons recherché des anomalies chromosomiques et des altérations génétiques avec un panel de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Ces résultats ont été corrélés aux données générales (sexe, localisation) et histopathologiques.

Matériel et méthodes : 32 chordomes ont été analysés par Hybridation Génomique Comparative array (aCGH) et par Next Generation Sequencing (NGS) avec un panel de 84 gènes du cycle cellulaire.

Résultats : 28 tumeurs étaient localisées au niveau du clivus et 4 au niveau du sacrum. La moyenne d'âge des patients était de $51,75 \pm 14,57$ ans [20–74] avec 21 hommes (59 %). Dans 22 cas (68,75 %), il s'agissait de tumeurs primitives. L'analyse par aCGH a montré des délétions concernant les chromosomes 1p, 3, 4, 9, 10, 13q, 14q, 15q, 18, 19 et 22q. Les gains, moins fréquents, portaient sur les chromosomes 1q, 5, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 20 et 21q. Nous avons retrouvé une association significative entre le statut tumoral et la délétion des *loci* 9p24 ($p=0,023$), 9q21 ($p=0,045$), 9q31 ($p=0,031$), 9q33 ($p=0,025$) mais aussi entre la localisation au niveau du clivus et la duplication 7q31 ($p=0,031$). Nous avons également retrouvé une association significative entre les atypies nucléaires de grade 2-3 et la délétion du *locus* 9p21 ($p=0,039$), entre le type histologique classique et chondroïde et la duplication du *locus* 1q23 ($p=0,036$) et entre l'index Ki67 > 5 % et la duplication 1q41 ($p=0,037$). Le sexe masculin était significativement associé avec une duplication 8p23.2 ($p=0,043$). L'analyse NGS a mis en évidence des variants *CDKN1A* c.*20C>T, *PPP2R3B* c.457G>A et *PPP2R3B* n.-84G>A non rapportés dans les chordomes. Leur présence était également liée aux types classique et chondroïde ($p=0,01$). Une association significative a été retrouvée entre la présence du variant *CDKN2B* n.-3C>A et le sexe.

Conclusion : Les analyses chromosomique et moléculaire pourraient être utiles afin d'établir une classification histomoléculaire. L'intérêt pronostique de nos résultats reste à être évalué.

Mots-clés : chordome, Next Generation Sequencing, Hybridation Génomique Comparative array

Analysis of chromosomal abnormalities and cell cycle genes on a serie of 32 chordomas

Introduction: Chordoma is a rare tumor affecting mainly clivus and sacrum with a high recurrence rate. Elevation of mitotic index and Ki67 are negative factors reflecting activation of mitotic cycle. In a serie of chordomas, we searched for chromosomal abnormalities and genetic alterations with a panel of genes involved in cell cycle regulation. These results were correlated with histopathological and general data (sex, location).

Methods: 32 chordomas were analyzed by Comparative Genomic Hybridization array (aCGH) and by Next Generation Sequencing (NGS) using a panel of 84 cell cycle genes.

Results: 28 tumors were located on clivus and 4 on sacrum. The mean age of patients was $51,75 \pm 14,57$ years [20–74] with 21 men (59%). In 22 cases (68,75 %), these were primary tumors. Analysis by aCGH showed deletion concerning chromosomes 1p, 3, 4, 9, 10, 13q, 14q, 15q, 18, 19 and 22q. Gains, less frequent, involved chromosomes 1q, 5, 7, 8, 12, 13, 17, 19, 20 and 21q. We found a significant association between tumor status and deletion of 9p24 ($p=0,023$), 9q21 ($p=0,045$), 9q31 ($p=0,031$), 9q33 ($p=0,025$) and also between clivus location and duplication of 7q31 ($p=0,031$). We also found a significant association between type 2-3 nuclear atypia and deletion of 9p21 ($p=0,039$), between classical and chondroid histological type and duplication of 1q23 ($p=0,036$) and between the Ki67 index >5 % and duplication 1q41 ($p=0,037$). A significant association between male sex and duplication of 8p23.2 ($p=0,043$) was also shown. The NGS analysis revealed *CDKN1A* c.*20C>T, *PPP2R3B* c.457G>A and *PPP2R3B* n.-84G>A variants not reported in chordomas. Their presence was significantly related to classical and chondroid histological types ($p= 0,01$). A statistically significant association was found between the presence of variant *CDKN2B* n. -3C>A and sex.

Conclusion: Chromosomal and molecular analysis could allow us to establish a histomolecular classification. Prognostic value of these results remains to be assessed.

Keywords : chordoma, Next Generation Sequencing, Comparative Genomic Hybridization array

