HAL
open science

Déterminisme génétique du cancer : étude des gènes de la voie du PDGFB dans le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand

Vincent Huin

To cite this version:

Vincent Huin. Déterminisme génétique du cancer : étude des gènes de la voie du PDGFB dans le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand. Médecine humaine et pathologie. 2012. dumas-00745804

HAL Id: dumas-00745804

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00745804

Submitted on 26 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2012 THESE N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Vincent HUIN

NE LE 13 NOVEMBRE 1982, A SECLIN

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 25 SEPTEMBRE 2012

DETERMINISME GENETIQUE DU CANCER : ETUDE DES GENES DE LA VOIE DU PDGFB DANS LE DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND

PRESIDENT DU JURY : Pr. Thierry FREBOURG

MEMBRES DU JURY : Pr. Jean-Christophe SABOURIN

Pr. Marc VASSE

Pr. Bernard SABLONNIERE

Dr. Julie TINAT

UNIVERSITE DE ROUEN

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2012 THESE N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Vincent HUIN

NE LE 13 NOVEMBRE 1982, A SECLIN

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 25 SEPTEMBRE 2012

DETERMINISME GENETIQUE DU CANCER : ETUDE DES GENES DE LA VOIE DU PDGFB DANS LE DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND

PRESIDENT DU JURY : Pr. Thierry FREBOURG

MEMBRES DU JURY : Pr. Jean-Christophe SABOURIN

Pr. Marc VASSE

Pr. Bernard SABLONNIERE

Dr. Julie TINAT

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 - 2012

U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Bernard PROUST

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE – Ph. LAURET – H. PIGUET – C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **MM. MP. AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO – J. BORDE – Ph. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – P. DESHAYES – C. FESSARD – J.P. FILLASTRE – P. FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J.M. JOUANY – R. LAUMONIER – Ph. LAURET – M. LE FUR – J.P. LEMERCIER – J.P. LEMOINE – Mle H. MAGARD – MM. B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – Mme A.M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – Mme D. SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF – J. TESTART – J.M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L.M. WOLF**

I - MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
M. Bruno **BACHY**	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques **BENICHOU**	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric **BERCOFF**	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy **BONMARCHAND**	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
M. Jean-François **CAILLARD**	HCN	Médecine et santé au Travail

M. François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe **CHASSAGNE**	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain **CRIBIER** *(Surnombre)*	HCN	Cardiologie
M. Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
M. Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN**	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe **DENIS** *(Surnombre)*	HCN	Physiologie
M. Jean **DOUCET**	HB	Thérapeutique/Médecine - Interne - Gériatrie
M. Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
M. Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato - Gastro - Entérologie
M. Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mle Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
M. Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
M. Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel **GODIN**	HB	Néphrologie
M. Philippe **GRISE**	HCN	Urologie
M. Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
M. Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
M. Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc **KUHN**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain **LAVOINNE**	UFR	Biochimie et biologie moléculaire

M. Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier **LE LOET**	HB	Rhumatologie
M. Eric **LEREBOURS**	HCN	Physiologie
M. Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
M. Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric **MALLET** *(Surnombre)*	HCN	Pédiatrie
M. Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mle Isabelle **MARIE**	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul **MARIE**	HCN	ORL
M. Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
M. Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato - Gastro - Entérologie
M. Francis **MICHOT**	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno **MIHOUT**	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves **MILLIEZ**	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
M. Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
M. Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
M. Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc **PERON**	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
M. François **PROUST**	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe **RICHARD** *(Mise en dispo)*	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie
M. Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato - Gastro

M. Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Thérapeutique
Mle Florence **THIBAUT**	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
M. Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
M. Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
M. François **TRON** *(Surnombre)*	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre **VERA**	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
M. Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Jeremy **BELLIEN**	HCN	Pharmacologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
M. Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
M. Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mme Catherine **HAAS-HUBSCHER**	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
M. Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie **MARECHAL-GUYANT**	HCN	Neurologie

M. Jean-François **MENARD**	HCN	Biophysique
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
M. Francis **ROUSSEL**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie
M. Eric **VERIN**	HCN	Physiologie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
M. Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mme Michèle **GUIGOT**	UFR	Sciences humaines - Techniques d’expression

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
M. Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
M. Jean **COSTENTIN** (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
M. Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel **GUERBET**	Toxicologie
M. Olivier **LAFONT**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX**	Physiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
M. Marc **VASSE** (PU-PH)	Hématologie
M. Jean-Marie **VAUGEOIS** *(Délégation CNRS)*	Pharmacologie
M. Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mle Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique **BOUCHER**	Pharmacologie
M. Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
M. Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
M. Jean **CHASTANG**	Biomathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mle Cécile **CORBIERE**	Biochimie
M. Eric **DITTMAR**	Biophysique
Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mle Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mme Roseline **DUCLOS**	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie

M. François **ESTOUR**	Chimie Organique
M. Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mle Marie-Laure **GROULT**	Botanique
M. Hervé **HUE**	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong **LU**	Biologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
M. Paul **MULDER**	Sciences du médicament
M. Mohamed **SKIBA**	Pharmacie Galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie Galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
M. Rémi **VARIN** (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. Jean-Pierre **GOULLE**	Toxicologie

MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE

Mme Sandrine **PANCHOU**	Pharmacie Officinale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Anne-Marie **ANZELLOTTI**	Anglais

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Bérénice **COQUEREL**	Chimie Analytique
M. Johann **PELTIER**	Microbiologie

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle **HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME** **CB - Centre HENRI BECQUEREL**

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray **CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation**

III – **MEDECINE GENERALE**

PROFESSEURS

M. Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre **FAINSILBER** UFR Médecine générale

M. Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M. Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
M. Roland **CAPRON**	Biophysique
M. Jean **CHASTANG**	Mathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
M. Jean **COSTENTIN**	Pharmacodynamie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
M. Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
M. Michel **GUERBET**	Toxicologie
M. Olivier **LAFONT**	Chimie organique
M. Jean-Louis **PONS**	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
M. Mohamed **SKIBA**	Pharmacie Galénique
M. Marc **VASSE**	Hématologie
M. Philippe **VERITE**	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil ADRIOUCH	Biochimie et biologie moléculaire	(Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE	Biochimie et biologie moléculaire	(Unité Inserm 614)
M. Antoine OUVRARD-PASCAUD	Physiologie	(Unité Inserm 644)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Mario TOSI	Biochimie et biologie moléculaire	(Unité Inserm 614)
M. Serguei FETISSOV	Physiologie (Groupe ADEN)	
Mme Su RUAN		

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Thierry Frébourg qui m'a permis de réaliser ce travail et me fait l'honneur de présider mon jury.

Je remercie le professeur Jean-Christophe Sabourin qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie le professeur Marc Vasse qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse et pour les conseils qu'il m'a prodigués durant mon internat à Rouen.

Je remercie le professeur Bernard Sablonnière qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Je le remercie chaleureusement pour ses enseignements, sa patience et sa pédagogie. Qu’il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie le docteur Julie Tinat qui me fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, pour son encadrement et pour sa gentillesse.

J’exprime toute ma reconnaissance à mes maîtres et enseignants, pour leurs efforts afin de faire de moi un bon médecin.

Je remercie particulièrement Pascale Saugier-Veber et Stéphanie Baert-Desurmont pour m’avoir appris la Génétique Moléculaire.

Je remercie Pascal Chambon et Géraldine Joly-Hélas pour leur accueil dans le service de Cytogénétique.

Je remercie également Nathalie Le Meur et Jean-Baptiste Latouche pour leur incroyable gentillesse, pour m’avoir écouté et conseillé.

A toutes les personnes du laboratoire de Génétique Moléculaire : Nathalie, Séverine, Virginie, Jackie, Steeve, David, Sandrine, Gwendoline, Stéphanie, Emilie, Sonia et Fanny.
Je les remercie pour tout ce que j’ai pu apprendre à leur contact et pour tous ces bons moments que j’ai vécus pendant ces dix-huit mois de stage.

Aux personnes que j’ai côtoyées au cours de mes études médicales dans les différents services, dans les différentes salles de cours.

A mes plus chers amis, Stéphane et Yann, que de chemin parcouru depuis nos premières années de fac.

A Armelle, pour toutes ces soirées télé si instructives, mais néanmoins très amusantes.

A Nicolas, pour tous ces moments passés à refaire le monde devant un verre de vin.

A Emilie, pour sa gentillesse et sa bonne humeur communicative.

A mes amis d'hier et d'aujourd'hui, de Lille, de Rouen et d'ailleurs, à tous mes amis, je vous remercie tous pour votre soutien.

A mes parents, pour leur amour et leur soutien sans faille et depuis toujours. Je sais que je leur dois ma réussite.

A mon frère et à ma sœur, pour leur amour et leur soutien, je les remercie tendrement.

A ma grand-mère, pour m'avoir toujours soutenu et entouré d'une affection constante

A mon grand-père, j'aurais aimé qu'il soit là pour me voir passer cette thèse.

A toute ma famille, à qui j'exprime tout mon amour,

Merci à toutes les personnes (amis, connaissances, enseignants, collègues) qui de près ou de loin ont contribué à ce que je puisse aujourd'hui présenter cette thèse.

A Lucie,

Mon ange, mon amour,

Merci pour ton soutien, ton aide et pour tout le courage que tu me donnes.

Chaque jour que je passe à tes côtés est le plus beau jour de ma vie.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

TABLEAUX ET FIGURES **4**

LISTE DES ABREVIATIONS **6**

INTRODUCTION **7**

I. GENETIQUE MENDELIENNE DES CANCERS 9

I.1 BASES MOLECULAIRES DES CANCERS 9

I 1 1. LES CANCERS : DES MALADIES GENETIQUES SOMATIQUES 9

I 1 2. PROTO-ONCOGENES, GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR ET GENES DE REPARATION 10

I 2. FORMES HEREDITAIRES DE CANCERS 11

I 2 1. GENETIQUE MENDELIENNE DES CANCERS 11

I 2 2. EXEMPLE DU SYNDROME DE LI-FAUMENI 13

II. DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND 16

II 1. PRESENTATION DU DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND 16

II 1 1. EPIDEMIOLOGIE 16

II 1 2. DIAGNOSTIC CLINIQUE 16

II 1 3. DIAGNOSTIC ANATOMOPATHOLOGIQUE 18

II 1 4. EVOLUTION NATURELLE 23

II 1 5. PRISE EN CHARGE 23

II 2. BASES GENETIQUES DU DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND 24

II 2 1. ANOMALIES GENETIQUES RECURRENTES 24

II 2 2. PRÉSENTATION DU PDGF 26

II 2 3. PDGFB 26
II 2 4. COL1A1 28
II 2 5. EFFET TRANSFORMANT DU GENE DE FUSION *COL1A1/PDGFB* 28
II 2 6. RECEPTEURS DE LA VOIE DU PDGFB 29

MATERIEL ET METHODES 31
I. PATIENTS ETUDIES 31
II. EXTRACTION DE L'ADN 34
III. SEQUENCAGE DU GENE *PDGFRB* 34
III 1. MODELISATION DES AMORCES DE PCR-SEQUENÇAGE 34
III 2. AMPLIFICATION DU GENE *PDGFRB* 36
III 3. REACTION DE SEQUENCE 36
III 4. LECTURE DES SEQUENCES 36
III 4.1. EXIGENCE DE QUALITE DES SEQUENCES AVANT PASSAGE SUR VARIANT REPORTER™ 37
III 4.2. ANALYSE DES SEQUENCES PAR LE LOGICIEL VARIANT REPORTER™ 37
III 5. ANALYSE DES VARIATIONS 38
IV. QMPSF DES GENES *PDGFRB* ET *PDGFB* 39
IV 1. PRINCIPE DE LA QMPSF 39
IV 2. MODELISATION DES AMORCES DE QMPSF 40
IV 2.1. TRAVAIL BIOINFORMATIQUE PREALABLE A LA MODELISATION DES AMORCES 40
IV 2.2. MODELISATION DES AMORCES DE PCR MULTIPLEX 41
IV 2.3. AMPLIMERES TEMOINS 42
IV 3. AMPLIFICATION 44
V 4. ANALYSE DES RESULTATS 44

RESULTATS 47
I. RESULTAT DU SEQUENCAGE DU GENE *PDGFRB* 47

I 1. QUALITE DES SEQUENCES 47
I 2. RECHERCHE DE VARIATIONS GENOMIQUES 47
II. RESULTAT DE LA QMPSF DES GENES *PDGFRB* ET *PDGFB*..... 49
II 1. CHOIX DES REGIONS GENOMIQUES D'INTERET 49
II 2. QUALITE DE LA QMPSF 51
II 3. RECHERCHE DE REARRANGEMENTS DE GRANDE TAILLE 53

DISCUSSION..... 56

BIBLIOGRAPHIE..... 63

TABLEAUX ET FIGURES

Page

Tableau 1. Critères de Chompret révisés de 2009 pour le dépistage de mutation germinale du gène *TP53* **15**

Tableau 2. Patients étudiés **32**

Tableau 3. Antécédents familiaux de cancer des huit patients étudiés **33**

Tableau 4. Séquence et localisation des amorces pour le séquençage du gène *PDGFRB* **35**

Tableau 5. Séquence et localisation des amorces utilisées pour la QMPSF des gènes *PDGFRB* et *PDGFB* **43**

Tableau 6. Liste des variations nucléotidique analysées du gène *PDGFRB* **48**

Tableau 7. Rapports d'aires sous la courbe des amplimères de la QMPSF **54**

Figure 1. Illustration du *two-hit model* de Knudson et Comings **12**

Figure 2. Lésions cutanées observées dans le DFS **17**

Figure 3. Examen anatomopathologique de DFS **19-20**

Figure 4. Analyse par FISH sur noyaux interphasiques de DFS **22**

Figure 5. Représentation schématique de la formation du gène de fusion *COL1A1/PDGFB* **25**

Figure 6. Profil de la QMPSF des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* **50**

Figure 7. Régions d'intérêt ciblées par la QMPSF **52**

Figure 8. Histogramme représentant les rapports moyens de la QMPSF du patient 1 **55**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	**Acide Désoxyribonucléotidique**
ADNc	**ADN complémentaire**
ARN	**Acide Ribonucléotidique**
ATP	**Adénosine Tri-Phosphate**
BLAST	**Basic Local Alignment Search Tool**
BRCA1	**Breast Cancer 1 gene**
COL1A1	**Chaîne alpha 1 du collagène de type I**
ddNTP(s)	**Didésoxyribonucléotide Tri-Phospate**
dNTP(s)	**Désoxyribonucléotide Tri-Phosphate**
DFS	**Dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand**
DMSO	**Diméthylsulfoxyde**
EDTA	**Ethylène Diamine Téra-Acétate**
FISH	**Fluorescent In-Situ Hybridation**
GIST	**Tumeur stromale gastro-intestinale**
kb	**Kilobase**
kDa	**Kilodalton**
LFS	**Syndrome de Li-Fraumeni**
MAF	**Minor Allele Frequency**
MLPA	**Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification**
MMR	**Mismatch Repair**
pb	**Paire de base**
PCR	**Polymerase Chain Reaction**
PDGFB	**Platelet Derived Growth Factor B**
PDGFBR	**Platelet derived Growth Factor *β* Receptor**
QMPSF	**Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments**
SNP	**Single Nucleotid Polymorphism**
Tm	**Melting Temperature**
TP53	**Tumor protein 53**
TRL%	**Trimmed Read Length %**
UTR	**UnTranslated Region**
VSI	**Variation de signification inconnue**

INTRODUCTION

Le développement des différentes techniques de biologie moléculaire a permis l'identification de la plupart des gènes impliqués dans les grands syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers. Les principaux gènes responsables de cancers héréditaires et répondant à un déterminisme Mendélien sont désormais accessibles à un diagnostic moléculaire et à une prise en charge médicale. Cependant, de nombreuses agrégations familiales de cancers restent inexpliquées à ce jour.

Le syndrome de Li-Fraumeni constitue un exemple de ces syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers. Il est lié à la mutation constitutionnelle du gène *TP53* et prédispose à de nombreux types de cancers, notamment à certains sarcomes des tissus mous. Dans le cadre du diagnostic moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni pour lequel le laboratoire de Génétique moléculaire de Rouen est centre de référence, nous disposons d'un recrutement national exceptionnel de familles présentant une agrégation de cancers rares. Nous avons ainsi noté la survenue dans certaines familles de plusieurs cas de dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand ou son agrégation avec de multiples cas de cancers dans ces familles.

Le DFS est une tumeur cutanée de bas grade de malignité appartenant à la classe des sarcomes des tissus mous et il n'a jamais été retrouvé associé dans le laboratoire à une mutation constitutionnelle du gène *TP53*. Le DFS se caractérise par des anomalies génétiques récurrentes à type de translocation chromosomique t(17;22) ou d'anneau chromosomique surnuméraire aboutissant chacune au même gène de fusion *COL1A1/PDGFB*. Ces anomalies sont retrouvées dans plus de 95% des cas, cependant elles n'expliquent pas l'ensemble des DFS et ne peuvent expliquer la survenue dans une même famille de plusieurs cas de DFS chez différents individus ni l'existence de nombreux cancers associés. Cela nous a amené à suspecter l'existence d'une mutation d'un unique gène qui rendrait compte d'une prédisposition héréditaire aux cancers observés dans ces familles. Suivant cette hypothèse et en raison de leurs implications démontrées dans le développement des DFS sporadiques, nous avons décidé d'étudier deux gènes candidats : *PDGFB* et *PDGFRB.*

Cette thèse a eu pour objet la recherche de mutations constitutionnelles des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* dans des familles affectées par un ou plusieurs Dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand (DFS) et/ou de multiples cancers. Nous avons réalisé cette étude au cours d'une année de stage d'interne de Biologie Médicale dans le laboratoire de Génétique Moléculaire du CHU de Rouen, dirigé par le Professeur T.Frébourg.

La première partie sera consacrée à la revue du déterminisme génétique aux cancers avec comme exemple, le syndrome de Li-Fraumeni. Puis nous présenterons le DFS et insisterons sur les bases génétiques de ce cancer nous ayant amenées à étudier ces deux gènes. Dans la seconde partie, nous présenterons les patients que nous avons étudiés et les méthodes que nous avons personnellement utilisées ou mises au point pour l'étude de ces deux gènes. Nous présenterons également dans ce chapitre les outils bioinformatiques pour l'analyse des résultats et les critères de qualités que nous nous sommes imposés. Ces critères correspondent aux exigences nécessaires au dépistage de mutations dans des gènes à haut risque génétique de cancer et diagnostiqués dans le laboratoire de Génétique Moléculaire du CHU de Rouen. Les troisièmes et quatrièmes parties seront respectivement consacrées à la présentation et à la discussion des résultats.

I. GENETIQUE MENDELIENNE DES CANCERS

I.1 Bases moléculaires des cancers

I 1 1. Les cancers : des maladies génétiques somatiques

Les cancers sont des proliférations clonales pathologiques causées par de multiples événements moléculaires (altérations génétiques et épigénétiques) d'une cellule de l'organisme. Le processus de transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale consiste en une accumulation successive et séquentielle de mutations somatiques et permet de définir la majorité des cancers comme étant des maladies génétiques acquises. Il est ainsi possible de dénombrer ainsi au sein d'une cellule tumorale parfois plus d'une centaine de mutations [1-3]. De plus, il existe dans une même tumeur une hétérogénéité dans le nombre et le type de mutations somatiques retrouvées [4]. Parmi toutes les mutations retrouvées dans une cellule tumorale, se distinguent deux grands types de mutations somatiques. Les *driver mutations* qui interviennent dans les différents processus de transformation maligne, de progression tumorale et de survie de la tumeur. Elles confèrent un avantage de croissance et ont été sélectionnées lors du développement des cellules tumorales. Ce sont également les *driver mutations* qui confèrent aux cellules tumorales leur phénotype particulier défini par un potentiel de prolifération illimité (immortalisation), un échappement à la mort cellulaire programmée, une autosuffisance en signaux de croissance contrastant avec une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'induction de l'angiogénèse, la capacité d'invasion tissulaire et de développer des métastases [5]. Ces mutations sont présentes en petit nombre, généralement moins de quinze et sont les mutations responsables de l'oncogenèse. Toutefois, ces *driver mutations* sont noyées dans la masse des autres mutations somatiques que sont les *passenger mutations*. Ces dernières ont un effet biologique neutre, ne confèrent pas d'avantage de croissance aux cellules tumorales et ne sont que le reflet de l'instabilité génétique de la cellule tumorale. Toute la difficulté de la recherche des gènes impliqués dans l'oncogenèse consiste donc à distinguer les *driver mutations* des *passenger mutations*.

I 1 2. Proto-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur et gènes de réparation

A ce jour, plus de 350 gènes impliqués dans le développement de cancers ont été identifiés [6] et ces gènes de cancer peuvent être schématiquement classés en trois grandes catégories : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation ou *care-takers*.

La catégorie des proto-oncogènes a été la première à être identifiée. Il s'agit de gènes impliqués dans la transduction des différents signaux reçus par la cellule et qui ont pour rôle de réguler positivement la prolifération et le cycle cellulaire. Leur altération dans les cellules tumorales active les proto-oncogènes en oncogènes, les rendant hyperactifs, favorisant ainsi la croissance cellulaire et diminuant la mort cellulaire programmée. Les proto-oncogènes ont été découverts initialement selon trois grandes voies historiques de recherche que sont l'analogie avec des oncogènes viraux, les études de transfection de ces gènes dans des modèles cellulaires comme les cellules NIH3T3, et l'étude des gènes impliqués dans les translocations observées dans les leucémies ou les lymphomes. L'activation des proto-oncogènes en oncogènes peut résulter d'une mutation ponctuelle avec un gain de fonction délétère de la protéine (mutations des gènes *RAS* dans de nombreux cancers), d'une amplification génique (amplification du gène *ERBB2* dans 25% des cancers du sein), de translocations chromosomiques dérégulant l'expression du gène (translocation juxtaposant le proto-oncogène *MYC* avec un gène codant une immunoglobuline) ou créant un gène de fusion codant pour une nouvelle protéine avec une fonction aberrante (translocation récurrente t(9;22)(q34;q11) du chromosome Philadelphie de la leucémie myéloïde chronique, aboutissant à la création d'un gène de fusion entre les gènes *BCR* et *ABL*). Un seul événement moléculaire mutant un seul des deux allèles d'un proto-oncogène est nécessaire à leur activation, ce qui se traduit par un effet dominant des mutations activant les oncogènes.

La seconde catégorie correspond aux gènes suppresseurs de tumeurs qui possèdent des propriétés inverses aux proto-oncogènes puisqu'ils sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et qu'ils favorisent l'apoptose. Ces gènes sont également appelés *gate-keepers* car ils sont responsables de la formation des points de contrôle ou *checkpoint*s entre les différentes phases du cycle cellulaire. Ces *checkpoints* permettent aux cellules en division de prévenir et de réparer les anomalies de l'ADN survenues lors de la mitose ou lorsque ces anomalies sont trop importantes d'orienter la cellule vers l'apoptose.

La troisième catégorie correspond aux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou *care-takers*. Ces gènes ont pour rôle de maintenir l'intégrité de l'ADN et de réparer les anomalies génétiques susceptibles d'activer les proto-oncogènes et d'inactiver les *gate-keepers*.

A l'inverse des proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation sont inactivés dans les cellules tumorales. Cette perte de fonction peut également faire intervenir différents mécanismes. Il peut s'agir de délétions d'une région du chromosome contenant le gène suppresseur de tumeur, de mutations ponctuelles qui altèrent sa fonction, d'une interaction avec un oncogène viral ou encore d'altérations épigénétiques qui vont diminuer l'expression du gène (hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* dans les cancers du colon). De plus, pour que la fonction d'un gène suppresseur soit perdue, il est généralement nécessaire que les deux copies du gène soient inactivées ce qui explique le caractère récessif des anomalies moléculaires des suppresseurs de tumeurs au niveau cellulaire.

Les altérations à la fois des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs sont nécessaires pour la dérégulation de la croissance cellulaire. De plus, l'emballement du cycle cellulaire en l'absence de contrôle est responsable d'une instabilité génétique des cellules qui favorise la progression de la cellule vers le cancer et l'acquisition par la cellule tumorale de nouvelles propriétés comme la néo-angiogénèse, la capacité d'invasion tissulaire ou la résistance à une chimiothérapie.

I 2. Formes héréditaires de cancers

I 2 1. Génétique Mendélienne des cancers

Si l'ensemble des cancers résultent d'une séquence d'anomalies génétiques et épigénétiques, moins de 5% de tous les cancers correspondent à des formes héréditaires de cancers et répondant à un déterminisme Mendélien. Ces cancers héréditaires sont liés à une anomalie constitutionnelle de l'ADN correspondant fréquemment à la mutation d'un gène suppresseur de tumeur ou de réparation de l'ADN, plus rarement d'un oncogène. En effet, chez les individus porteurs à l'état hétérozygote d'une mutation d'un gène suppresseur de tumeur, le premier événement moléculaire conduisant à la transformation maligne est déjà présent dans l'ensemble des cellules de l'organisme (sauf très rares cas de mosaïque). Il suffit alors d'un seul événement moléculaire inactivant le second allèle pour perdre la fonction de la protéine, contre deux événements moléculaires dans une seule et même cellule dans le cas des cancers sporadiques. La présence chez un individu donné d'une mutation constitutionnelle d'un gène suppresseur de tumeur le prédispose donc à développer des tumeurs plus fréquemment et plus précocement que dans la population

générale. Cette prédisposition aux cancers liée à une mutation d'un gène suppresseur de tumeur (premier "événement génétique"), suivie d'une deuxième mutation somatique de l'allèle sain (second "événement génétique") correspond au *two-hit model* émis en 1971 par Knudson [7] (figure 1). Ce modèle dit de Knudson et Comings [8, 9] explique ainsi la survenue chez plus de 90% des porteurs d'une mutation constitutionnelle du gène *RB1* de rétinoblastome, un cancer de l'œil de l'enfant et dont l'incidence dans la population générale est de 1 naissance sur 20000. *RB1* fut ainsi le premier gène suppresseur de tumeur à être caractérisé [10-12].

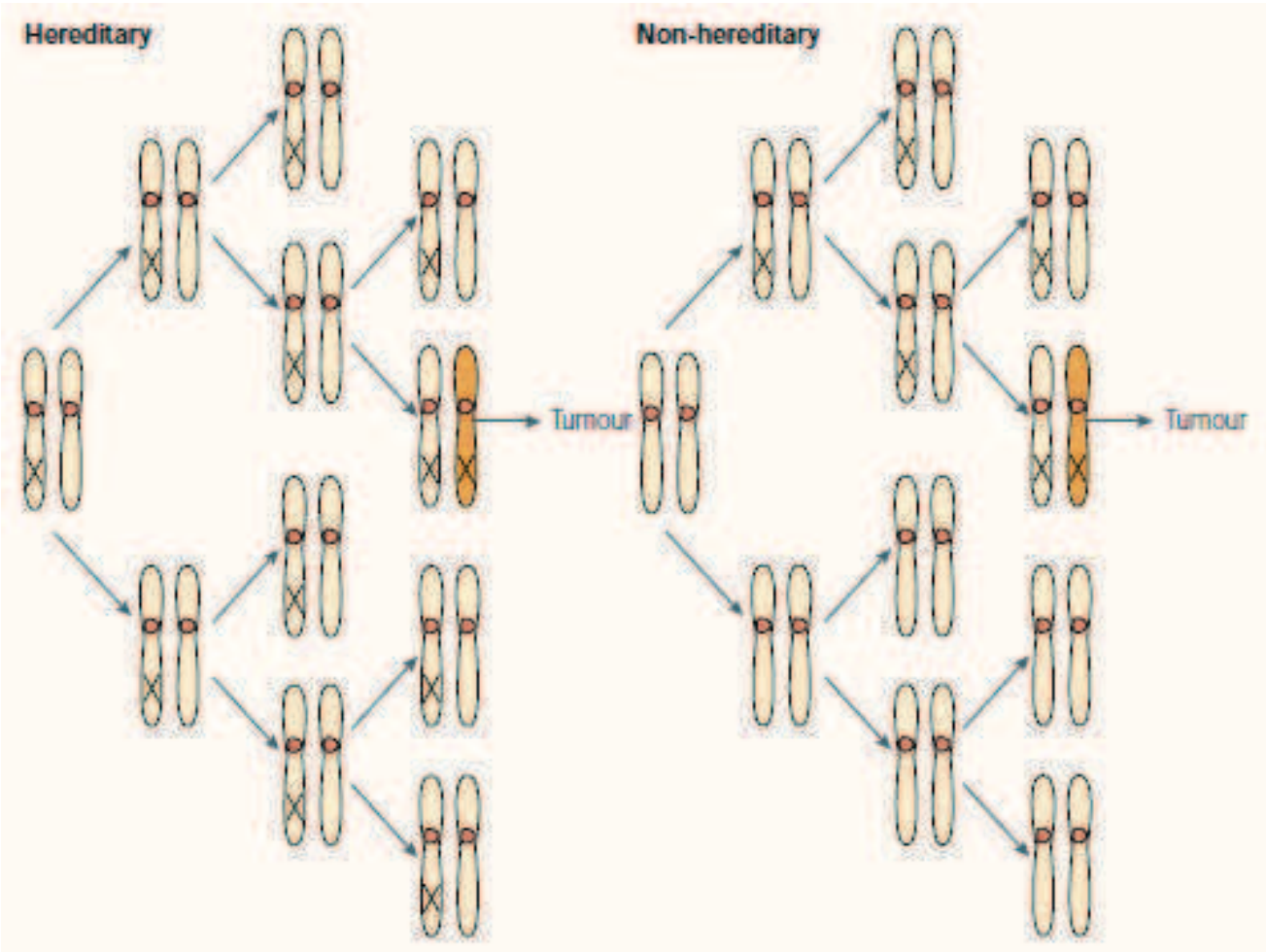


Figure 1. Illustration du *two-hit model* de Knudson et Comings
Image issue de l'article de Knudson, 2001 [13].

Cette première mutation d'un gène suppresseur de tumeur ou de réparation de l'ADN peut être de survenue *de novo*, ce qui signifie que la mutation est apparue chez l'individu sans qu'elle ne soit héritée d'un des deux parents. Cependant, la mutation peut également être héritée d'un des deux parents et est alors présente dans l'ensemble des cellules de l'individu. La transmission à la descendance des ces mutations conduit à des tableaux familiaux avec de nombreux cancers dans la famille définissant ainsi les syndromes de prédisposition héréditaires aux cancers. Les cancers observés dans ces syndromes sont de survenues précoces avec une anticipation des âges de survenue des cancers dans ces familles par rapport à la population générale pour un même type de cancer. De plus, il est parfois possible d'observer de multiples cas de cancers chez un même individu porteur. Les mutations dans ces syndromes de cancer héréditaire se caractérisent également par une pénétrance importante, parfois même complète. Enfin, ces mutations constitutionnelles se transmettent selon un mode qui apparaît sur le plan clinique comme autosomique dominant et qui respecte les lois de Mendel.

Le modèle de Knudson et Comings ne doit toutefois pas être érigé en dogme, car pour les mutations inactivatrices tout dépend de la tolérance biologique de la protéine impactée par les variations quantitatives. Ce modèle, basé sur des données épidémiologiques, doit donc être pondéré à la lumière des connaissances des différents mécanismes de l'oncogenèse. Mais il constitue une étape importante dans la compréhension du déterminisme génétique des cancers et a permis l'identification de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs majeurs comme les gènes *APC* [14, 15] ou *VHL* [16]. Enfin, il reste encore d'actualité pour un grand nombre de syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers de déterminisme Mendélien qui sont actuellement les seuls à faire l'objet d'un réel dépistage et d'une prise en charge médicale. En effet, la présence d'une prédisposition Mendélienne aux cancers implique une prise en charge spécifique des familles, afin de prévenir, de dépister précocement les tumeurs et parfois adapter les thérapeutiques. Enfin, la suspicion sur le plan clinique d'une prédisposition Mendélienne aux cancers doit amener à une consultation d'oncogénétique afin d'affirmer ou non ce diagnostic et si possible afin de documenter la mutation familiale permettant ainsi la réalisation d'un conseil génétique dans cette famille.

I 2 2. Exemple du syndrome de Li-Faumeni

Les principaux syndromes de prédisposition héréditaire aux cancers sont le syndrome de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, lié aux gènes *BRCA1* et

BRCA2 ; la polypose adénomateuse familiale de transmission autosomique dominante liée au gène *APC* ; et le syndrome de Lynch, également nommé syndrome HNPCC pour *Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*, lié à une altération d'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN du système *MMR* ou *MisMatch Repair* (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*). Mais de nombreux autres gènes ont été impliqués dans différents syndromes de prédisposition aux cancers [17].

Nous citerons comme exemple le syndrome de Li-Fraumeni (LFS, MIM #151623), lié à une mutation constitutionnelle du gène *TP53* [18, 19]. Ce syndrome est une affection rare prédisposant à de nombreux types de cancers avec un risque important pour un même individu affecté de développer plusieurs cas de cancers durant la vie. Ces cancers apparaissent dès l'enfance mais peuvent concerner les adultes jusqu'à un âge élevé ce qui rend la prévalence de cette affection difficile à évaluer. Les tumeurs les plus caractéristiques sont les sarcomes des tissus mous, les ostéosarcomes, les tumeurs cérébrales, les cancers du sein du sujet jeune, les corticosurrénalomes, les tumeurs des plexus choroïdes, les hémopathies malignes à type de leucémies ou de lymphomes et le cancer du poumon [20-22]. Le LFS est définit cliniquement par les critères de Chompret révisés [22-26] (Tableau 1). Il se transmet sur le mode autosomique dominant avec la mise en évidence d'une mutation constitutionnelle du gène *TP53* dans environ 70% des familles. La pénétrance des mutations délétères du gène *TP53* est forte avec un risque de développer un cancer de 15% à 15 ans, puis de 80% à 50 ans pour les femmes contre 40% au même âge pour les hommes. Cette différence de pénétrance entre les deux sexes étant essentiellement expliquée par le cancer du sein. Le conseil génétique est délicat en raison du large spectre des tumeurs et de leur survenue à tout âge, surtout dans l'enfance. Il existe dans ce syndrome un risque important de cancers radio-induits ce qui peut amener à des modifications dans la prise en charge thérapeutique [27, 28]. De plus, il n'existe pas de mesure de surveillance efficace, à l'exception de celle pour le cancer du sein chez les femmes, bien que des études de surveillance par IRM corps entier chez les patients asymptomatiques porteurs d'une mutation délétère du gène *TP53* soient en [29].

Le diagnostic moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni en France est quasiment exclusivement réalisé au laboratoire de Génétique Moléculaire de Rouen. En raison de cette position comme centre de référence, nous bénéficions ainsi au laboratoire d'un important recrutement de familles atteintes de multiples cancers et/ou de cancers rares comme le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand, un sarcome des tissus mous et pour lequel il n'a jamais été retrouvé de mutation constitutionnelle du gène *TP53*.

Tableau 1. Critères de Chompret révisés de 2009 pour le dépistage de mutation germinale du gène *TP53*

	Critères
I.	Cas index avec une tumeur appartenant au spectre tumoral du LFS (sarcome des tissus mous, ostéosarcome, tumeur cérébrale,cancer du sein préménauposique, leucémie, corticosurrénalome, cancer bronchoalvéolaire du poumon) avant l'âge de 46 ans **ET** au moins un apparenté au premier ou au second degré avec une tumeur du spectre (à l'exception du cancer du sein si le proband présentait lui même un cancer du sein) avant l'age de 56 ans ou avec de multiples tumeurs
	OU
II.	Cas index avec de multiples tumeurs (à l'exception de cancers du sein multiples), dont deux appartiennent au spectre tumoral du LFS et la première tumeur avant 46 ans
	OU
III.	Patient avec un corticosurrénalome ou une tumeur des plexus choroïde, quelque soit l'histoire familiale

Abréviation utilisées : LFS, syndrome de Li-Fraumeni

Tableau issu de l'article de Tinat *et al.*, 2009 [25].

II. DERMATOFIBROSARCOME DE DARIER ET FERRAND

II 1. Présentation du dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand

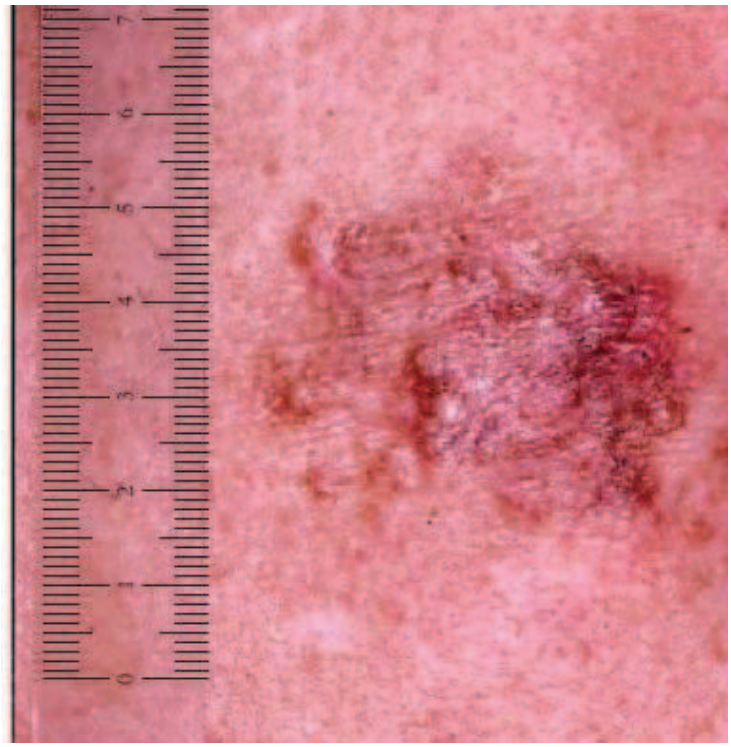
II 1 1. Epidémiologie

Le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand (DFS), également appelé *Dermatofibromatosarcoma Protuberans* est un sarcome des tissus mous, généralement de bas grade de malignité et d'évolution lente, développé à partir du derme. Rare, le DFS représenterait approximativement 0,1% de l'ensemble des cancers. Sa prévalence est estimée entre 0,8 et 5 par million [30, 31] et son incidence à 4,2 par million [32]. Selon l'étude de Kransdorf ayant répertorié les cancers des tissus mous sur une période de 10 ans, il représenterait seulement 6 % des 12 000 cas de tumeurs malignes des tissus mous diagnostiqués, entre 1980 et 1990 [33]. Le sex-ratio du DFS est de trois hommes pour deux femmes [34, 35]. De plus, le DFS serait presque deux fois plus fréquent chez les individus de peaux noires [36, 37]. D'évolution lente, il est difficile de déterminer la date de son apparition. Il est diagnostiqué à tout âge, même en période néonatale [38, 39] mais il apparaît plus fréquemment entre 30 et 50 ans [34, 40, 41].

II 1 2. Diagnostic clinique

Initialement décris en 1924 par les deux dermatologues français Darier et Ferrand, le DFS se présente sous la forme de lésions cutanées localisées sur n'importe quelle partie du corps, débutant par des plaques cutanées fibreuses rosées ou violettes-rouges surélevées et indurées qui s'étendent progressivement (figure 2A), puis évoluent lentement en un ou plusieurs nodules dermiques de consistance ferme et pouvant atteindre plusieurs centimètres (figure 2B). Le diagnostic du DFS est souvent tardif et retardé parfois de plusieurs années en raison de la progression très lente des lésions et l'aspect peu spécifique au stade initial de plaques cutanées, il est par contre de diagnostic facile au stade multinodulaire.

A



B

Figure 2. Lésions cutanées observées dans le DFS

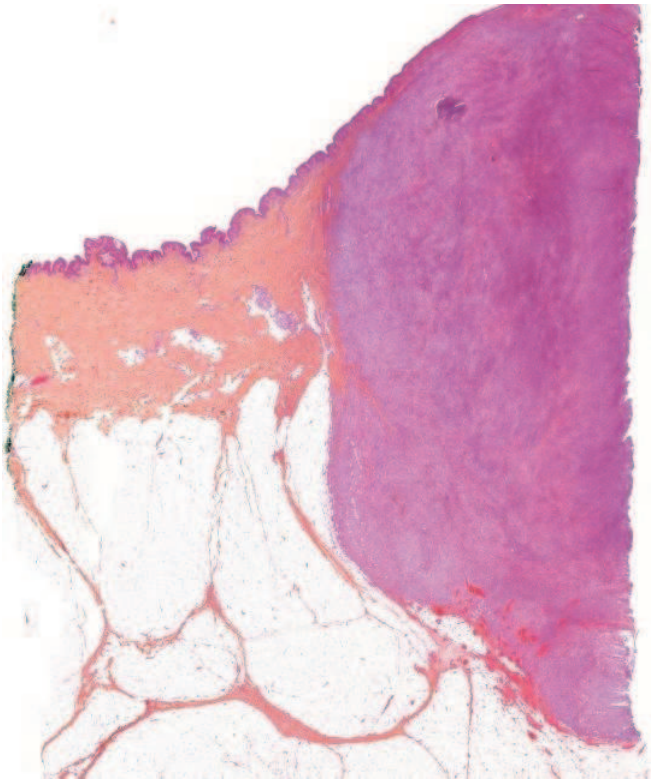
A. Plaque localisée au niveau du dos. **B.** Plaque avec évolution nodulaire localisée au niveau inguinal. Images issues de l'article de Bianchini *et al.*, 2007 [42].

II 1 3. Diagnostic anatomopathologique

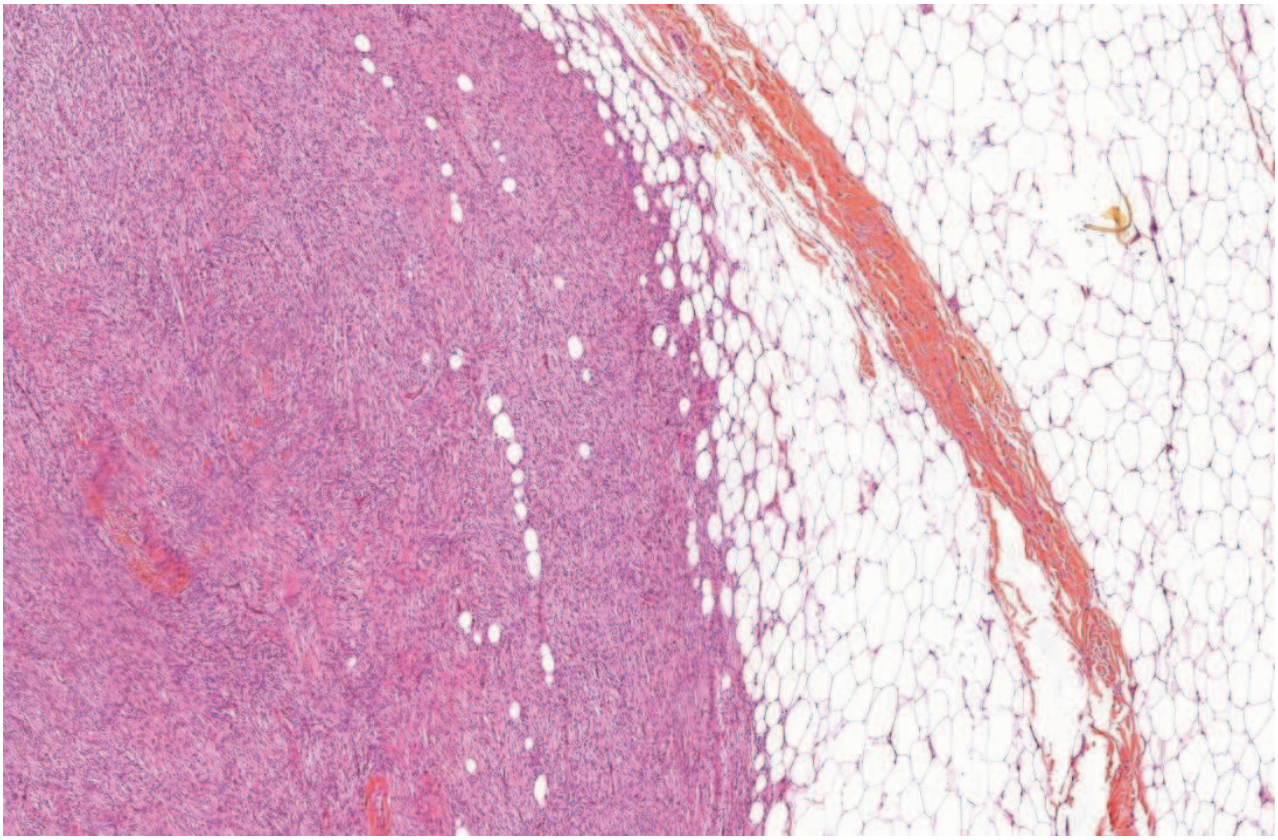
Le diagnostic de DFS est porté par l'examen histologique d'une biopsie de la lésion. Cet examen retrouve une prolifération tumorale monomorphe de cellules bien différenciées à point de départ dermique. Les cellules sont d'aspect fibroblastique, généralement fusiformes et se disposant parfois selon des structures tournoyantes en rayons de roue ou en panier d'osier. La tumeur respecte l'épiderme, mais infiltre le derme et l'hypoderme dissociant les lobules adipeux hypodermiques en suivant les axes vasculaires donnant parfois un aspect caractéristique de nid d'abeille. Cette infiltration le long des axes vasculo-nerveux et des plans aponévrotiques se fait souvent bien plus loin que ne le laisse supposer la clinique ou l'aspect macroscopique. C'est pourquoi l'examen anatomopathologique est essentiel lors du traitement chirurgical afin de déterminer les marges d'exérèse et limiter les récidives. Enfin, contrairement au fibrosarcome, l'examen histologique ne met pas en évidence d'anomalies nucléaires ni d'élévation de l'index mitotique dans le DFS. L'aspect du DFS lors de l'examen anatomopathologique est illustré sur la figure 3. Il s'agit de l'examen macroscopique et microscopique d'un DFS de la fesse survenu chez un homme d'une trentaine d'années et diagnostiqué au CHU de Rouen.

A

B



C



D

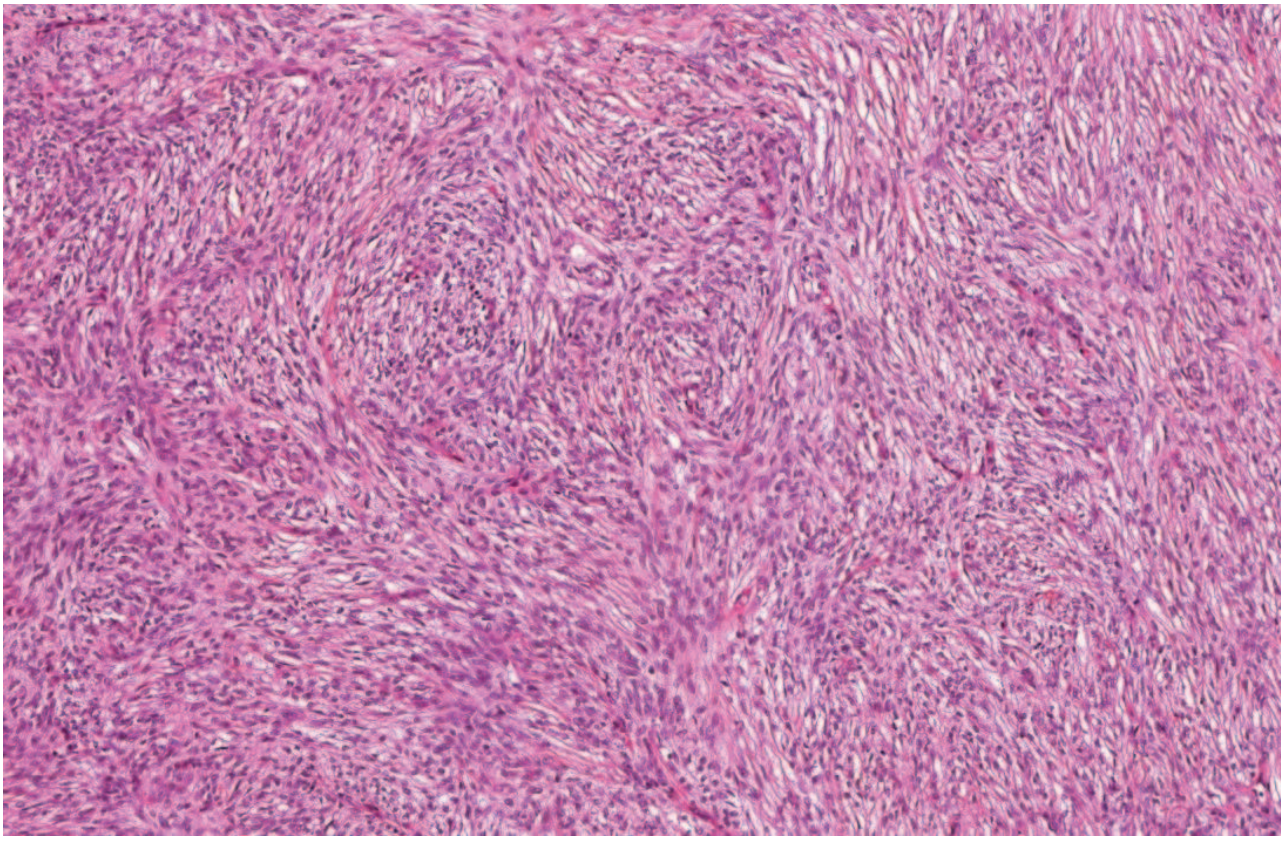


Figure 3. Examen anatomopathologique de DFS

A. Examen macroscopique d'un lambeau cutané avec au centre un dermatofibrosarcome se présentant comme un nodule cutané pigmenté mesurant 1,8 x 1,7 cm. **B.** Examen microscopique en coloration HES du DFS. Vue au grossissement X4 permettant d'observer à gauche la peau saine et à droite une tumeur cutanée bien définie, à bords réguliers, développée au dépend du derme, respectant l'épiderme et envahissant l'hypoderme. **C.** Vue au grossissement X10, révélant une prolifération cellulaire monomorphe de cellules fusiformes sans aucun pléomorphisme apparent qui infiltre le derme avec une dissociation des lobules adipeux. **D.** Vue au grossissement X20, révélant des cellules d'aspect fibroblastique réalisant des structures tournoyantes.

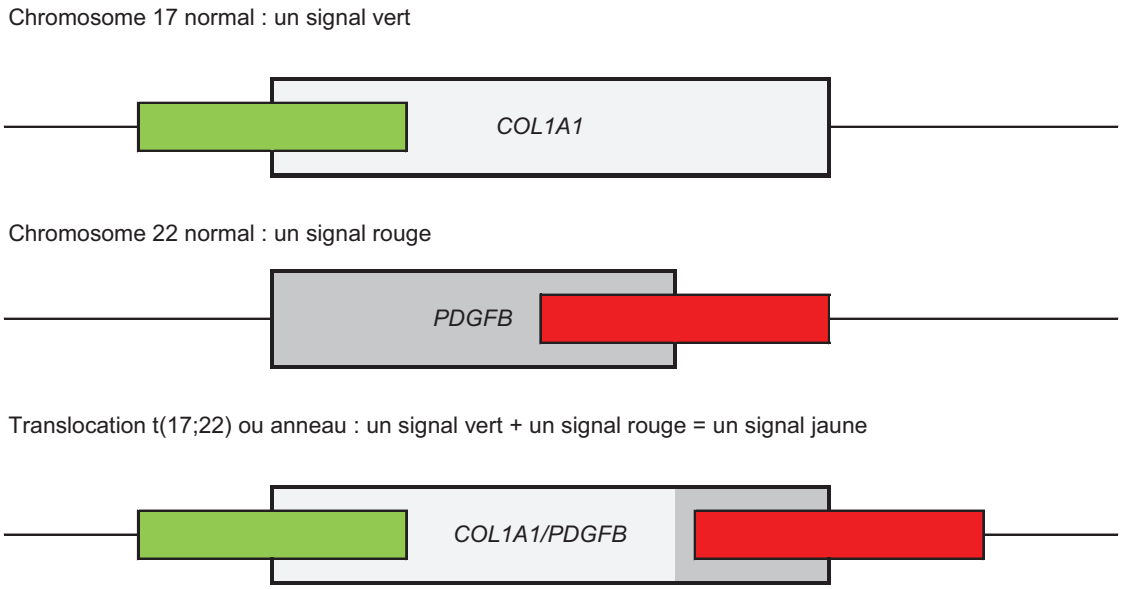
Ces images ont été aimablement communiquées par le laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Rouen.

L'origine histogénétique, c'est-à-dire le type de cellule à l'origine de la transformation maligne, est encore incertaine à ce jour, mais elle serait probablement d'origine fibroblastique ce qui pourrait expliquer l'aspect histologique et immunohistochimique des cellules du DFS. Bien que plutôt peu spécifique, l'immunohistochimie peut aider à différencier le DFS d'autres tumeurs de même localisation. En effet, le DFS présente des marquages positifs à l'antigène CD34, au hyaluronate, et à la vimentine tandis que le marquage est négatif pour la protéine S100 et le facteur XIIIa. Ce marquage CD34+ est assez sensible et permet de faire la différence avec un dermatofibrome. De plus, il est possible d'observer une disparition du marquage CD34 dans certaines régions de la tumeur, ce qui doit faire suspecter un contingent fibrosarcomateux associé [36]. Les tumeurs des gaines nerveuses présentent pour leur part un marquage positif pour S100.

Le DFS se caractérise par des anomalies génétiques récurrentes à type de translocation chromosomique t(17;22) ou d'anneau chromosomique surnuméraire issu du réarrangement des deux même chromosomes [43]. C'est pourquoi, il est possible dans les cas douteux de confirmer le diagnostic avec une analyse cytogénétique des cellules tumorales recherchant ces anomalies génétiques. Cet examen peut être également complété par une analyse par hybridation in situ fluorescente (FISH) permettant d'objectiver sur coupes tissulaires la cassure du chromosome 22 et de la fusion de deux chromosomes anormaux (Figure 4). Cependant, l'examen histologique et l'immunohistochimie étant suffisants pour poser le diagnostic, ces deux examens de cytogénétique ne sont pas réalisés dans la pratique courante.

Le diagnostic différentiel inclut le fibrosarcome, le dermatofibrome, le neurofibrome et d'autres tumeurs du tissu mou. L'histologie, l'immunohistochimie et le caractère plus délimité du DFS permet de faire la différence.

A



B

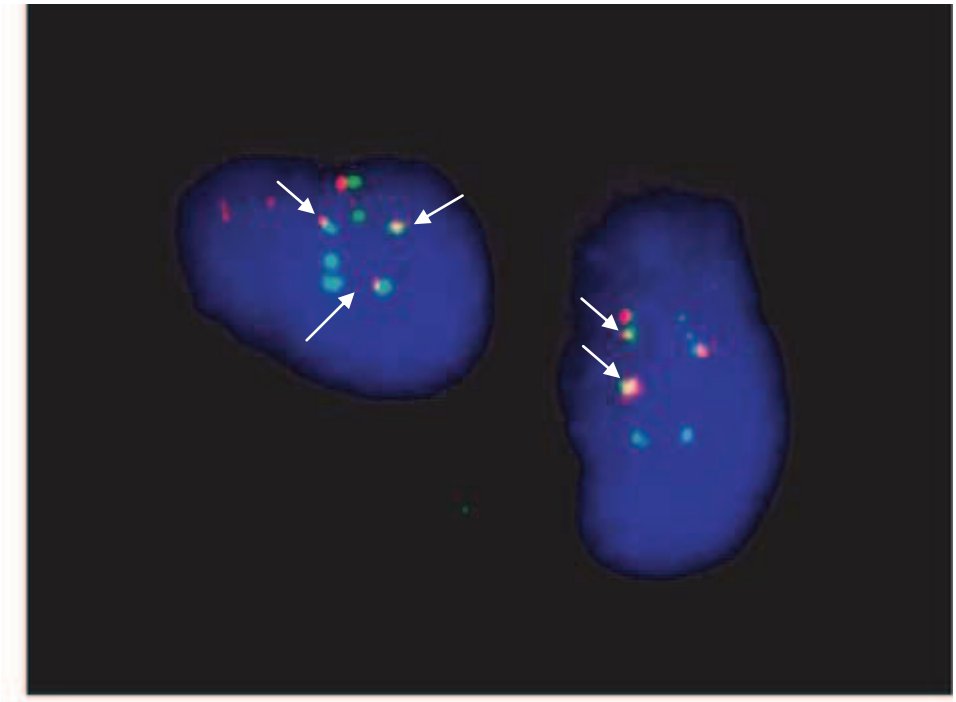


Figure 4. Analyse par FISH sur noyaux interphasiques de DFS

A. Localisation schématique des sondes de FISH. **B.** Réarrangement chromosomique au locus du gène *PDGFB* détectée par FISH, comme en témoigne dans les cellules tumorales la présence de plusieurs signaux jaunes visualisés par les flèches et signant la présence de plusieurs gènes de fusion *COL1A1/PDGFB.* Images issues de l'article de Bianchini *et al.*, 2007 [42].

II 1 4. Evolution naturelle

Dans la grande majorité des cas, les DFS présente un bas grade de malignité avec une évolution indolente sur plusieurs années, de très rares métastases [44], mais un risque très élevé de récurrence et une infiltration locale des tissus. Dans ces cas, le DFS ne met pas en jeu le pronostic vital. Le pronostic est uniquement lié à la qualité de son exérèse chirurgicale qui doit être suffisante pour limiter le risque de récidive. Dans 10 à 15% des cas, parfois après de nombreuses années d'évolution ou au décours de multiples récidives, le DFS peut se transformer en tumeurs fibrosarcomateuses de malignité intermédiaire ou de haut grade de malignité. Le pronostic est alors plus réservé dans ces variantes fibrosarcomateuses en raison de leur plus grand risque de récidive et de métastases [45, 46]. Globalement, le taux de mortalité est faible (<3% à 10 ans).

II 1 5. Prise en charge

La prise en charge du DFS est avant tout chirurgicale avec examen anatomopathologique extemporané. Une imagerie par IRM ou scanner est réalisée afin d'estimer la profondeur de l'invasion tumorale et lors du bilan d'extension à la recherche d'éventuelles métastases. L'exérèse chirurgicale est suffisante pour guérir dans plus de 90% des cas, mais elle nécessite des marges d'exérèse en tissu sain larges à plusieurs centimètres des bords de la tumeur selon la technique de chirurgie afin de supprimer tout risque de récidive locale. Ces marges d'exérèse larges influent sur les conséquences, notamment esthétiques, de la chirurgie, surtout en cas de tumeur de grande taille. En cas d'excision incomplète de la tumeur, il est souvent nécessaire de renouveler la chirurgie, mais une radiothérapie postopératoire peut aussi être proposée. Pour reprendre l'exemple du patient ayant été diagnostiqué au CHU de Rouen, la tumeur qui mesurait 1,8 cm de grand axe a nécessité l'excision d'un lambeau cutané de 6 cm de diamètre.

Il existe dans le DFS une hyperproduction du facteur de croissance dérivé des plaquettes de type B (PDGFB) et une hyperstimulation du récepteur au PDGF qui serait à l'origine de la transformation maligne [43, 47]. Ce récepteur au PDGFB n'est pas surexprimé dans ces cancers, mais il appartient à la classe des récepteurs à activité tyrosine kinase au même titre que le récepteur ABL impliqué dans la leucémie myéloïde chronique ou encore c-KIT impliqué dans les formes sporadiques et certaines formes familiales de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) [48]. Or il existe pour ces deux types de cancer une chimiothérapie efficace ciblant les récepteurs tyrosine kinase : le mésylate d'imatinib ou

simplement imatinib, commercialisé sous le nom de Glivec®. Cette molécule inhibe l'activité de ces deux récepteurs mais également le récepteur du PDGFB [49]. C'est pourquoi l'imatinib constitue actuellement le traitement de référence des DFS métastatiques ou non réséquables sur la base des hauts taux de réponse tumorale dans différents essais cliniques prospectifs [50, 51]. Plusieurs essais thérapeutiques ont aussi été réalisés afin de tester l'efficacité de l'imatinib en préopératoire afin de limiter les conséquences de la chirurgie [52] et en postopératoire pour limiter les récidives [53]. Cette utilisation, bien que prometteuse, doit encore démontrer son efficacité dans de plus grandes études et se heurte aux fréquents effets secondaires liés à l'utilisation de ce médicament. Pour finir, d'autres thérapies ciblées pourraient voir le jour pour le traitement du DFS avec un prochain essai thérapeutique de phase II utilisant le pazopanib, un inhibiteur de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase comme les récepteurs du VEGF, du PDGF et c-KIT.

II 2. Bases génétiques du dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand

II 2 1. Anomalies génétiques récurrentes

Dans plus de 95% des DFS, sont observées deux anomalies génétiques récurrentes correspondant soit en une translocation des bras longs des chromosomes 17 et 22 t(17;22)(q21.33;q13.1), soit plus souvent encore en la formation d'un anneau chromosomique surnuméraire. Ces anomalies génétiques ont été découvertes en 1997 [43] et aboutissent toutes les deux à la fusion des gènes *COL1A1* situé sur chromosome 17(17q21.33) et *PDGFB* situé sur chromosome 22(22q13.1) (Figure 5). Il a d'ailleurs été émis l'hypothèse qu'avec le temps ces translocations t(17;22) se transformeraient en anneaux chromosomiques surnuméraires et seraient sélectionnées dans les cellules cancéreuses dont elles favoriseraient la prolifération [42]. Suivant l'exemple canonique des translocations chromosomiques dans les leucémies et les lymphomes, ces deux anomalies génétiques récurrentes activent le proto-oncogène *PDGFB* avec la création d'un gène de fusion *COL1A1/PDGFB.* Ce gène de fusion a pour conséquences une surexpression de la protéine PDGFB et une hyperstimulation de la voie du PDGFB aboutissant à la transformation maligne. Le point de cassure chromosomique dans ces anomalies génétiques est très variable pour le gène *COL1A1*, mais il est constamment situé dans le premier intron du gène *PDGFB* [43, 54, 55]. Dans les très rares formes de DFS ne présentant pas la translocation t(17;22) ont été retrouvées plusieurs autres translocations impliquant le plus souvent le gène

PDGFB [56, 57]. Cela tend à conforter le rôle de proto-oncogène du *PDGFB* et à limiter l'implication du gène *COL1A1* dans cette pathologie.

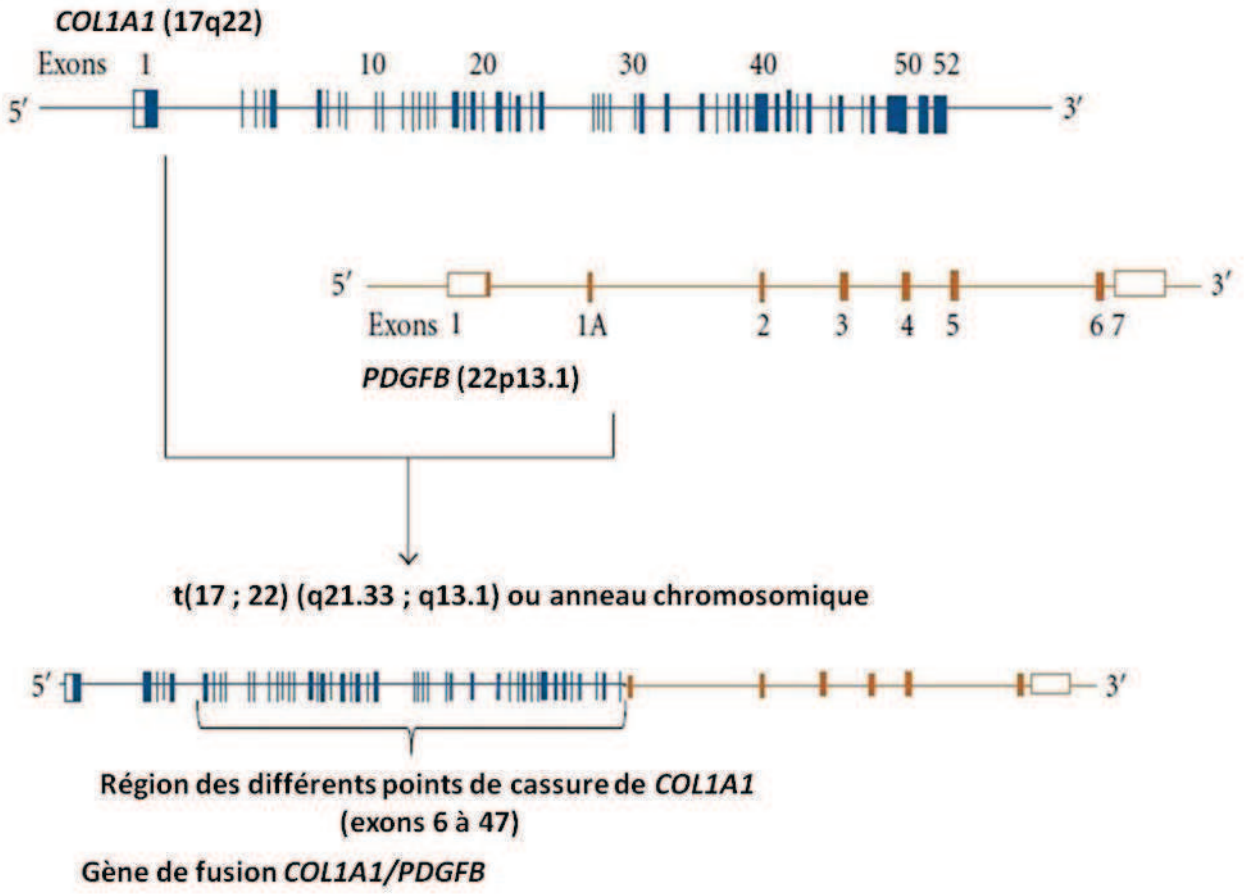


Figure 5. Représentation schématique de la formation du gène de fusion *COL1A1/PDGFB* Schéma issu de l'article de Rutkowski *et al.*, 2011 [58].

II 2 2. Présentation du PDGF

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) a été identifié en 1974 comme une protéine localisée dans les granules alpha des plaquettes humaines ayant la capacité à favoriser la croissance et la division des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules gliales [59-61]. Le PDGF appartient à la même famille de facteur de croissance que le VEGF et possède une puissante activité mitogène et de chimiotactisme pour les cellules exprimant des récepteurs au PDGF, typiquement des cellules d'origine mésenchymateuse. Il joue un rôle important dans la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies [62], mais il est également impliqué dans l'angiogenèse et dans la croissance et le développement de nombreux organes comme le cerveau durant l'embryogénèse. Il joue un rôle important dans différents processus physiopathologiques des cellules cancéreuses comme la néoangiogénèse [63] et la formation de métastases [64]. Enfin, il a également été impliqué dans la formation de la plaque d'artériosclérose [65]. Il consiste en homodimères ou hétérodimères issus de quatre chaînes protéiques distinctes et étroitement reliées par des ponts disulfures. Il existe cinq isoformes différentes de PDGF avec quatre homodimères de chaîne A (PDGFA), B (PDGFB), C (PDGFC) et D (PDGFD), ainsi qu'un hétérodimère constitué des chaînes A et B. Les quatre chaînes ont des expressions différentes selon les tissus, les stades de développement ou les différents états physiopathologiques.

II 2 3. PDGFB

Le gène *PDGFB* impliqué dans le DFS code pour la chaîne B du PDGF et est situé sur le chromosome 22 en 22q13.1. Il possède 8 exons avec notamment un premier exon alternatif permettant au gène de coder deux protéines qui sont secrétées dans le milieu extracellulaire sous la forme de précurseurs de 241 et 226 acides aminés avec notamment un peptide signal codé par les premiers exons alternatifs. L'expression du PDGFB est régulée à la fois au niveau de la transcription et de la traduction. Plusieurs études ont montré que la région 5'UTR de l'ARNm, codée par le premier exon du gène, inhibe fortement la traduction et donc l'expression de la chaîne protéique de PDGFB [66-69]. Or les anomalies chromosomiques observées dans le DFS séparent l'ARNm du premier exon inhibiteur.

La biosynthèse et la maturation du PDGF sont contrôlées à plusieurs niveaux et diffèrent selon les isoformes de PDGF. La synthèse de l'homodimère de PDGFB nécessite tout d'abord une étape de ligation de deux précurseurs par des ponts disulfures, puis une

étape de maturation intracellulaire avec la protéolyse du pro-domaine N-terminal par la furine ou d'autres proprotéines convertases ayant une activité enzymatique similaire [70, 71]. Cette étape de maturation serait probablement nécessaire au PDGFB pour acquérir la capacité de liaison aux récepteurs et donc devenir actif [70, 72]. Enfin, il peut exister une dernière étape intracellulaire de protéolyse du domaine C-terminal. Ce domaine consiste en motif de rétention du ligand à la surface externe de la cellule et sa protéolyse permet ainsi la sécrétion dans le milieu extracellulaire du ligand actif et soluble.

Le gène *PDGFB* constitue l'un des premiers proto-oncogènes humain décrits. Il fut identifié et cloné par Dalla-Favera et collaborateurs en 1981 lors des premières études d'analogie avec des oncogènes viraux [73]. En effet, le *PDGFB* présente de nombreuses similitudes avec un gène de rétrovirus animal : le *gène v-sis* du virus du sarcome simien (SSV) [74, 75]. Ce rétrovirus est responsable du développement de cancer à type de fibrosarcome chez le singe et c'est ce même gène *v-sis* qui est responsable de la transformation maligne chez les singes infectés. C'est pourquoi *PDGFB* a été initialement dénommé *C-SIS* et ce n'est que deux années plus tard que le gène fut identifié comme le gène codant la chaîne B du PDGF. Sa similitude est bien plus importante avec le gène *PDGFB* que *PDGFA* [76], de plus plusieurs expériences sur des modèles de cellules NIH3T3 ont montré qu'à la fois l'oncogène viral *v-sis*, mais aussi le gène humain *C-SIS* (*PDGFB*) sont capables, lorsque leur expression est sous la dépendance du promoteur viral, d'induire une transformation des cellules [77].

Lorsqu'il est secrété dans le milieu extracellulaire le PDGFB est capable de stimuler les cellules proches portant son récepteur selon un mode paracrine. Mais il a également été décrit l'existence d'autostimulation autocrine par le PDGFB [78]. La co-expression de PDGFB et de son récepteur dans certaines tumeurs humaines comme le DFS et certaines leucémies suggèrent un rôle du PDGFB de stimulation autocrine de la croissance néoplasique [79]. Par la suite, plusieurs études démontrèrent la capacité du PDGFB à induire la prolifération, à inhiber l'apoptose et à réguler le cycle cellulaire [72]. L'expression du PDGFB a également été mise en évidence dans de nombreux types de cancers humains tandis que les cellules normales n'exprimaient pas ou très peu la protéine [80]. Plus récemment, PDGFB a été décrit comme impliqué dans la transition mésenchymo-épithéliale [81], dans la néoangiogénèse tumorale et la perméabilisation des vaisseaux favorisant les métastases [64].

L'implication dans de nombreux processus physiopathologiques des cancers font du PDGF un thème de recherche important pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. En plus, des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase comme l'imatinib, précédemment décrit, les autres grands mécanismes pharmacologiques en cours d'études sont des molécules piégeant le PDGF comme des anticorps anti-PDGF, des aptamères ou

des récepteurs solubles bloquant le ligand PDGF, mais aussi des inhibiteurs de la fixation du ligand sur le récepteur avec des anticorps anti-PDGFR ou des inhibiteurs compétitifs.

II 2 4. COL1A1

Le gène *COL1A1* code pour la chaîne alpha 1 du collagène de type I qui est exprimé par les fibroblastes à un niveau élevé. Le collagène de type I est d'ailleurs la plus abondante des protéines du corps humain. Les mutations constitutionnelles du gène *COL1A1* sont impliquées dans certaines formes d'ostéogénèse imparfaite et du syndrome d'Elher-Danlos. Il présente 51 exons et code pour une protéine qui est secrétée dans le milieu extracellulaire sous la forme d'un précurseur de 1464 acides aminés avec notamment un peptide signal formé par les 22 premiers acides aminés. Le gène *COL1A1* ne jouerait pas un rôle important dans l'oncogénèse comme l'atteste l'existence de translocation impliquant le *PDGFB* et d'autres partenaires que *COL1A1* [56, 57]. De plus, les translocations t(17;22) ne concernent que le premier intron du gène *PDGFB*, tandis qu'il existe de multiples points de cassures introniques pour le gène *COL1A1* [43, 54, 55]. Par conséquent, les différentes portions de séquences codantes apportées par *COL1A1* dans le gène de fusion *COL1A1/PDGFB* ont probablement peu d'importance dans l'oncogenèse. La fusion avec le gène *COL1A1* apporte comme avantages sélectifs (i) un promoteur fort et des régions régulatrices favorisant l'expression de la protéine de fusion dans les cellules cancéreuses ; (ii) le remplacement du peptide signal du PDGFB permettant ainsi la sécrétion de la protéine de fusion ; (iii) avec un respect du cadre de lecture du gène *PDGFB*.

II 2 5. Effet transformant du gène de fusion *COL1A1/PDGFB*

La capacité de transformation de la protéine chimérique COL1A1/PDGFB a été décrite en 1998 lors d'étude transfection du gène de fusion dans des cellules NIH3T3 [47]. Par la suite, il a été démontré que le produit du gène de fusion subissait la même protéolyse activatrice que la chaîne protéique normale de PDGFB [82]. En effet, le site de clivage est codé par l'exon 3 du gène *PDFGB* et permet à la protéine chimérique d'aboutir à la formation d'une protéine PDGFB activée parfaitement normale. Il s'agit donc d'un exemple d'événement moléculaire activant un proto-oncogène qui ne consiste ni en une translocation chromosomique dérégulant l'expression d'un gène ni en un gène de fusion codant pour une

nouvelle protéine avec une fonction aberrante, mais en un gène de fusion aboutissant à la surexpression d'une protéine normale.

En résumé, la translocation t(17;22) ou l'anneau chromosomique surnuméraire responsable de DFS place le gène *PDGFB* sous la dépendance du promoteur et des régions régulatrices du gène *COL1A1* qui est fortement exprimé, notamment dans les fibroblastes. Cette anomalie génétique libère également l'ARNm du *PDGFB* de son premier exon et donc de son contrôle négatif de la traduction. La protéine de fusion COL1A1-PDGFB est secrétée sous la forme d'un précurseur et subit une protéolyse produisant une protéine PDGFB pleinement fonctionnelle. L'anomalie génétique observée dans le DFS aboutit donc à une augmentation de l'expression du PDGFB à la fois au niveau transcriptionnel et au niveau traductionnel. Cette hyperproduction de PDGFB aboutirait ensuite à une hyperstimulation autocrine et paracrine des cellules possédant des récepteurs au PDGFB et c'est cette hyperstimulation de la voie du PDGFB qui causerait la formation de dermatofibrosarcome.

II 2 6. Récepteurs de la voie du PDGFB

Le PDGF exerce son action au travers de deux récepteurs tyrosine kinase situés sur la surface des cellules cibles et structurellement très similaires. Le récepteur alpha (PDGFRA) et le récepteur béta (PDGFRB) vont ainsi lier le PDGF, permettant l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des récepteurs et leur activation par autophosphorylation des domaines intracellulaires tyrosine kinase. Cette autophosphorylation entraîne un changement de conformation des récepteurs et permet l'interaction avec d'autres protéines intracellulaires assurant la transduction du signal comme les protéines SH2 (SRC Homology 2), PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) ou PLCδ (isotype gamma de la Phospholipase C).

PDGFRA et *PDGFRB* sont tous les deux des proto-oncogènes et ont été impliqués dans plusieurs types de cancers. Des amplifications du gène *PDGFRA* ont été rapportées dans les glioblastomes [83, 84] et des mutations ponctuelles de ce gène *PDGFRA* sont impliquées dans certaines formes sporadiques ou héréditaires de GIST [85]. Le gène *PDGFRB* a également été impliqué dans la leucémie myélomonocytaire chronique et dans des syndromes myéloprolifératifs avec hyperéosinophilie (MIM #131440). En effet, au cours de cette dernière hémopathie se produit une translocation créant un gène de fusion entre le *PDGFRB* et un autre gène, généralement *ETV6*. Ce gène de fusion donne naissance à une protéine chimère possédant le domaine tyrosine kinase du PDGFRB qui devient ainsi constitutivement actif, indépendamment de la fixation du ligand [86].

L'existence de cinq isoformes de PDGF et de 3 dimères de récepteurs différents procure en théorie de nombreuses combinaisons possibles pour la signalisation du PDGF. Cependant, il n'existe des preuves *in vivo* que pour un nombre limité de couples ligands-récepteurs. Le ligand PDGFB n'a ainsi pour seul récepteur que le récepteur béta au PDGF (PDGFRB). Le PDGFRB apparaîtrait donc comme le récepteur permettant l'hyperstimulation autocrine et paracrine des cellules par le PDGFB et leur transformation maligne dans le DFS.

Le gène *PDGFRB* possède 23 exons et code pour un récepteur transmembranaire de 1106 acides aminés localisé à la surface des cellules. Les régions codant la protéine correspondent aux exons 2 à 23. La protéine PDGFRB est composée d'un peptide signal formé par les 32 premiers acides aminés, d'un domaine extracellulaire de 500 acides aminés, comprenant 5 domaines successifs immunoglobulin-like de type C2. C'est cette portion extracellulaire de la protéine qui reconnaît le ligand PDGF avec le site de fixation du ligand composé du deuxième et troisième domaine immunoglobulin-like. La protéine comprend également une hélice alpha transmembranaire de 21 acides aminés et un domaine intracellulaire de 553 acides aminés. Cette portion intracellulaire du récepteur comprend les régions effectrices et permet la transduction du signal avec notamment un domaine tyrosine kinase de 363 acides aminés. Des mutations somatiques concernant la portion intracellulaire du PDGFRB ont d'ailleurs été décrites en 2007 par Greenman dans des tumeurs de type GIST et cancer du sein. De nombreuses mutations somatiques faux-sens ou pouvant impliquer l'épissage du gène *PDGFRB* sont également rapportées dans la base de données COSMIC (Catalogue of Somatic Mutation In Cancer) [87] dans des cancers de la peau, de l'estomac, du sein, de l'ovaire, du colon, du poumon, de la prostate et des tumeurs du système nerveux central.

MATERIEL ET METHODES

I. PATIENTS ETUDIES

Huit patients avec une histoire personnelle et familiale associant de multiples cas de cancer dont un dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand ont été étudiés. Deux patients (patients 1 et 6) avaient également un apparenté lié au second degré atteint de DFS constituant une présentation familiale de cette tumeur. Sept patients ont été adressés pour le diagnostic moléculaire d'un syndrome de Li-Fraumeni et parmi ces sept patients, cinq d'entre eux avaient des antécédents familiaux répondant strictement à la définition de ce syndrome selon les critères révisés de Chompret [25]. Pour chacun de ces sept patients, le criblage du gène *TP53* par séquençage et QMPSF s'était révélé négatif. Le patient 4 avait été adressé pour le diagnostic moléculaire d'un syndrome de Lynch mais présentait également un dermatofibrosarcome et un criblage des gènes *MLH1*, *MSH2* et *MSH6* par séquençage et QMPSF qui s'était révélé négatif. Nous disposions également de prélèvements d'apparentés pour deux des patients testés afin de rechercher une ségrégation des éventuelles anomalies observées avec la pathologie. Pour chaque famille étudiée, le cas-index était un patient ayant présenté un dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand. Toutefois, chez un patient (patient 5), le diagnostic de DFS a été reclassé comme fibrosarcome bien que le diagnostic de DFS était très fortement suspecté par le clinicien ayant fait l'observation de ce patient. En parallèle à ces huit patients, nous avons étudié une femme de 52 ans indemne de tout cancer comme témoin lors de nos manipulations.

L'analyse des gènes *PDGFRB* et *PDGFB* a été réalisée à partir de sang total recueilli sur des tubes EDTA. L'ensemble de ces prélèvements a été collecté dans six centres de Génétique clinique de France et un centre suisse. Les huit patients et le témoin appartiennent à des familles indépendantes et sont tous d'origine caucasienne, sauf le patient 3 qui est d'origine nord-africaine. Un consentement éclairé pour la réalisation d'analyses de génétique a été recueilli pour chacun des patients et pour le témoin.

Les différentes analyses de génétique déjà réalisées, les cancers, leur âge de survenu ainsi que la présentation sporadique ou familiale de DFS pour les huit patients étudiés sont résumés dans le tableau 2. Les histoires familiales de cancer des huit patients étudiés sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 2. Patients étudiés

Patient	Sexe	Analyses génétiques réalisées	Tumeur* (âge au diagnostic)	Présentation familiale
1	masculin	*TP53*	DFS (30)	DF nièce (10)
2	masculin	*TP53* Caryotype haute resolution	DFS (27), TE (44), P (52)	sporadique
3	féminin	*TP53*	DFS (32), S (32)	sporadique
4	féminin	*MLH1* / *MSH2* / *MSH6*	DFS (28), C (38)	sporadique
5	féminin	*TP53*	F (11), S (39)	sporadique
6	masculin	*TP53*	DFS (30), LALT (30)	DF oncle (53)
7	féminin	*TP53* *BRCA1* / *BRCA2*	DFS (31), S (39)	sporadique
8	féminin	*TP53*	DFS (22)	sporadique

*Abréviations utilisées:

C : Cancer du colon
DFS : Dermatofibrosarcome de Darrier et Ferrand
F : Fibrosarcome
LALT : Leucémie aigüe lymphocytaire T
P : Adénocarcinome bronchopulmonaire
S : Cancer du sein
SCF : Sarcome à cellules fusiformes
TE : Tumeur neuroendocrine de l'ethmoïde

Tableau 3. Antécédents familiaux de cancer des huit patients étudiés

Familles	Tumeur* (âge au diagnostic)	Prélèvements disponibles	Critères de Chompret pour le syndrome de Li-Faumeni
Patient 1	**DFS (30)**	sang	
Sœur	C (36), S (39), PK (57)	sang (x2)	
Sœur	S (46 et 53)	sang	
Mère	S (54)		
Père	R (69)		oui
Nièce	**DFS (10)**		
Grand-mère maternelle	LA (39)		
Grand-tante maternelle	S (68)		
Arrière grand-oncle maternel	C (66)	sang	
Patient 2	**DFS (27)**, TE (44), P (52)	sang (x2)	
Père	L (26), PR (>60)		
Tante paternelle	S (50)		oui
Cousine maternelle	TC (?)		
Petit cousin marternel	R (?)		
Patient 3	**DFS (32)**, S (32)	sang	
Mère	C (61)		oui
Père	PR (82)		
Patient 4	**DFS (28)**, C (38)	sang (x2), salive	non
Patient 5	F (11), S (39)	sang (x2)	
Mère	V (?) TI (?)		
Grand-mère maternelle	TI (50)		oui
Grand-tante maternelle	U (46) TI (50)		
Grand-tante maternelle	S (>70)		
Patient 6	**DFS (30)**, LALT (30)	sang	
Oncle paternel	**DFS (53)**		
Oncle paternel	P (58)		oui
Grand-père paternelle	O (77)		
Grand-mère paternelle	TC (39)		
Patient 7	**DFS (31)**, S (39)	sang, salive	
Sœur	S (26)	ADN	
Sœur	S (44)		
Père	PR (65)		
Mère	S (63)		oui
Grand-père paternel	PR (?)		
Tante maternelle	S (45)		
Oncle maternel	SCF (54)		
Grand-mère maternelle	TC (76)		
Patient 8	**DFS (22)**	sang, salive	
Mère	S (39)		oui
Grand-mère maternelle	L (60)		

*Abréviations utilisées:

C : Adénocarcinome du colon
DFS : Dermatofibrosarcome de Darrier et Ferrand
F : Fibrosarcome
LA : Cancer du larynx
L : Leucémie, sans précicion
LALT : Leucémie aigüe lymphocytaire T
O : Cancer de l'oesophage
P : Adénocarcinome bronchopulmonaire
PK : Cancer du pancréas, sans précision
PR : Adénocarcinome de prostate
R : Cancer du rein, sans précision
S : Cancer du sein
SCF : Sarcome à cellules fusiformes
TC : Tumeur cérébrale, sans précision
TE : Tumeur neuroendocrine de l'ethmoïde
TI : Tumeur cutanée, sans précision
U : Adénocarcinome utérin
V : Tumeur de la vésicule biliaire, sans précision

II. EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction d'ADN génomique a été effectuée à partir de 2 ml sang total en utilisant le kit d'extraction FlexiGene® DNA Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. La concentration ainsi que la pureté des ADN extraits ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre mesurant l'absorbance à 260 nm (NanoDrop®). La concentration des différents prélèvements d'ADN a ensuite été ajustée par dilution entre 100 et 200 ng/µl.

III. SEQUENCAGE DU GENE *PDGFRB*

La recherche de mutations du gène *PDGFRB* a été réalisée après amplification par PCR en séquençant l'intégralité de la séquence codante correspondant aux exons 2 à 23 ainsi que les régions introniques en amont et en aval des exons sur au moins 50 pb.

III 1. Modélisation des amorces de PCR-séquençage

La grande majorité des amorces de PCR pour le séquençage du gène *PDGFRB* a été modélisée par Cyrille POTTIER (Inserm U1079, Rouen). Toutefois, afin de répondre aux exigences de qualité pour l'analyse des séquences, deux couples d'amorces ont été modélisés à nouveau. Les amorces de PCR-séquençage ont été choisies à l'aide du logiciel de modélisation informatique d'amorces de PCR Primer3 intput (version 0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/), en utilisant les paramètres par défaut du logiciel. Les amorces ont été commandées avec une purification de qualité désalée au laboratoire Eurogenetec. Les certificats d'analyse fournis à la livraison attestent de leur qualité.

Nous avons vérifié que chacun des couples d'amorces permettaient une amplification sélective d'une unique région du génome humain en réalisant une PCR *in silico* à l'aide du logiciel @BIOTEC In Silico PCR (http://www4a.biotec.or.th/cgi-bin/webPcr). Nous avons également vérifié qu'aucun des sites de reconnaissance des amorces ne contenait de SNP décrit dans les bases de données.

La séquence des amorces utilisées pour le PCR-séquençage du gène *PDGFRB*, leur localisation dans le gène et la taille des amplimères sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4. Séquence et localisation des amorces pour le séquençage du gène *PDGFRB*

Exon[a]	Amorce sens	Amorce antisens	Taille des produits de PCR (pb)
2	5' - GACGTGGTGGCTTTTGACTT - 3'	5' - GATCCACCAGACCGAGGATA - 3'	499
3	5' - GACCTGAGGGCTGTGCATAC - 3'	5' - GAACACACTCCCCGACTGAG - 3'	580
4	5' - GAGACAGAGGGCCAGAGATG - 3'	5' - CTGAGCATCAGGCCAGAAAG - 3'	398
4bis	5' - TATTCACGGCTCCACTCCTG - 3'	5' - GGCTGTGGTGAGAATCCACT - 3'	410
5 et 6	5' - TTTCCCTCTCTAGCCCCCTA - 3'	5' - CTCTGCACCCAGCAAAGTG - 3'	591
7	5' - GGCCCCAGCATCCATATTAG - 3'	5' - GCCTAGGTTTGTGGCTGAAA - 3'	480
8	5' - CCTGTGGGTGAGGATTTACG - 3'	5' - GACAGTGCAGGAAGGGAGAG - 3'	364
9	5' - GAACCCATCGGTTTTCACAC - 3'	5' - CTATGCCCGGAACAATATGC - 3'	394
10	5' - TGACCAGTAGAGGGAGCACA - 3'	5' - TTCACAATGCTCCTGTTTGC - 3'	500
11	5' - CCTAGAGCGAGATGCTGAGG - 3'	5' - CACAAGTCCCCACCTGAGTT - 3'	394
12	5' - ATATGCCCCTGCCCCTCT - 3'	5' - CTGGGACCAGACCTCAGAGA - 3'	333
13	5' - AGTGGCTCTTTCCCCTCACT - 3'	5' - CCCAAACCAGACCCAGACT - 3'	397
14	5' - CCTGGGTCTTGCAGCACA - 3'	5' - TAAACCCCACCGCCCTCT - 3'	389
15	5' - ACCACAGAGGCAGGAAAAGA - 3'	5' - GACAAAAGGAGGGGAAGGAG - 3'	393
16	5' - TGGGATAGACTGAAGGAAGATGA - 3'	5' - CATCTATGAAATGGGCACGA - 3'	400
17	5' - AAGCAGGAGAACTTTGAGTTTGA - 3'	5' - ACTGCCCATGTGCGAGAG - 3'	399
18	5' - ATCCTCCAAGAGCACACCAG - 3'	5' - AGCCCCACACAGATTTCCTA - 3'	361
19	5' - ATGGACATGGGAACTGTGCT - 3'	5' - TATCAGGGCTCGTCCCATAG - 3'	375
20	5' - AGCATGGCTCTCCTTGTCCT - 3'	5' - TGGTTTAAGCCAGTAGAGTTGGA - 3'	264
21	5' - ATACACCCAGCCACCACTTC - 3'	5' - AAAGGGTGGTCCCCTAAATG - 3'	352
22	5' - GCAGCGGGGGTCTTATTTAT - 3'	5' - CTTACCCTACGTAACTTACCTCTGA - 3'	472
23	5' - GCAGGCCTTGCATAGTTTTC - 3'	5' - CACAACACGTCAGGAGCAGA - 3'	483

[a] Les nombres correspondent aux numéros des exons.

III 2. Amplification du gène *PDGFRB*

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 1 µl de chaque amorce à 10mM, 200 µM de dNTP(s), 2 mM de $MgCl_2$, 1,5 U de *Taq DNA* Polymérase (ThermoPrime *Taq* DNA polymerase, Thermo Scientific, ABgene®) et 200 ng d'ADN génomique. Pour l'exon 14 riche en GC, la réaction de PCR a nécessité l'ajout de 10% de DMSO. La réaction a été incubée dans un thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) selon les conditions suivantes : après 3 minutes de dénaturation à 94°C, la PCR a consisté en 9 cycles de 15 secondes à 94°C, 20 secondes à 65°C (avec une diminution de 1°C par cycle), 30 secondes à 72°C, puis 25 cycles de 15 secondes à 94°C, 20 secondes à 55°C, 40 secondes à 72°C et une extension finale de 5 minutes à 72°C.

Après purification des produits de PCR sur plaque Multiscreen® PCRµ96 Filter Plate, 5 µl de produit de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 2% pour chaque amplification. Cela a permis après migration par électrophorèse de s'assurer de l'efficacité de la PCR, de la bonne taille des produits amplifiés et de la spécificité des amplifications.

III 3. Réaction de séquence

Les réactions de séquences ont été effectuées par la méthode de Sanger utilisant des didésoxynucléotides fluorescents suivies d'une nouvelle purification par centrifugation en gel de polymère. Enfin, ces produits ont été analysés sur le séquenceur Applied Biosystem® 3130*xl* Genetic Analyzer.

III 4. Lecture des séquences

Les séquences obtenues par le séquenceur ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel de lecture de séquence Variant Reporter™ en comparaison avec la séquence du transcrit de référence NM_002609.3 comprenant 23 exons et 1106 acides aminés (GRCh37, hg19). Les séquences ne répondant pas aux exigences de qualité ou ne pouvant être lues que dans un seul sens, mais aussi toutes variations de signification inconnue ou mutations ont été imprimées, annotées et relues manuellement.

III 4.1. Exigence de qualité des séquences avant passage sur Variant Reporter™

Une première analyse de la qualité des séquences obtenues après migration sur le séquenceur Applied Biosystem® 3130*xl* Genetic Analyzer est réalisée avec l'étude des données brutes fournies par le logiciel du séquenceur Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystem®).

Nous avons analysé l'intensité globale de la séquence visualisée par les données brutes collectées par le séquenceur automatique (Raw data) afin de s'assurer que les séquences étaient d'une intensité suffisante pour permettre l'interprétation et que le signal restait homogène et ne décroissait pas au cours de la migration. De plus, le signal devait présenter un démarrage et un arrêt net et ne devait pas présenter d'artéfacts liés à un défaut d'incorporation des ddNTPs (ou blobs) gênant la lecture des séquences. Enfin, la ligne de base des quatre fluorophores devait être à zéro. Nous avons aussi étudié les électrophorégrammes fournis par le logiciel Sequencing Analysis 5.3.1 (Applied Biosystem®) nous permettant d'éliminer les séquences ayant un bruit de fond trop intense par rapport à la séquence d'intérêt. Si les Raw data ou les électrophorégrammes évoquaient une séquence de mauvaise qualité alors celle-ci n'était pas importée dans le logiciel Variant Reporter™.

III 4.2. Analyse des séquences par le logiciel Variant Reporter™

Les séquences présélectionnées sont ensuite importées dans le logiciel de lecture de séquence Variant Reporter™. Dans un premier temps, le logiciel réalise une comparaison de ces séquences par rapport à une séquence de référence prédéfinie par l'utilisateur. Après vérification de l'allocation exacte des séquences par le logiciel et élimination des séquences de qualité insuffisante, le logiciel compare les résultats obtenus chez un individu pour un même amplimère dans les deux sens de lecture afin de détecter la présence ou l'absence de variations nucléotidiques. Les différentes variations nucléotidiques détectées par le logiciel sont enfin annotées et comparées à une liste de variations génomique connue également définie par l'utilisateur. Nous avons ainsi référencé dans Variant Reporter™ toutes les SNP présents chez plus de 1% des individus d'origine caucasienne et décrits dans la base de données dbSNP (version 135), regroupant notamment les données de HapMap (International HapMap Consortium. 2005) [88] du *1000 Genomes Project* [89] et de l'Exome Sequencing Project (http://evs.gs.washington.edu/EVS/).

Les filtres utilisés pour l'analyse de la qualité des séquences et les seuils de détection des mutations du logiciel Variant Reporter™ sont les mêmes que ceux utilisés en routine au

titre du diagnostic moléculaire dans le laboratoire de Génétique Moléculaire du CHU de Rouen.

Concernant les filtres de qualité imposés au logiciel pour l'acceptation et l'analyse des séquences, nous avons défini que la valeur de Trace Score (paramètre correspondant à la moyenne des valeurs de qualité allouée par le logiciel pour l'identification de chacune des bases de la séquence analysée) devait être supérieure à 30. La taille de la séquence allouée et lue par le logiciel par rapport à la taille de la séquence théoriquement obtenue par PCR représentée par la valeur du TRL% devait être supérieure à 50%. La valeur de *Peak under Peak* (PUP score), représentant le ratio entre l'intensité de fluorescence du bruit de fond par rapport à l'intensité de la séquence d'intérêt, devait être inférieure à 4%. Enfin, la taille minimale de séquence allouée et lue devait être supérieure à 50 pb. Concernant les paramètres de détection des mutations, le seuil minimal de base mixée pour la détection de variation nucléotidique hétérozygote était de 15%.

Nous avons vérifié l'allocation exacte des séquences et que la couverture de l'analyse par le logiciel était suffisante. En effet, la lecture des séquences par Variant Reporter™ devait être réalisée pour chaque amplimère sur la totalité de la séquence codante et les 50 pb en amont et en aval des sites canoniques d'épissage. Toute séquence insuffisamment couverte était relue manuellement. Enfin, nous avons également relu chacune des variations détectées par le logiciel afin d'éliminer les faux-positifs liés à des artéfacts de séquence.

III 5. Analyse des variations

Dans l'optique d'une recherche de facteurs Mendéliens de prédisposition au dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand et en raison de la rareté de ce type de cancer, nous n'avons pas considéré les SNP ne modifiant pas la séquence protéique, ni l'épissage selon les prédictions bioinformatiques et étant décrits dans les bases de données avec une fréquence de l'allèle mineur supérieure ou égale à 1% chez les individus d'origine caucasienne.

L'analyse des nouvelles variations retrouvées a été réalisée à l'aide de l'interface Alamut (Interactive Biosoftware©) qui réalise l'annotation des variations et fournit des liens vers différents logiciels ou sites internet permettant l'analyse bioinformatique de l'effet de ces variations. Les variations nucléotidiques retrouvées ont ainsi été annotées selon les dernières recommandations pour la nomenclature de l'HGVS 2.0. Nous avons également testé, avec l'aide de l'interface Alamut (version 2.2), l'effet éventuel de ces variations sur la protéine en utilisant les logiciels Align GVGD, PolyPhen2, SIFT Aligned Sequences et

MutationTaster. L'analyse des variations faux-sens a été complétée par une étude plus approfondie des acides aminés modifiés en fonction de leur contexte protéique à l'aide de la base de données Uniprot (http://www.uniprot.org/). Nous avons ainsi vérifié si les acides aminés modifiés n'étaient pas situés dans une structure secondaire conservée, un motif protéique ou un domaine fonctionnel important de la protéine. Enfin, nous avons recherché si les éventuelles variations faux-sens retrouvées ne changeaient pas un acide aminé portant une modification post traductionnelle qui pourrait modifier l'activité ou la structure de la protéine.

Nous avons systématiquement recherché un éventuel effet sur l'épissage pour toutes nouvelles variations du gène *PDGFRB* modifiant ou non la séquence protéique. Cette analyse a été réalisée à l'aide de l'interface logiciel Alamut (Interactive Biosoftware) résumant les prédictions des logiciels SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer et Human Splicing Finder. Une variation était considérée comme suspecte d'avoir un effet sur l'épissage lorsque au moins deux logiciels sur les cinq retrouvaient soit une modification d'un site accepteur ou donneur d'épissage déjà décrit, soit la création d'un site cryptique d'épissage.

Enfin, nous avons recherché dans les bases de données si les variations retrouvées étaient déjà décrites et à quelle fréquence dans les différentes populations. Nous avons également réalisé une étude de la littérature pour chacune des variations.

IV. QMPSF DES GENES *PDGFRB* ET *PDGFB*

IV 1. Principe de la QMPSF

De manière à dépister d'éventuels remaniements de grande taille intéressant les gènes *PDGFB* ou *PDGFRB,* nous avons modélisé une PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents (QMPSF, *Quantitative Multiplex of Short Fluorescent fragments*). Cette technique de QMPSF a été développée dans le laboratoire de Génétique moléculaire du CHU de Rouen et a depuis été largement diffusée de part le monde au titre de la recherche ou du diagnostic. Elle permet une détection simple et rapide de remaniements génomiques hétérozygotes à type de délétions ou duplications à l'échelle d'un gène entier ou même d'un unique exon.

Le principe de la QMPSF consiste en une PCR multiplex de plusieurs fragments d'ADN génomique de courte taille, générés pour une ou plusieurs régions issues d'un ou de

plusieurs gènes cibles grâce à deux amorces dont l'une est marquée par un fluorochrome. Les amorces possèdent également à leur extrémité 5' une queue de 10 nucléotides choisis de manière à ce qu'ils aient le moins de chance possible d'être complémentaires d'une région du génome humain. L'ajout de ces queues de nucléotides permet aux amorces d'avoir une spécificité accrue et d'obtenir une efficacité d'amplification de ces différents couples d'amorces qui soit la plus proche possible. Les amorces sont choisies en fonction des différentes contraintes liées à la séquence génomique d'intérêt et de manière à avoir des Tm similaires pour l'ensemble des amorces. De plus, les fragments d'ADN générés doivent être de petite taille (<500 pb) et doivent différer en taille d'au moins 20 pb afin d'être bien différenciables lors de la migration sur le séquenceur. La PCR est réalisée avec un nombre de cycles limité, habituellement d'environ 25 cycles, ce qui situe la réaction dans la phase exponentielle et quantitative de la PCR. En plus des amplimères du ou des gènes à étudier, sont amplifiés simultanément dans le même tube un ou deux amplimères témoin qui permettront de fournir un étalon pour comparer les électrophorégrammes et de s'assurer de l'aspect semi-quantitatif de la technique. Après amplification, les produits de PCR multiplex sont séparés en fonction de leur taille lors de la migration sur un séquenceur automatique à capillaire.

IV 2. Modélisation des amorces de QMPSF

Le choix des amorces de QMPSF a été réalisé selon les recommandations issues des articles de Charbonnier *et al.*, 2000 [90] et Saugier-Veber *et al.*, 2006 [91], mais aussi selon le mode opératoire du laboratoire de Génétique Moléculaire de Rouen, décrivant la modélisation de nouvelles QMPSF à visée diagnostique.

IV 2.1. Travail bioinformatique préalable à la modélisation des amorces

Pour la modélisation de chaque couple d'amorce, nous avons sélectionné sur le site internet SNPper (http://snpper.chip.org/) chaque séquence du gène d'intérêt avec les annotations des SNP issus de dbSNP et HapMap et sauvegardé ces séquences sur informatique. Puis, nous avons vérifié que ces séquences sélectionnées n'étaient pas présentes en de multiples copies sur le génome humain en utilisant l'application BLAST sur le site internet du NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Si la séquence n'était pas présente en

une copie unique, alors cette séquence n'était pas utilisée et une autre région du gène d'intérêt était sélectionnée. Nous avons ensuite recherché et masqué les éventuelles séquences répétées dans les séquences d'intérêt ayant passé le BLAST avec succès à l'aide du programme RepeatMasker (http://www.repeatmasker.org/).

IV 2.2. Modélisation des amorces de PCR multiplex

Après ces différentes manipulations informatiques des séquences des gènes d'intérêt, nous avons modélisé les amorces grâce au logiciel Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft) en utilisant les paramètres par défaut du logiciel. Parmi la liste de couples d'amorce proposés par le logiciel, nous avons sélectionné les couples d'amorces combinant les meilleurs scores de qualité (rating score), avec une taille entre 15 et 25 nucléotides et dont le Tm était compris entre 58 et 62°C. De plus, les amorces ne devaient pouvoir se lier que sur un unique site de la séquence d'intérêt. En effet, si l'amorce se liait autre part que sur son site cible dans la séquence d'intérêt (false-priming), alors l'amplification correspondant à ce couple d'amorces perdrait en efficacité et en spécificité avec le risque de créer des amplifications avec une taille différente de la taille attendue [92]. Ces amplifications parasites créeraient des pics supplémentaires sur l'électrophorégramme qui pourraient s'ajouter aux autres pics et fausser l'analyse de la QMPSF. Nous avons ensuite vérifié que les sites de reconnaissance des amorces ne contenaient pas de SNP qui pourrait altérer la fixation de l'amorce. Enfin, nous avons réalisé une PCR *in silico* à l'aide du logiciel @BIOTEC In Silico PCR (http://www4a.biotec.or.th/cgi-bin/webPcr).

Après avoir passé tous ces filtres, nous nous sommes assurés que les éventuelles hybridations intra-amorces (*annealing*) et inter-amorces (dimères de primers et cross dimères) n'étaient pas incompatibles avec un multiplexage lors de la réaction de PCR. Pour cela, nous avons mesuré à l'aide du logiciel Primer Premier 5.0 l'enthalpie de la PCR multiplex, soit l'énergie nécessaire pour que se réalise la réaction chimique. Afin d'éviter que ces hybridations parasites des amorces n'empêchent le déroulement de la PCR multiplex, nous n'avons considéré que les combinaisons d'amorces présentant une enthalpie ΔG inférieure à -14 kcals/mol.

IV 2.3. Amplimères témoins

Nous avons adjoint à la QMPSF un couple d'amorces ciblant le gène *HMBS* et un couple d'amorces ciblant le gène *MECP2*. Ces deux gènes présentent l'intérêt d'être rarement mutés et d'être responsables en cas d'altération constitutionnelle de maladie génétiques caractérisées par un phénotype caractéristique et ne correspondant pas à la pathologie que nous étudions. En effet, les mutations du gène *HMBS* sont retrouvées lors de porphyrie aiguë intermittente (MIM #176000), tandis que les mutations du gène *MECP2* sont responsables du syndrome de Rett (MIM #312750).

Le couple d'amorces amplifiant l'exon 14 du gène *HMBS*, localisé en 11q23.3, est fréquemment choisi lors des modélisations de nouvelles QMPSF car présentant très peu d'homologie avec le restant du génome humain. Cet amplimère permet d'obtenir une amplification correspondant à deux copies du gène et qui servira d'étalon pour superposer et comparer les pics des électrophorégrammes de différents individus.

L'amplimère correspondant à l'exon 4 du gène *MECP2* localisé en Xq28 nous permet de s'assurer de l'aspect semi-quantitatif de la manipulation. En effet, ce gène étant situé sur le chromosome X, nous observons pour l'amplimère correspondant, une ou deux copies de l'exon 4 de *MECP2* sur l'électrophorégramme selon que le patient étudié est respectivement de sexe masculin ou féminin.

Les amorces de QMPSF ont été commandées au laboratoire Eurogenetec. Les amorces sens étaient marquées par fluorophore 6-FAM et étaient purifiées en qualité HPLC-RP, tandis que les amorces *reverse* étaient commandées en qualité de purification RP-Cartridge. Les certificats d'analyse fournis à la livraison attestent de leur qualité. La séquence des amorces utilisées pour la QMPSF des gènes *PDGFRB et PDGFB*, ainsi que les amorces utilisées pour les deux amplifications témoins sont présentées dans le tableau 5 avec leur localisation dans les gènes et la taille des amplimères.

Tableau 5. Séquence et localisation des amorces utilisées pour la QMPSF des gènes *PDGFRB* et *PDGFB*

Gène	Localisation dans le gène	Amorce sens		Taille du fragment de QMPSF (pb)
PDGFB	Intron 1	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-CAGTGATTGCCGTGGTTGC - 3'[a]	182
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-CCCTTCTTTATTGCTCTTGGGAC - 3'	
PDGFB	Exon 1	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-ATCGACTGCCGTGTTCCTTT - 3'[a]	286
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-GGCGATCAGGCGCTCA - 3'	
PDGFB	Exon 2	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-GTTGAGGGTGCAGGGACTGA - 3'[a]	299
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-AGGAGCGGATCGAGTGGTC - 3'	
PDGFB	Exon 6	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-AAGGGCAAGCACCGGAAAT - 3'[a]	242
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-ACAGGGAGGACCAAGGCTCA - 3'	
PDGFRB	Exon 3	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-CCAACCTCACTGGGCTAGACAC - 3'[a]	130
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-GCCCTTACCTGGCACAAAGAT - 3'	
PDGFRB	Exons 17 et 18	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-CCAATGGCATGGAGTTTCTG - 3'[a]	256
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-CTGTGGACGCACTGGGTTT - 3'	
MECP2	Exon 4	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-TTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGAT - 3'[a]	155
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-GGGCTTCTTAGGTGGTTTCTG - 3'	
HMBS	Exon 14	Amorce sens	5' - CGTTAGATAG-TAGACGGCTCAGATAGCATACAAG - 3'[a]	208
		Amorce antisens	5' - GATAGGGTTA-ATGCCTACCAACTGTGGGTCA - 3'	

[a] Amorce marquée avec le fluorophore 6-FAM.

IV 3. Amplification

La concentration des différents couples d'amorces de PCR multiplex a été ajustée de manière à obtenir sur l'electrophorégramme des pics présentant des intensités suffisamment importantes pour être analysées, mais aussi avec des intensités similaires afin d'obtenir un profil de QMPSF qui soit plus aisé d'interprétation.

Les réactions de PCR multiplex semi-quantitatives ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant 0,8 à 1,3 µl de chaque amorce à 10mM, 200 µM de dNTP(s), 1,5 mM de $MgCl_2$, 10% de DMSO, 1,5 U de *Taq DNA* Polymérase (ThermoPrime *Taq* DNA polymerase, Thermo Scientific, ABgene®) et 100 ng d'ADN génomique. La réaction a été incubée dans un thermocycler PTC-100® Thermal Cycler, bloc or (Bior-Rad®) selon les conditions suivantes : après 5 minutes de dénaturation à 94°C, la QMPSF a consisté en 25 cycles de 10 secondes à 94°C, 15 secondes à 50°C, 15 secondes à 72°C, puis une extension finale de 15 minutes à 72°C.

Après purification sur colonne de silice QUIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen), 1 µl de produit de PCR dilué dans 9 µl de formamide est passé sur séquenceur Applied Biosystem® 3130*xl* Genetic Analyzer, en utilisant la fonction d'analyse de fragments.

Afin de s'assurer que les 25 cycles PCR situaient bien la QMPSF dans la phase exponentielle et quantitative de la PCR, nous avons réalisé deux autres QMPSF dans les mêmes conditions précédemment décrites, mais en changeant le nombre de cycle de PCR. La première QMPSF était ainsi réalisée avec un cycle de moins (24 cycles) et la seconde QMSF en comptait un de plus (26 cycles). Nous avons ensuite regardé si les trois QMPSF permettaient une analyse semi-quantitative. Si l'une de ces QMPSF ne présentait pas un aspect semi-quantitatif, alors nous modifions le nombre de cycle de PCR.

V 4. Analyse des résultats

L'analyse des résultats de QMPSF est basée sur la comparaison de la hauteur du même pic avec l'échantillon de notre témoin après superposition informatique des chromatogrammes à l'aide du logiciel GeneMapper®. Cette dernière étape permet de s'affranchir des différences d'efficacité de chaque amplification, inéluctables malgré le choix d'amplimères courts et d'amorces de Tm voisin. Afin de ne pas comparer des prélèvements présentant une trop grande différence d'intensité, nous avons migré à nouveau les produits

de QMPSF ayant une intensité 2 fois moindre ou supérieure par rapport au résultat du témoin.

Nous avons également comparé les aires sous la courbe de chacun des pics afin de pouvoir analyser des données chiffrées, comme cela est réalisé dans le cadre d'autres techniques semi-quantitatives que sont la MLPA [93] et la QMPSU [94]. Pour cela, nous avons calculé pour chaque amplimère le rapport R en pourcentage des aires sous la courbe étalonnées par rapport à la valeur de l'aire sous la courbe de *HMBS* du témoin. Nous avons utilisé la formule suivante :

$$Rn\,\% = \frac{\dfrac{ASCn \text{ du patient}}{ASCn \text{ du témoin}}}{\dfrac{ASC_{HMBS} \text{ du patient}}{ASC_{HMBS} \text{ du témoin}}} \times 100$$

Rn% : Rapport R en pourcentage pour un amplimère donné n

ASCn : Aire sous la courbe de l'amplimère n

ASC_{HMBS} : Aire sous la courbe de l'amplimère *HMBS*

Nous avons vérifié sur les électrophorégrammes la présence des huit pics correspondant aux huit amplimères d'intérêt. Nous avons également vérifié que les tailles de ces amplimères correspondaient bien aux tailles attendues. Enfin, les intensités de fluorescence des pics devaient être compatibles avec l'interprétation avec un seuil minimal empirique utilisé au laboratoire de 100 unités de fluorescence. Nous avons ensuite vérifié l'aspect semi-quantitatif de la QMPSF en comparant les intensités des pics de l'amplimère correspondant à l'exon 4 du gène *MECP2* situé sur le chromosome X, en dehors des régions pseudo-autosomiques. Un sujet de sexe masculin ne possède donc qu'une seule copie du gène *MECP2* et devrait alors présenter un pic sur l'électrophorégramme pour l'amplimère *MECP2* qui serait deux fois moins important qu'un sujet de sexe féminin possédant deux copies du gène. Cela signifie également que le rapport pour l'amplimère *MECP2* (R_{MECP2}%) entre un patient de sexe féminin et le témoin également de sexe féminin doit être égal à 100% +/- 10. Par contre, lorsqu'on compare un patient de sexe masculin au témoin alors le rapport attendu R_{MECP2}% = 50% +/- 10. L'amplimère de l'exon 4 du gène *MECP2* constitue ainsi un témoin interne de l'aspect semi-quantitatif de la QMPSF.

La QMPSF a été réalisée trois fois pour les huit individus testés et le témoin, puis nous avons analysé les moyennes des rapports Rn% de chaque amplimère. Nous avons considéré qu'un patient ne présentait pas de remaniement de grande taille détectable pour un gène testé, lorsque tous les amplimères de ce gène présentaient une intensité sur l'électrophorégramme similaire à celle des amplimères correspondant chez le témoin. Selon notre formule, nous avons considéré qu'un correspondait à un rapport R% = 100% +/- 10 pour chaque pic. Si le rapport Rn% = 0, cela signait alors une délétion homozygote de la région correspondante, soit 0 copie de la région cible. Si Rn% = 50% +/- 10, cela signait alors une délétion hétérozygote, soit une copie de la région cible. Si Rn% = 150% +/- 10, cela signait alors une duplication, soit trois copies de la région cible. Si Rn% = 200% +/- 10, cela signait alors une triplication, soit quatre copies de la région cible. Si un ou plusieurs amplimères présentaient un rapport Rn% en dehors des intervalles de confiance précédemment décrites, la QMPSF n'était pas analysée et réalisée à nouveau.

RESULTATS

I. RESULTAT DU SEQUENCAGE DU GENE *PDGFRB*

La recherche de mutations constitutionnelles chez les huit patients et le témoin a été effectuée par séquençage double brin de l'intégralité de la partie codante du gène *PDGFRB* (exon 2 à 23). Cette étude a ainsi nécessité près de 400 réactions de séquence.

I 1. Qualité des séquences

Les séquences obtenues pour le gène *PDGFRB* respectaient les critères de qualité précédemment définis pour 369 des 396 séquences réalisées.

Les séquences correspondant aux exons 4, 21 et 22 ont dû être imprimées et relues manuellement car ne pouvant être lues que dans un seul sens par le logiciel Variant Reporter™ en raison d'un bruit de fond trop important. En effet, il existe pour les amplimères 4 et 22 des régions répétées respectivement en amont et en aval de l'exon probablement responsables d'un dérapage de la Taq polymérase ou d'hybridations parasites de l'une des amorces. Cette lecture sur un seul brin d'ADN de l'amplimère 4 a également nécessité une nouvelle modélisation des amorces avec l'ajout d'un nouveau couple d'amorce "4bis" afin de couvrir l'ensemble de la séquence codante et les 50 pb en amont et en aval de l'exon 4.

I 2. Recherche de variations génomiques

Le séquençage du gène *PDGFRB* n'a pas permis de retrouver de mutation délétère du gène. Nous avons retrouvé une variation de signification inconnue silencieuse c.3138-78C>T, p.?, située dans l'intron 22 du gène *PDGFRB* chez le patient 7. Cette variation n'est décrite dans aucune base de données, ni dans la littérature. Cependant, l'absence d'effet sur la protéine et l'absence d'effet sur l'épissage selon les prédictions bioinformatiques est en défaveur d'une éventuelle pathogénicité de cette variation. Nous

avons également retrouvé deux SNP non synonymes à l'état hétérozygote : c.1033C>T, p.Pro345Ser, situé dans l'exon 7 chez le patient 2 et c.1453G>A, p.Glu485Lys, situé dans l'exon 10 chez le patient 7. La variation c.1033C>T touche un nucléotide faiblement conservé au cours de l'évolution phylogénique. Cette variation modifie un acide aminé moyennement conservé et situé dans le quatrième domaine protéique immunoglobulin-like type C2, avec un écart physico-chimique entre Proline et Sérine important (Distance de Grantham : 74 [0-215]). L'ensemble des prédictions bioinformatiques de l'effet de cette variation sur la protéine et sur l'épissage ne sont pas en faveur d'un effet délétère. De plus, cette variation a été rapportée avec une fréquence de 1,09% chez les Caucasiens et référencée dans la base de données dbSNP sous le numéro rs2229558.

La variation c.1453G>A touche un nucléotide faiblement conservé au cours de l'évolution phylogénique. Cette variation modifie un acide aminé très conservé et situé dans le cinquième domaine protéique immunoglobulin-like type C2, avec un écart physico-chimique entre Glutamate et Lysine peu important (Distance de Grantham : 56 [0-215]). Les prédictions bioinformatiques de l'effet de cette variation sur la protéine sont discordantes, tandis que les prédictions bioinformatiques sur l'épissage ne sont pas en faveur d'un effet délétère. De plus, cette variation a été rapportée avec une fréquence de 2,6% chez les Caucasiens et référencée dans la base de données dbSNP sous le numéro rs41287110.

L'analyse de ces deux SNP n'est donc pas en faveur d'un effet délétère de ces deux variations. De plus, la fréquence des individus hétérozygotes pour ces deux SNP dans la population générale, bien que faible, est trop importante pour expliquer la survenue des dermatofibrosarcomes et des autres cancers chez les patients étudiés et leurs familles.

Les différentes variations non synonymes ou de signification inconnue du gène *PDGFRB* ainsi que leur analyse bioinformatique sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6. Liste des variations nucléotidique analysées du gène *PDGFRB*

Variation nucléotidique du gène *PDGFRB*	Localisation dans le gène	Effet prédit sur la protéine	Effet prédit sur l'épissage	MAF (%)	Fréquence allélique chez les patients
c.1033C>T, p.Pro345Ser	Exon 7	bénin	pas d'effet	1,09	1 sur 16
c.1453G>A, p.Glu485Lys	Exon 10	prédictions contradictoires	pas d'effet	2,6	1 sur 16
c.3138-78C>T, p.?	Intron 22	pas d'effet	pas d'effet	ND	1 sur 16

ND : Non décrit

II. RESULTAT DE LA QMPSF DES GENES *PDGFRB* ET *PDGFB*

II 1. Choix des régions génomiques d'intérêt

Dans l'hypothèse d'une amplification génique, le gène *PDGFB* ou *PDGFRB* serait entièrement dupliqué et fonctionnel et aboutirait à une hyperexpression de l'une des deux protéines et à l'hyperstimulation de la voie du PDGFB. C'est pourquoi, afin de détecter une éventuelle amplification génique, nous avons choisi d'analyser une région génomique en début et une région génomique en fin de ces deux gènes. De plus, nous avons choisi nos amorces de manière à cibler dans leur totalité ou au moins en partie des exons portant la séquence codante. Nous avons donc modélisé un couple d'amorce ciblant l'exon 3 du gène *PDGFRB* codant pour le premier domaine immunoglobulin-like de type C2 du récepteur, localisé dans la région extracellulaire du récepteur. Nous avons également choisi un couple d'amorce ciblant les exons 17 et 18 codant une partie de la région tyrosine kinase, localisée dans la région intracellulaire de la protéine. Pour le gène *PDGFB*, nous avons choisi deux couples d'amorce ciblant les exons 1 et 6 du gène et qui sont respectivement le premier et le dernier exon du gène portant la séquence codant pour la protéine PDGFB.

Nous avons également choisi le couple d'amorce de l'exon 1 du gène *PDGFB* de manière à pouvoir rechercher un éventuel réarrangement de grande taille impliquant la région 5'UTR du gène. Le couple d'amorce a donc été choisi afin de cibler plusieurs régions régulatrices situées entre les nucléotides -118 à -153 et -241 à -269 en amont du site d'initiation de la traduction et décrites pour inhiber la traduction des ARNm [68].

Les différentes régions d'intérêt ciblées par la QMPSF pour les deux gènes testés sont représentées sur la figure 6.

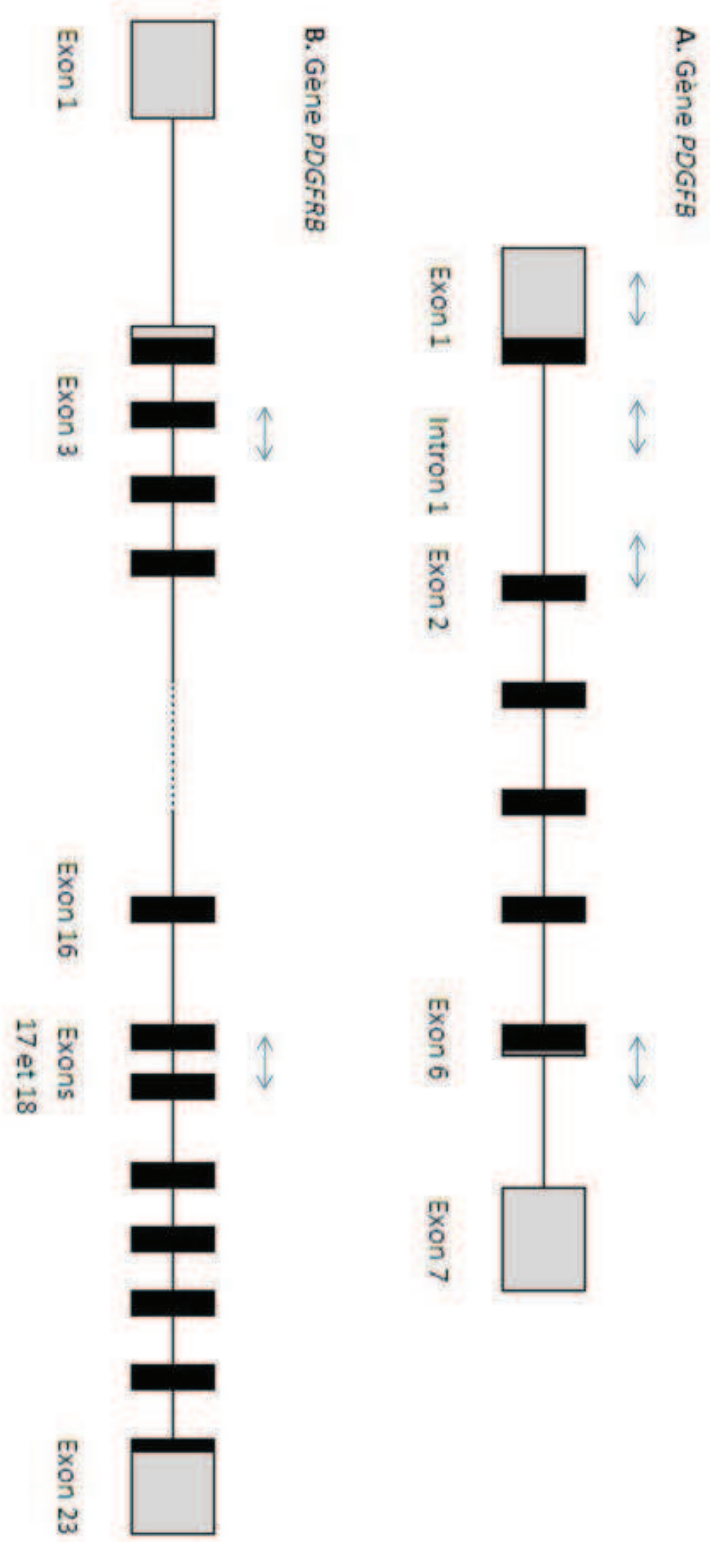


Figure 6. Régions d'intérêt ciblées par la QMPSF

Représentation schématique des gènes *PDGFB* et *PDGFRB*. Les rectangles représentent les exons avec en noir les séquences codantes et en gris les régions 5' et 3'UTR. Les introns sont représentés par les lignes horizontales entre les exons. Les régions des deux gènes amplifiées par QMPSF sont représentées par les doubles flèches bleues.

II 2. Qualité de la QMPSF

Les QMPSF réalisées avec 24 et 26 cycles permettaient une analyse semi-quantitative (données non présentées). Nous pouvons ainsi valider les 25 cycles PCR utilisés pour les autres QMPSF situant bien la technique dans la phase exponentielle et quantitative de la PCR. L'étude du profil sur l'électrophorégramme de la QMPSF permet d'observer huit pics correspondant aux huit fragments fluorescents. Les pics sont aux tailles attendues et bien séparés les uns des autres. De plus, nous n'observons pas de pics parasites ce qui nous permet de considérer les amplifications comme étant spécifiques. Enfin, les intensités de fluorescence sont suffisantes pour permettre la lecture des pics sur l'électrophorégramme et ne pas être gêné par le bruit de fond.

L'aspect semi-quantitatif de la QMPSF est confirmé par la superposition des électrophorégrammes et la mesure des rapports des aires sous la courbe du pic correspondant à l'amplimère du gène *MECP2*. Le rapport moyen R_{MECP2}% est ainsi compris entre 48,86 et 54,31% pour les trois sujets de sexe masculin et entre 96,36 et 105,28% pour les cinq sujets de sexe féminin. Le profil sur l'électrophorégramme de la QMPSF des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* ainsi que l'aspect semi-quantitatif de la QMPSF sont illustrés sur la figure 7 avec la superposition à l'aide du logiciel Variant Reporter™ des électrophorégrammes du témoin et du patient 2. Nous observons que les différents amplimères présentent la même hauteur de pic entre le patient et le témoin hormis pour le pic correspondant à l'exon 4 du gène *MECP2.* En effet, nous visualisons un profil de QMPSF avec une seule copie du gène *MECP2* pour le patient 2, de sexe masculin, contre deux copies du gène pour le témoin, de sexe féminin.

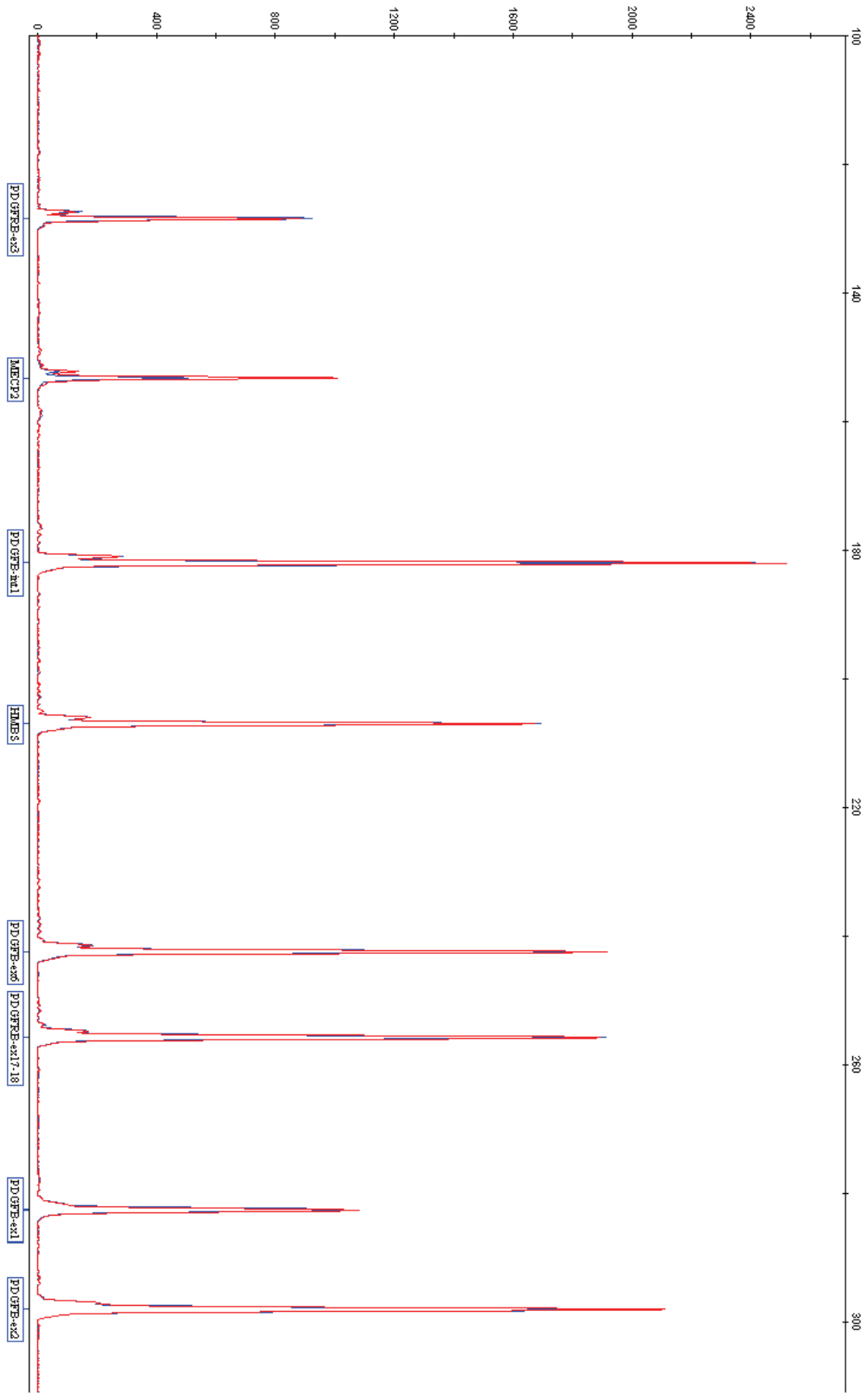


Figure 7. Profil de la QMPSF des gènes *PDGFB* et *PDGFRB*

L'axe des abscisses représente la taille en pb des fragments fluorescents, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unités de fluorescence. Le témoin est représenté par le tracé rouge et le patient 2 par le tracé bleu.

II 3. Recherche de réarrangements de grande taille

Nous avons retrouvé chez les huit patients et pour tous les amplimères testés une intensité sur l'électrophorégramme similaire à celle des amplimères correspondant chez le témoin. Les moyennes des rapports Rn% des amplimères des gènes *PDGFB* et *PDGDFRB* étaient toutes comprises entre 90 et 110% pour chaque pic. Nous n'avons par ailleurs pas retrouvé de discordance entre les trois QMPSF réalisées. La QMPSF des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* n'a donc pas permis de détecter de remaniement de grande taille pour aucun de ces deux gènes.

Les moyennes des rapports Rn% de chaque amplimère sont résumées dans le tableau 7. La figure 8 représente les rapports moyens de la QMPSF du patient 1 sous forme d'histogramme.

Tableau 7. Rapports d'aires sous la courbe des amplimères de la QMPSF

Amplimère		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Gène	Région ciblée	masculin	masculin	féminin	féminin
MECP2	Exon 4	50,85 +/- 1,79	48,86 +/- 2,70	96,36 +/- 3,48	101,63 +/- 4,22
PDGFB	Intron 1	100,83 +/- 3,98	105,64 +/- 6,42	109,40 +/- 2,77	107,25 +/- 5,39
	Exon 1	100,37 +/- 1,37	97,90 +/- 3,41	94,92 +/- 4,58	104,69 +/- 0,58
	Exon 2	101,12 +/- 4,75	98,38 +/- 4,42	97,99 +/- 3,94	101,24 +/- 1,89
	Exon 6	98,98 +/- 4,05	99,20 +/- 3,75	99,92 +/- 4,44	104,35 +/- 5,53
PDGFRB	Exon 3	97,97 +/- 3,10	97,04 +/- 2,76	94,49 +/- 2,46	96,67 +/- 3,39
	Exons 17 et 18	101,79 +/- 4,69	98,84 +/- 2,99	96,78 +/- 2,42	100,97 +/- 1,82

Amplimère		Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8
Gène	Région ciblée	féminin	masculin	féminin	féminin
MECP2	Exon 4	99,29 +/- 1,87	54,31 +/- 2,64	101,77 +/- 6,09	105,28 +/- 2,29
PDGFB	Intron 1	100,52 +/- 3,87	102,43 +/- 6,14	100,56 +/- 1,29	95,64 +/- 2,90
	Exon 1	105,66 +/- 1,54	99,42 +/- 4,00	106,07 +/- 2,84	106,49 +/- 2,60
	Exon 2	97,33 +/- 1,16	92,93 +/- 3,33	99,10 +/- 4,29	97,02 +/- 1,97
	Exon 6	102,58 +/- 4,59	99,09 +/- 7,19	102,44 +/- 2,93	101,52 +/- 3,60
PDGFRB	Exon 3	96,22 +/- 2,84	99,69 +/- 1,96	102,29 +/- 5,87	100,06 +/- 6,10
	Exons 17 et 18	100,63 +/- 3,13	96,87 +/- 1,82	99,87 +/- 2,39	100,52 +/- 1,94

Les moyennes des rapports d'aires sous la courbe Rn% des patients pour tous les amplimères sont exprimées en pourcentage +/- l'écart-type.

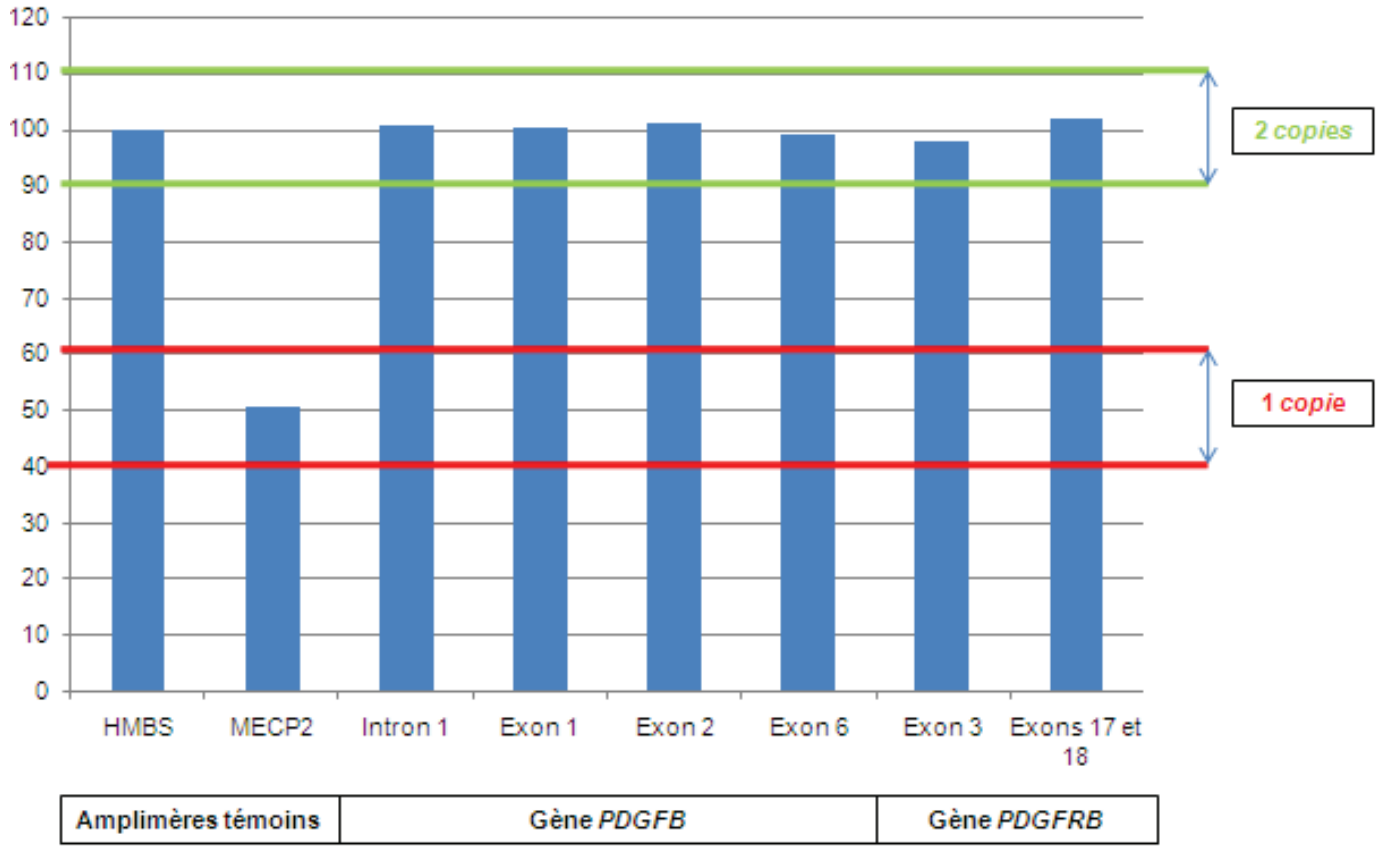


Figure 8. Histogramme représentant les rapports moyens de la QMPSF du patient 1
L'axe des ordonnées correspond à la valeur des rapports moyens en pourcentage. L'axe des abscisses correspond aux différents amplimères testés. Le patient 1, de sexe masculin, ne possède qu'une seule copie du gène *MECP2*, localisé sur le chromosome X.

DISCUSSION

Les différents syndromes Mendéliens prédisposant aux cancers représentent 5% de l'ensemble des cancers et la découverte des gènes impliqués dans ces syndromes a permis à de nombreuses familles affectées par ces cancers héréditaires d'accéder à un diagnostic moléculaire de leur affection, à une meilleure prise en charge médicale et à des mesures de prévention. La découverte de ces gènes a également permis de réaliser des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans la cancérogenèse et de permettre la mise en place de nouvelles thérapies ciblées contre le cancer comme l'imatinib dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques et des GIST. La recherche de nouveaux gènes responsables de cancers héréditaires et la mise au point des techniques de biologie moléculaires répondant aux exigences pour le diagnostic moléculaire, pourraient donc beaucoup apporter dans la prise en charge médicale de familles éprouvées par de multiples cancers. Cette caractérisation des bases moléculaires permet également un ciblage thérapeutique des thérapies ciblées.

Nous avons testé au cours de cette thèse d'exercice de la médecine l'implication des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* dans le déterminisme Mendélien d'un cancer cutané rare, le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand. Nous avons choisi d'étudier ces deux gènes en raison de leur implication dans certains types de cancers sporadiques et notamment du *PDGFB* impliqué dans plus de 95% des DFS [95]. De plus, ces deux proto-oncogènes pourraient être responsables de cancers pour lesquels une thérapie ciblée serait envisageable.

Les patients étudiés présentaient tous sauf le patient 5 un DFS et de nombreux antécédents personnels ou familiaux de cancer évocateur d'une susceptibilité génétique aux cancers. Le patient ne présentant pas un diagnostic certain de DFS a été classé comme atteint de fibrosarcome sans précision. Nous n'avons toutefois pas exclu ce patient en raison de ces antécédents personnels et familiaux de cancers, notamment de tumeurs cutanées chez sa mère et sa grand-mère maternelle. Les sept patients ayant présenté un DFS avéré ont été diagnostiqués assez jeunes, avec une moyenne de 28,6 ans et des âges extrêmes de 22 à 32 ans. Cela correspond à des âges de survenue assez jeunes dans la mesure où le DFS est en général diagnostiqué entre 30 et 50 ans [34, 40, 41]. Cependant, le DFS peut être diagnostiqué à toutes les périodes de la vie et les âges de survenue ne sont donc pas incompatibles avec ce qui est déjà décrit.

Nous observons également une récurrence de DFS dans deux familles différentes et à chaque fois chez deux apparentés liés au second degré. Cette récurrence est évocatrice d'un risque génétique se transmettant selon un mode Mendélien. En effet, l'incidence très faible de ces DFS (4,2 par million) rend très improbable la survenue de plusieurs tumeurs de ce type dans une même famille. De plus, l'une de ces apparentées a présenté un DFS durant l'enfance à l'âge de 10 ans. Les DFS de l'enfant peuvent avoir une histologie un peu différente des DFS de l'adultes, mais présentent de nombreuses similitudes immunohistochimiques et génétiques. Ils portent parfois le nom de fibroblastome à cellules géantes mais sont désormais considérés comme une variante pédiatrique du DFS [96]. Or, ces DFS pédiatriques constituent une entité encore bien plus rare, au point que le DFS a longtemps été considéré comme une maladie de l'adulte. A ce jour, moins de 200 cas ont été décrits dans la littérature [97]. Ainsi, les antécédents personnels et familiaux de DFS et d'autres cancers, le diagnostic précoce, parfois dans l'enfance des DFS et la rareté des DFS sont de sérieux arguments pour suspecter un déterminisme héréditaire aux cancers de type Mendélien dans les familles que nous avons étudiées.

Nous avons observé pour les patients testés une agrégation entre DFS et des leucémies, avec un patient ayant présenté un DFS et une leucémie et trois cas de leucémies dans l'ensemble des familles étudiées. Mais nous observons surtout une agrégation entre DFS et des cancers du sein de la femme jeune, avec trois cancers du sein avant 40 ans sur les cinq femmes testées et 15 cancers du sein rapportés dans l'ensemble des huit familles étudiées. Nous notons également une surreprésentation des femmes dans les patients étudiés (trois hommes et cinq femmes) alors que le sex-ratio des DFS est proche de l'égalité ou en faveur d'une survenue plus fréquente chez les hommes avec un sex-ratio de trois hommes pour deux femmes [34, 35]. Ces observations pourraient correspondre à un biais de recrutement des patients testés qui pourrait s'expliquer par la porte d'entrée diagnostique du LFS de ces patients. En effet, le LFS prédispose aux leucémies et aux cancers du sein. Le cancer du sein est aussi fréquent dans la population générale. De plus la pénétrance des mutations de *TP53* est plus importante chez les femmes (80% à 50 ans) que chez les hommes (40% à 50 ans), essentiellement en raison du sur-risque de cancer du sein préménopausique chez les femmes. Mais il nous faut envisager également la possibilité d'une entité diagnostique responsable d'une susceptibilité héréditaire aux cancers avec un spectre de tumeurs comprenant le DFS, cancers du sein et leucémies. Cette question d'une prédisposition Mendélienne aux cancers du sein, aux leucémies et aux DFS est d'autant plus importante qu'elle pourrait permettre un recours aux thérapies ciblées contre les récepteurs tyrosine kinase comme l'imatinib dans le cas de ces cancers du sein ou leucémies associés aux DFS.

Ces présentations familiales répondaient pour sept des huit patients étudiés aux critères de Chompret pour le diagnostic de syndrome de Li-Fraumeni [25]. Le séquençage et la recherche de réarrangements de grande taille du gène *TP53* n'ont pas révélé d'altération pour ces sept patients. Cela tend à exclure une implication de ce gène dans les cancers présentés par ces patients. C'est pourquoi, à l'inverse des autres sarcomes des tissus mous, le DFS ne devrait pas être considéré comme faisant partie des cancers appartenant au spectre du LFS.

Pour rechercher des mutations des gènes *PDGFRB* et *PDGFB*, nous avons utilisé les techniques de PCR-séquence selon la méthode de Sanger qui constitue la technique de référence et la QMPSF. Ces deux techniques sont couramment utilisées dans le cadre du diagnostic moléculaire de maladies génétiques et permettent de couvrir un éventail important de type d'altération génétique ce qui était un pré-requis essentiel au vu des différents types de mutation qui ont été décrits pour ces deux gènes (mutation ponctuelle, amplification, translocation).

Le *PDGFRB* appartient à la famille des gènes codant pour les récepteurs tyrosine kinase de classe III et dont font également partie le *PDGFRA*, *KIT*, *FMS*, et *FLT3*. Ces gènes présentent un spectre étendu de mutations constitutionnelles ou somatiques. Les gènes *KIT* et *PDGFRA* ont été impliqués dans des syndromes de prédisposition Mendélienne aux cancers à type de GIST. La majorité des mutations constitutionnelles activatrices du gène *KIT* prédisposant aux GIST sont des mutations ponctuelles ou de petites insertions/délétions respectant le cadre de lecture et situées dans l'exon 11 du gène codant le domaine juxtamembranaire, mais des mutations peuvent aussi toucher le domaine tyrosine kinase [98]. Le domaine juxtamembranaire régule l'activité enzymatique du récepteur et constitue un point chaud de mutations activatrices de ce gène. Des études de mutagenèse dirigée ont également permis de pointer l'importance du domaine juxta-membranaire du PDGFRB dans la transduction du signal et comme cible putative à des mutations activatrices [99]. Il est également possible d'observer des mutations du gène *KIT* touchant les domaines intracellulaires tyrosine kinase ou de liaison de l'ATP. Le *PDGFRA* pour sa part présente surtout des mutations dans l'exon 18 codant une partie du domaine tyrosine kinase [98]. De plus, les mutations des gènes codant des récepteurs tyrosine kinase d'autres familles peuvent aussi concerner les régions extracellulaires avec l'exemple des mutations touchant certains résidus cystéines du gène *RET* [100, 101]. Enfin, l'analyse des mutations somatiques du gène *PDGFRB* à l'aide de la base de données COSMIC (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/) regroupant les mutations somatiques dans 1594 cancers de différents types, permet de mettre en évidence 21 variations faux-sens et deux variations pouvant altérer l'épissage alternatif, réparties sur le gène *PDGFRB*, des

exons 2 à 22. En raison de ce large spectre des mutations observées dans les gènes de récepteurs tyrosine kinase et de la répartition relativement homogène sur l'ensemble du gène *PDGFRB* des mutations somatiques, nous avons donc analysé l'ensemble de la séquence codante du gène afin de ne pas méconnaître d'éventuelles mutations activatrices qui ne se situeraient pas dans les exons codant le domaine juxtamembranaire ou le domaine tyrosine kinase.

Nous n'avons pas mis au point plusieurs QMPSF qui cibleraient l'ensemble des exons des deux gènes mais plutôt une «mini» QMPSF avec un nombre limité d'amplimères. Ce choix est justifié dans la mesure où cette stratégie permet de dépister la plupart des différents mécanismes mutationnels envisagés. En effet, dans le cas d'une amplification du gène du *PDGFB* ou du gène de son récepteur *PDGFRB*, l'ensemble des exons devaient être dupliqués pour produire une protéine fonctionnelle et stimuler en excès la voie du PDGFB et deux amplimères sur chaque gène permettent la détection d'une augmentation du nombre de copies. Dans l'hypothèse d'une délétion de la région régulatrice en 3'UTR de *PDGFB*, nous avons ajouté un amplimère dans l'exon 1 qui comprenait une région régulatrice de -165 à –139pb en amont du site d'initiation de la traduction. Une délétion isolée d'une partie de cette région pouvait être détectée par une taille moins importante de l'amplimère fluorescent qui aurait abouti à un décalage du pic sur l'électrophorégramme. Une délétion plus importante aurait pris l'aspect d'une délétion de l'amplimère de l'exon 1 avec un respect du nombre de copies des exons ciblés du gène. Cependant nous n'avons pas couvert l'ensemble des régions régulatrices connues en 5'UTR du gène *PDGFB* [66-69].

Nous ne pouvons détecter avec nos techniques de PCR séquence et de QMPSF d'éventuelles translocations chromosomiques qui toucheraient l'un des deux gènes testés. Or il a été décrit dans les DFS sporadiques des translocations qui n'aboutissent pas au gène de fusion *COL1A1/PDGFB* mais impliquant toujours le gène *PDGFB*. Il existe également des translocations impliquant le gène *PDGFB* et d'autres gènes comme *ETV6* ou *MYO18A* qui sont décrites dans des syndromes myéloprolifératifs avec hyperéosinophilie (MIM #131440). Ce type de remaniement reste très rare dans les syndromes de prédisposition Mendélienne aux cancers et nous n'avons pas pu réaliser d'analyse de cytogénétique car les prélèvements de ces patients n'avaient pas été collectés pour une analyse de cytogénétique ou de leurs apparentés. Néanmoins, il aurait été intéressant de compléter nos analyses par un caryotype de haute résolution plus ou moins associé à une FISH ciblant le locus du gène *PDGFB* en 22q13.1.

Il n'existe pas à notre connaissance d'autre étude qui ait recherché des facteurs Mendéliens prédisposant aux DFS. Cela s'explique par la faible incidence de ce cancer mais surtout parce qu'il s'agit également d'un cancer qui est expliqué dans plus de 95% des cas

par deux anomalies chromosomiques récurrentes aboutissant au gène de fusion *COL1A1/PDGFB* [95]. La mise en évidence de ce gène de fusion par RT-PCR ou FISH constitue ainsi un outil pour le diagnostic et il est également proposé par différents auteurs pour le dépistage des DFS présentant un contingent de fibrosarcome associé. Les différentes études ont ainsi concerné les différents points de cassures entre *COL1A1* et *PDGFB*. Ces analyses ont ainsi démontré une remarquable constance dans le point de cassure de *PDGFB* qui se situe toujours dans l'intron 1, tandis que les points de cassure de *COL1A1* sont multiples et ne semblent pas modifier la gravité ni l'âge de survenue des DFS [102].

Pourtant, la littérature décrit quelques cas de DFS faisant suspecter l'existence d'autres facteurs que les deux anomalies chromosomiques récurrentes. Tout d'abord, il existe une faible proportion de cas de DFS pour lesquels une recherche exhaustive n'a pas permis de mettre en évidence ce gène de fusion, tandis que certains DFS présentait d'autres anomalies chromosomiques que les deux anomalies récurrentes. Au moins un autre cas de DFS familial a déjà été décrit dans la littérature et concernait un père et son fils ayant débuté un DFS respectivement à 44 et 15 ans [103]. L'association du DFS avec d'autres cancers a également déjà été rapportée pour le cas d'une famille associant un DFS chez une patiente de 17 ans et plusieurs autres cancers parfois rares et précoces à type de leucémies, tumeur de Wilm, myélome, cancer du sein et de l'estomac [104]. De plus, les auteurs avaient retrouvé dans cette famille une hypersensibilité aux cassures chromosomiques induites par la bléomycine. Cette dernière étude pourrait faire évoquer la possibilité d'une instabilité chromosomique qui favoriserait la survenue, dans cette famille ainsi que dans les familles que nous décrivons, de remaniements chromosomiques à l'origine des cancers observés.

Les remaniements chromosomiques sont responsables de la transformation maligne dans de nombreux cancers sporadiques et tout particulièrement dans les leucémies et les lymphomes. De plus, cette instabilité chromosomique constitue le mécanisme responsable de l'oncogenèse dans plusieurs syndromes de cancers héréditaires comme le LFS ou les syndromes de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire, liés à des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* appartenant au système de réparation des cassures double brin de l'ADN. C'est également le cas dans certaines maladies génétiques comme l'anémie de Fanconi, liée à des mutations bialléliques de gènes impliqués dans le système de réparation des cassures double brin de l'ADN et qui prédispose à des leucémies.

Un autre argument de poids pour impliquer l'instabilité chromosomique dans les familles que nous avons étudiées consiste en la description très récente de la fréquence des DFS chez des enfants atteints de déficit immunitaire combiné sévère (SCID) lié à une déficience en un enzyme, l'adénosine déaminase (ADA) [105]. Au cours de cette étude, les auteurs ont réalisé le suivi et le dépistage de douze patients atteints de SCID sur une

moyenne de 8,9 ans et ont dépisté chez huit d'entre eux au moins un DFS. De plus, sept des huit patients ont présenté des DFS simultanés en de multiples régions du corps ou à quelques années d'intervalle. Cet article peut faire évoquer l'existence d'un facteur environnemental responsable de la survenue de plusieurs DFS chez un même patient. Ce facteur environnemental pourrait d'ailleurs être infectieux en raison de l'immunodéficience observée dans cette maladie génétique. Cependant les auteurs n'ont pas à ce jour retrouvé d'agents infectieux dans ces tumeurs et ils émettent une autre hypothèse intéressante. En effet, l'accumulation de desoxyadénosine et de desoxyadénosine triphosphate liée à la déficience en ADA responsable de cassures simple brin de l'ADN et d'une inhibition des systèmes de réparation de l'ADN. Cette propension pour les cassures de l'ADN observée dans cette maladie génétique pourrait alors favoriser le développement des DFS chez ces patients atteints de SCID.

Ainsi, cette étude n'a pas permis d'identifier les bases moléculaires des dermatofibrosarcomes et des nombreux cancers retrouvés dans ces familles. Bien qu'il n'ait jamais été décrit à notre connaissance de mutation faux-sens touchant un gène de facteur de croissance comme mécanisme d'oncogenèse que ce soit au niveau constitutionnel comme au niveau somatique, il nous apparaît nécessaire de s'assurer de l'absence de mutations activatrices du gène *PDGFB*. C'est pourquoi, nous poursuivons actuellement cette étude avec le séquençage des régions codantes et de la région promotrice du gène *PDGFB*. Il pourrait également s'avérer intéressant de cibler d'autres gènes parmi les gènes situés en aval de la voie du PDGFB et interagissant avec le récepteur. Nous proposons également de réaliser chez les patients testés et leurs apparentés ayant présenté un dermatofibrosarcome, des analyses de cytogénétique (caryotype haute résolution et FISH) sur leur DFS afin de mettre en évidence le gène de fusion. L'intérêt de ces analyses étant de rechercher d'autres anomalies chromosomiques qui toucheraient d'autres gènes que le *PDGFB.* Il serait également intéressant de démontrer une éventuelle absence du gène de fusion COL1A1/PDGFB ce qui nous pousserait à rechercher d'autres facteurs génétiques dans la survenue de ces DFS.

En raison des multiples cas de DFS observés dans les familles étudiées et leurs associations avec d'autres cancers où l'instabilité chromosomique joue un rôle prépondérant comme les leucémies, il apparaît licite d'évoquer l'existence d'une prédisposition Mendélienne à ces cancers touchant un gène maintenant l'intégrité du génome (gène de réparation ou suppresseur de tumeur). Dans cette optique, il serait intéressant de réaliser chez les patients testés et leurs apparentés un test de cassures chromosomiques comme cela est réalisé dans l'anémie de Fanconi afin de mettre en évidence une instabilité chromosomique dans ces familles. Un résultat positif à ce test nous permettrait d'exclure

l'hypothèse d'un facteur environnemental responsable de la récurrence de DFS, mais surtout il permettrait de donner une explication physiopathologique à cette récurrence de cancers chez ces familles. La mise en évidence d'une instabilité chromosomique dans ces familles permettrait également de préciser le phénotype et de préciser ainsi le spectre des tumeurs observées. Pour finir, cela permettrait de déterminer les différents membres affectés dans ces familles ce qui est un préalable essentiel pour pouvoir envisager d'éventuelles études pangénomiques comme le séquençage d'exome.

En effet, le développement et la mise sur le marché depuis 2005 de plates-formes de séquençage à de nouvelle génération (NGS), ont permis d'augmenter de significativement les vitesses et les débits de séquençage tout en réduisant les coûts par rapport à la méthode classique de Sanger. Avec la venue de techniques couplant capture ciblée et séquençage massif de l'ADN, il est désormais possible de réaliser le séquençage de tous les exons d'un génome humain et ainsi de déterminer à moindre coût la quasi-totalité des variations présentes sur les séquences codantes. Cette technique appelée séquençage d'exome est rapidement devenue une nouvelle approche puissante pour identifier des gènes responsables de maladies génétiques Mendéliennes dans des circonstances où les approches conventionnelles d'analyse de liaison ou de gène candidat ont échoué [106]. De nombreuses variations rares responsables de maladies génétiques orphelines ont ainsi pu être découvertes [107, 108]. Ce type d'étude reste encore à ce jour du domaine de la recherche et nécessite des familles bien caractérisées sur le plan clinique. Mais l'utilisation du séquençage d'exome par les laboratoires pour le diagnostic pourrait être envisagée dans un avenir proche afin de rechercher une mutation privée chez des familles atteintes de maladies génétiques rares pour laquelle le gène n'est pas connu [109].

BIBLIOGRAPHIE

1. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science. 2006 oct 13;314(5797):268-74.

2. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. Science. 2007 nov 16;318(5853):1108-13.

3. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature. 2007 mars 8;446(7132):153-8.

4. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N. Engl. J. Med. 2012 mars 8;366(10):883-92.

5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 janv 7;100(1):57-70.

6. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. Nat. Rev. Cancer. 2004 mars;4(3):177-83.

7. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1971 avr;68(4):820-3.

8. Knudson AG Jr, Strong LC, Anderson DE. Heredity and cancer in man. Prog Med Genet. 1973;9:113-58.

9. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973 déc;70(12):3324-8.

10. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire JA, et al. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. Science. 1985 avr 26;228(4698):501-3.

11. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature. 1986 oct 16;323(6089):643-6.

12. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. Science. 1987 mars 13;235(4794):1394-9.

13. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat. Rev. Cancer. 2001 nov;1(2):157-62.

14. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. Science. 1991 août 9;253(5020):661-5.

15. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell. 1991 août 9;66(3):589-600.

16. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science. 1993 mai 28;260(5112):1317-20.

17. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat. Med. 2004 août;10(8):789-99.

18. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science. 1990 nov 30;250(4985):1233-8.

19. Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature. 1990 déc 20;348(6303):747-9.

20. Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J. Natl. Cancer Inst. 1969 déc;43(6):1365-73.

21. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. Cancer Res. 1988 sept 15;48(18):5358-62.

22. Malkin D. Li-fraumeni syndrome. Genes Cancer. 2011 avr;2(4):475-84.

23. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugiéres L, Pagés S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. J. Med. Genet. 2001 janv;38(1):43-7.

24. Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. J. Med. Genet. 2008 août;45(8):535-8.

25. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. J. Clin. Oncol. 2009 sept 10;27(26):e108-109; author reply e110.

26. Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hogervorst FBL, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. J. Med. Genet. 2010 juin;47(6):421-8.

27. Salmon A, Amikam D, Sodha N, Davidson S, Basel-Vanagaite L, Eeles RA, et al. Rapid development of post-radiotherapy sarcoma and breast cancer in a patient with a novel germline « de-novo » TP53 mutation. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2007 sept;19(7):490-3.

28. Heymann S, Delaloge S, Rahal A, Caron O, Frebourg T, Barreau L, et al. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. Radiat Oncol. 2010;5:104.

29. Villani A, Tabori U, Schiffman J, Shlien A, Beyene J, Druker H, et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. Lancet Oncol. 2011 juin;12(6):559-67.

30. Bendix-Hansen K, Myhre-Jensen O, Kaae S. Dermatofibrosarcoma protuberans. A clinico-pathological study of nineteen cases and review of world literature. Scand J Plast Reconstr Surg. 1983;17(3):247-52.

31. Chuang TY, Su WP, Muller SA. Incidence of cutaneous T cell lymphoma and other rare skin cancers in a defined population. J. Am. Acad. Dermatol. 1990 août;23(2 Pt 1):254-6.

32. Criscione VD, Weinstock MA. Descriptive epidemiology of dermatofibrosarcoma protuberans in the United States, 1973 to 2002. J. Am. Acad. Dermatol. 2007 juin;56(6):968-73.

33. Kransdorf MJ. Malignant soft-tissue tumors in a large referral population: distribution of diagnoses by age, sex, and location. AJR Am J Roentgenol. 1995 janv;164(1):129-34.

34. Bowne WB, Antonescu CR, Leung DH, Katz SC, Hawkins WG, Woodruff JM, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: A clinicopathologic analysis of patients treated and followed at a single institution. Cancer. 2000 juin 15;88(12):2711-20.

35. Fiore M, Miceli R, Mussi C, Lo Vullo S, Mariani L, Lozza L, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans treated at a single institution: a surgical disease with a high cure rate. J. Clin. Oncol. 2005 oct 20;23(30):7669-75.

36. Gloster HM Jr. Dermatofibrosarcoma protuberans. J. Am. Acad. Dermatol. 1996 sept;35(3 Pt 1):355-374; quiz 375-376.

37. Halder RM, Bang KM. Skin cancer in blacks in the United States. Dermatol Clin. 1988 juill;6(3):397-405.

.

38. Feramisco J, Larsen F, Weitzul S, Cockerell C, Ghali F. Congenital atrophic dermatofibrosarcoma protuberans in a 7-month-old boy treated with Mohs micrographic surgery. Pediatr Dermatol. 2008 août;25(4):455-9

39. Love WE, Keiler SA, Tamburro JE, Honda K, Gosain AK, Bordeaux JS. Surgical management of congenital dermatofibrosarcoma protuberans. J. Am. Acad. Dermatol. 2009 déc;61(6):1014-23.

40. TAYLOR HB, HELWIG EB. Dermatofibrosarcoma protuberans. A study of 115 cases. Cancer. 1962 août;15:717-25.

41. Lindner NJ, Scarborough MT, Powell GJ, Spanier S, Enneking WF. Revision surgery in dermatofibrosarcoma protuberans of the trunk and extremities. Eur J Surg Oncol. 1999 août;25(4):392-7.

42. Bianchini L, Maire G, Pedeutour F. [From cytogenetics to cytogenomics of dermatofibrosarcoma protuberans family of tumors]. Bull Cancer. 2007 févr;94(2):179-89.

43. Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, et al. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. Nat. Genet. 1997 janv;15(1):95-8.

44. Rutgers EJ, Kroon BB, Albus-Lutter CE, Gortzak E. Dermatofibrosarcoma protuberans: treatment and prognosis. Eur J Surg Oncol. 1992 juin;18(3):241-8.

45. Mentzel T, Beham A, Katenkamp D, Dei Tos AP, Fletcher CD. Fibrosarcomatous (« high-grade ») dermatofibrosarcoma protuberans: clinicopathologic and immunohistochemical study of a series of 41 cases with emphasis on prognostic significance. Am. J. Surg. Pathol. 1998 mai;22(5):576-87.

46. Abbott JJ, Oliveira AM, Nascimento AG. The prognostic significance of fibrosarcomatous transformation in dermatofibrosarcoma protuberans. Am. J. Surg. Pathol. 2006 avr;30(4):436-43.

47. Greco A, Fusetti L, Villa R, Sozzi G, Minoletti F, Mauri P, et al. Transforming activity of the chimeric sequence formed by the fusion of collagen gene COL1A1 and the platelet derived growth factor b-chain gene in dermatofibrosarcoma protuberans. Oncogene. 1998 sept 10;17(10):1313-9.

48. Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. Nat. Rev. Cancer. 2011 déc;11(12):865-78

49. Sjöblom T, Shimizu A, O'Brien KP, Pietras K, Dal Cin P, Buchdunger E, et al. Growth inhibition of dermatofibrosarcoma protuberans tumors by the platelet-derived growth factor receptor antagonist STI571 through induction of apoptosis. Cancer Res. 2001 août 1;61(15):5778-83.

50. McArthur GA, Demetri GD, van Oosterom A, Heinrich MC, Debiec-Rychter M, Corless CL, et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. J. Clin. Oncol. 2005 févr 1;23(4):866-73.

51. Heinrich MC, Joensuu H, Demetri GD, Corless CL, Apperley J, Fletcher JA, et al. Phase II, open-label study evaluating the activity of imatinib in treating life-threatening malignancies known to be associated with imatinib-sensitive tyrosine kinases. Clin. Cancer Res. 2008 mai 1;14(9):2717-25.

52. Rutkowski P, Dębiec-Rychter M, Nowecki Z, Michej W, Symonides M, Ptaszynski K, et al. Treatment of advanced dermatofibrosarcoma protuberans with imatinib mesylate with or without surgical resection. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 mars;25(3):264-70.

53. Kérob D, Porcher R, Vérola O, Dalle S, Maubec E, Aubin F, et al. Imatinib mesylate as a preoperative therapy in dermatofibrosarcoma: results of a multicenter phase II study on 25 patients. Clin. Cancer Res. 2010 juin 15;16(12):3288-95.

54. O'Brien KP, Seroussi E, Dal Cin P, Sciot R, Mandahl N, Fletcher JA, et al. Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant-cell fibroblastomas. Genes Chromosomes Cancer. 1998 oct;23(2):187-93.

55. Wang J, Hisaoka M, Shimajiri S, Morimitsu Y, Hashimoto H. Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Diagn. Mol. Pathol. 1999 sept;8(3):113-9.

56. Sonobe H, Furihata M, Iwata J, Ohtsuki Y, Chikazawa M, Taguchi T, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans harboring t(9;22)(q32;q12.2). Cancer Genet. Cytogenet. 1999 avr;110(1):14-8.

57. Rubin BP, Schuetze SM, Eary JF, Norwood TH, Mirza S, Conrad EU, et al. Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. J. Clin. Oncol. 2002 sept 1;20(17):3586-91.

58. Rutkowski P, Wozniak A, Switaj T. Advances in molecular characterization and targeted therapy in dermatofibrosarcoma protuberans. Sarcoma. 2011;2011:959132.

59. Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. Exp. Cell Res. 1974 août;87(2):297-301.

60. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1974 avr;71(4):1207-10.

61. Westermark B, Wasteson A. A platelet factor stimulating human normal glial cells. Exp. Cell Res. 1976 mars 1;98(1):170-4.

62. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. J. Cell Biol. 1989 juill;109(1):429-40.

63. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. J. Clin. Invest. 2003 oct;112(8):1142-51.

64. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. J. Clin. Invest. 2006 juin;116(6):1561-70.

65. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 août;15(4):237-54.

66. Rao CD, Pech M, Robbins KC, Aaronson SA. The 5' untranslated sequence of the c-sis/platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. Mol. Cell. Biol. 1988 janv;8(1):284-92.

67. Horvath P, Suganuma A, Inaba M, Pan YB, Gupta KC. Multiple elements in the 5' untranslated region down-regulate c-sis messenger RNA translation. Cell Growth Differ. 1995 sept;6(9):1103-10.

68. Nikami H, Kobayashi T, Tasaki T, Yoshino S, Taharaguchi S, Ono E. Translational regulation of platelet-derived growth factor B chain (c-sis) mRNA by short open reading frames in the 5'-untranslated region. Platelets. 2000 mai;11(3):166-70.

69. Han B, Dong Z, Zhang J-T. Tight control of platelet-derived growth factor B/c-sis expression by interplay between the 5'-untranslated region sequence and the major upstream promoter. J. Biol. Chem. 2003 nov 21;278(47):46983-93.

70. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 août;15(4):197-204.

71. Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, et al. Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. Oncogene. 2005 oct 20;24(46):6925-35.

72. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiol. Rev. 1999 oct;79(4):1283-316.

73. Dalla-Favera R, Gelmann EP, Gallo RC, Wong-Staal F. A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. Nature. 1981 juill 2;292(5818):31-5.

74. Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, et al. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science. 1983 juill 15;221(4607):275-7.

75. Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, et al. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. Nature. 1983 juill 7;304(5921):35-9.

76. Collins T, Ginsburg D, Boss JM, Orkin SH, Pober JS. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. Nature. 1985 août 22;316(6030):748-50.

77. Pech M, Gazit A, Arnstein P, Aaronson SA. Generation of fibrosarcomas in vivo by a retrovirus that expresses the normal B chain of platelet-derived growth factor and mimics the alternative splice pattern of the v-sis oncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989 avr;86(8):2693-7.

78. Keating MT, Williams LT. Autocrine stimulation of intracellular PDGF receptors in v-sis-transformed cells. Science. 1988 févr 19;239(4842):914-6.

79. Leveen P, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Betsholtz C. Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and its receptors in human sarcoma cell lines. Int. J. Cancer. 1990 déc 15;46(6):1066-70.

80. Smits A, Funa K, Vassbotn FS, Beausang-Linder M, af Ekenstam F, Heldin CH, et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in proliferative disorders of fibroblastic origin. Am. J. Pathol. 1992 mars;140(3):639-48.

81. Kok A, Lovicu FJ, Chamberlain CG, McAvoy JW. Influence of platelet-derived growth factor on lens epithelial cell proliferation and differentiation. Growth Factors. 2002 mars;20(1):27-34.

82. Shimizu A, O'Brien KP, Sjöblom T, Pietras K, Buchdunger E, Collins VP, et al. The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type Ialpha1/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. Cancer Res. 1999 août 1;59(15):3719-23.

83. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, et al. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. Cancer Res. 1992 août 15;52(16):4550-3.

84. Hermanson M, Funa K, Koopmann J, Maintz D, Waha A, Westermark B, et al. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. Cancer Res. 1996 janv 1;56(1):164-71.

85. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen C-J, Joseph N, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. Science. 2003 janv 31;299(5607):708-10.

86. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. Cell. 1994 avr 22;77(2):307-16.

87. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. Br. J. Cancer. 2004 juill 19;91(2):355-8.

88. A haplotype map of the human genome. Nature. 2005 oct 27;437(7063):1299-320.

89. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010 oct 28;467(7319):1061-73.

90. Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, et al. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. Cancer Res. 2000 juin 1;60(11):2760-3.

91. Saugier-Veber P, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, de La Rochebrochard C, Layet V, Drouot N, et al. Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. Eur. J. Hum. Genet. 2006 sept;14(9):1009-17.

92. Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1986 juin;83(11):3746-50.

93. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002 juin 15;30(12):e57.

94. Huin V, Drouot N, Chambon P, Le Meur N, Frébourg T, Tosi M, et al. Development of a nonfluorescent multiplex semiquantitative polymerase chain reaction to confirm rearrangements detected by array-comparative genomic hybridization. Genet Test Mol Biomarkers. 2011 août;15(7-8):469-74.

95. Patel KU, Szabo SS, Hernandez VS, Prieto VG, Abruzzo LV, Lazar AJF, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans COL1A1-PDGFB fusion is identified in virtually all dermatofibrosarcoma protuberans cases when investigated by newly developed multiplex reverse transcription polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization assays. Hum. Pathol. 2008 févr;39(2):184-93.

96. Shmookler BM, Enzinger FM, Weiss SW. Giant cell fibroblastoma. A juvenile form of dermatofibrosarcoma protuberans. Cancer. 1989 nov 15;64(10):2154-61.

97. Reddy C, Hayward P, Thompson P, Kan A. Dermatofibrosarcoma protuberans in children. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009 juin;62(6):819-23.

98. Daniels M, Lurkin I, Pauli R, Erbstösser E, Hildebrandt U, Hellwig K, et al. Spectrum of KIT/PDGFRA/BRAF mutations and Phosphatidylinositol-3-Kinase pathway gene alterations in gastrointestinal stromal tumors (GIST). Cancer Lett. 2011 déc 15;312(1):43-54.

99. Irusta PM, Luo Y, Bakht O, Lai C-C, Smith SO, DiMaio D. Definition of an inhibitory juxtamembrane WW-like domain in the platelet-derived growth factor beta receptor. J. Biol. Chem. 2002 oct 11;277(41):38627-34.

100. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum. Mol. Genet. 1993 juill;2(7):851-6.

101. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. Nat. Genet. 1994 janv;6(1):70-4.

102. Llombart B, Monteagudo C, Sanmartín O, López-Guerrero JA, Serra-Guillén C, Poveda A, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: a clinicopathological, immunohistochemical, genetic (COL1A1-PDGFB), and therapeutic study of low-grade versus high-grade (fibrosarcomatous) tumors. J. Am. Acad. Dermatol. 2011 sept;65(3):564-75.

103. Gardner TL, Elston DM, Wotowic PJ. A familial dermatofibrosarcoma protuberans. J. Am. Acad. Dermatol. 1998 sept;39(3):504-5.

104. Liang JC, Pinkel DP, Bailey NM, Trujillo JM. Mutagen sensitivity and cancer susceptibility. Report of a cancer-prone family. Cancer. 1989 oct 1;64(7):1474-9.

105. Kesserwan C, Sokolic R, Cowen EW, Garabedian E, Heselmeyer-Haddad K, Lee C-CR, et al. Multicentric dermatofibrosarcoma protuberans in patients with adenosine deaminase-

deficient severe combined immune deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. 2012 mars;129(3):762-769.e1.

106. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature. 2009 sept 10;461(7261):272-6.

107. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat. Genet. 2010 janv;42(1):30-5.

108. Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, et al. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. Nature. 2010 sept 9;467(7312):207-10.

109. Ku C-S, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. Ann. Neurol. 2012 janv;71(1):5-14.

SERMENT D’HIPPOCRATE

" Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque."

RESUME

Le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand est un sarcome des tissus mous, généralement de bas grade de malignité et d'évolution lente, développé à partir du derme. Il s'agit d'un cancer rare avec une prévalence dans la population générale estimée entre 0,8 et 5 par million. Dans plus de 95% des cas, sont observées deux anomalies génétiques récurrentes correspondant soit à une translocation réciproque des bras longs des chromosomes 17 et 22, soit à un anneau chromosomique surnuméraire. Ces anomalies génétiques somatiques aboutissent toutes les deux à la fusion du gène *COL1A1* et du proto-oncogène *PDGFB*. Ce gène de fusion a pour conséquence une hyperproduction de PDGFB responsable de la transformation maligne des cellules possédant le récepteur adapté : le PDGFRB. Ce récepteur à activité tyrosine kinase est impliqué dans plusieurs autres types de cancers et il constitue une cible pour les thérapies ciblées comme l'imatinib. Dans le cadre du diagnostic moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, nous disposons d'un recrutement national exceptionnel de familles présentant une agrégation de cancers rares. Nous avons ainsi noté la survenue dans certaines familles de plusieurs cas de dermatofibrosarcome ou son agrégation avec de multiples cas de cancers. Cette récurrence de cancers rares est évocatrice d'un risque génétique se transmettant selon un mode Mendélien.

Nous avons testé, au cours de cette thèse d'exercice de médecine, l'implication des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* dans le déterminisme Mendélien du dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand. Nous avons choisi d'étudier ces deux gènes en raison de leur implication dans de nombreux types de cancers sporadiques. En effet, des mutations somatiques du gène *PDGFB* sont impliquées dans plus de 95% des dermatofibrosarcomes. De plus, une thérapie ciblée serait envisageable pour les cancers auxquels prédisposent ces deux proto-oncogènes. Nous avons donc recherché des mutations sur la totalité de la séquence codante du gène *PDGFRB* par PCR et séquençage. Puis, nous avons recherché des réarrangements de grande taille de ces deux gènes par QMPSF. Ainsi, cette étude n'a pas permis d'identifier les bases moléculaires des dermatofibrosarcomes et des nombreux cancers retrouvés dans ces familles. Il sera nécessaire de poursuivre cette étude par le séquençage du gène *PDGFB* et par la recherche d'une instabilité chromosomique dans ces familles.

MOT-CLES : Dermatofibrosarcome, Cancers héréditaires, Syndrome de Li-Fraumeni, PDFGB, Proto-oncogène, Récepteur tyrosine kinase, Thérapie ciblée

RESUME

Le dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand est un sarcome des tissus mous, généralement de bas grade de malignité et d'évolution lente, développé à partir du derme. Il s'agit d'un cancer rare avec une prévalence dans la population générale estimée entre 0,8 et 5 par million. Dans plus de 95% des cas, sont observées deux anomalies génétiques récurrentes correspondant soit à une translocation réciproque des bras longs des chromosomes 17 et 22, soit à un anneau chromosomique surnuméraire. Ces anomalies génétiques somatiques aboutissent toutes les deux à la fusion du gène *COL1A1* et du proto-oncogène *PDGFB*. Ce gène de fusion a pour conséquence une hyperproduction de PDGFB responsable de la transformation maligne des cellules possédant le récepteur adapté : le PDGFRB. Ce récepteur à activité tyrosine kinase est impliqué dans plusieurs autres types de cancers et il constitue une cible pour les thérapies ciblées comme l'imatinib. Dans le cadre du diagnostic moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, nous disposons d'un recrutement national exceptionnel de familles présentant une agrégation de cancers rares. Nous avons ainsi noté la survenue dans certaines familles de plusieurs cas de dermatofibrosarcome ou son agrégation avec de multiples cas de cancers. Cette récurrence de cancers rares est évocatrice d'un risque génétique se transmettant selon un mode Mendélien.

Nous avons testé, au cours de cette thèse d'exercice de médecine, l'implication des gènes *PDGFB* et *PDGFRB* dans le déterminisme Mendélien du dermatofibrosarcome de Darier et Ferrand. Nous avons choisi d'étudier ces deux gènes en raison de leur implication dans de nombreux types de cancers sporadiques. En effet, des mutations somatiques du gène *PDGFB* sont impliquées dans plus de 95% des dermatofibrosarcomes. De plus, une thérapie ciblée serait envisageable pour les cancers auxquels prédisposent ces deux proto-oncogènes. Nous avons donc recherché des mutations sur la totalité de la séquence codante du gène *PDGFRB* par PCR et séquençage. Puis, nous avons recherché des réarrangements de grande taille de ces deux gènes par QMPSF. Ainsi, cette étude n'a pas permis d'identifier les bases moléculaires des dermatofibrosarcomes et des nombreux cancers retrouvés dans ces familles. Il sera nécessaire de poursuivre cette étude par le séquençage du gène *PDGFB* et par la recherche d'une instabilité chromosomique dans ces familles.

MOT-CLES : Dermatofibrosarcome, Cancers héréditaires, Syndrome de Li-Fraumeni, PDFGB, Proto-oncogène, Récepteur tyrosine kinase, Thérapie ciblée