Séquençage ciblé dans les ostéosarcomes de haut grade non métastatiques : identification des cibles thérapeutiques et recherche de mutations prédictives de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante

Elise Lavit

▶ **To cite this version:**

Elise Lavit. Séquençage ciblé dans les ostéosarcomes de haut grade non métastatiques : identification des cibles thérapeutiques et recherche de mutations prédictives de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-01957174

HAL Id: dumas-01957174

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01957174

Submitted on 17 Dec 2018

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.

Faculté de Médecine
Aix*Marseille Université

Séquençage ciblé dans les ostéosarcomes de haut grade non métastatiques : identification de cibles thérapeutiques et recherche de mutations prédictives de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante.

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 8 Juin 2018

Par Madame Élise LAVIT

Née le 20 juillet 1988 à Orleans (45)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. d' ONCOLOGIE Option ONCOLOGIE MÉDICALE

Membres du Jury de la Thèse :

Madame le Professeur DUFFAUD Florence	**Président**
Monsieur le Professeur SALAS Sébastien	**Directeur**
Madame le Docteur (MCU-PH) BOUVIER Corinne	**Assesseur**
Monsieur le Professeur BERTUCCI François	**Assesseur**

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Président : Yvon BERLAND

FACULTE DE MEDECINE

Doyen : Georges LEONETTI

Vice-Doyen aux Affaires Générales : Patrick DESSI
Vice-Doyen aux Professions Paramédicales : Philippe BERBIS

Assesseurs :
* aux Etudes : Jean-Michel VITON
* à la Recherche : Jean-Louis MEGE
* aux Prospectives Hospitalo-Universitaires : Frédéric COLLART
* aux Enseignements Hospitaliers : Patrick VILLANI
* à l'Unité Mixte de Formation Continue en Santé : Fabrice BARLESI
* pour le Secteur Nord : Stéphane BERDAH
* aux centres hospitaliers non universitaires : Jean-Noël ARGENSON

Chargés de mission :
* 1er cycle : Jean-Marc DURAND et Marc BARTHET
* 2ème cycle : Marie-Aleth RICHARD
* 3eme cycle DES/DESC : Pierre-Edouard FOURNIER
* Licences-Masters-Doctorat : Pascal ADALIAN
* DU-DIU : Véronique VITTON
* Stages Hospitaliers : Franck THUNY
* Sciences Humaines et Sociales : Pierre LE COZ
* Préparation à l'ECN : Aurélie DAUMAS
* Démographie Médicale et Filiarisation : Roland SAMBUC
* Relations Internationales : Philippe PAROLA
* Etudiants : Arthur ESQUER

Chef des services généraux : * Déborah ROCCHICCIOLI

Chefs de service :
* Communication : Laetitia DELOUIS
* Examens : Caroline MOUTTET
* Logistique : Joëlle FRAVEGA
* Maintenance : Philippe KOCK
* Scolarité : Christine GAUTHIER

DOYENS HONORAIRES

M. Yvon BERLAND
M. André ALI CHERIF
M. Jean-François PELLISSIER

Mis à jour 18/07/2017

PROFESSEURS HONORAIRES

MM AGOSTINI Serge
ALDIGHIERI René
ALESSANDRINI Pierre
ALLIEZ Bernard
AQUARON Robert
ARGEME Maxime
ASSADOURIAN Robert
AUFFRAY Jean-Pierre
AUTILLO-TOUATI Amapola
AZORIN Jean-Michel
BAILLE Yves
BARDOT Jacques
BARDOT André
BERARD Pierre
BERGOIN Maurice
BERNARD Dominique
BERNARD Jean-Louis
BERNARD Pierre-Marie
BERTRAND Edmond
BISSET Jean-Pierre
BLANC Bernard
BLANC Jean-Louis
BOLLINI Gérard
BONGRAND Pierre
BONNEAU Henri
BONNOIT Jean
BORY Michel
BOTTA Alain
BOURGEADE Augustin
BOUVENOT Gilles
BOUYALA Jean-Marie
BREMOND Georges
BRICOT René
BRUNET Christian
BUREAU Henri
CAMBOULIVES Jean
CANNONI Maurice
CARTOUZOU Guy

CHAMLIAN Albert
CHARREL Michel
CHAUVEL Patrick
CHOUX Maurice
CIANFARANI François
CLEMENT Robert
COMBALBERT André
CONTE-DEVOLX Bernard
CORRIOL Jacques
COULANGE Christian
DALMAS Henri
DE MICO Philippe
DELARQUE Alain
DEVIN Robert
DEVRED Philippe
DJIANE Pierre
DONNET Vincent
DUCASSOU Jacques
DUFOUR Michel
DUMON Henri
FARNARIER Georges
FAVRE Roger
FIECHI Marius

MM FIGARELLA Jacques
FONTES Michel
FRANCOIS Georges
FUENTES Pierre
GABRIEL Bernard
GALINIER Louis
GALLAIS Hervé
GAMERRE Marc
GARCIN Michel
GARNIER Jean-Marc
GAUTHIER André
GERARD Raymond
GEROLAMI-SANTANDREA André
GIUDICELLI Roger
GIUDICELLI Sébastien
GOUDARD Alain
GOUIN François
GRISOLI François
GROULIER Pierre
HADIDA/SAYAG Jacqueline
HASSOUN Jacques
HEIM Marc
HOUEL Jean
HUGUET Jean-François
JAQUET Philippe
JAMMES Yves
JOUVE Paulette
JUHAN Claude
JUIN Pierre
KAPHAN Gérard
KASBARIAN Michel
KLEISBAUER Jean-Pierre
LACHARD Jean
LAFFARGUE Pierre
LAUGIER René
LEVY Samuel
LOUCHET Edmond
LOUIS René
LUCIANI Jean-Marie
MAGALON Guy
MAGNAN Jacques
MALLAN- MANCINI Josette
MALMEJAC Claude
MATTEI Jean François
MERCIER Claude
METGE Paul
MICHOTEY Georges
MILLET Yves
MIRANDA François
MONFORT Gérard
MONGES André
MONGIN Maurice
MONTIES Jean-Raoul
NAZARIAN Serge
NICOLI René
NOIRCLERC Michel
OLMER Michel
OREHEK Jean
PAPY Jean-Jacques
PAULIN Raymond
PELOUX Yves
PENAUD Antony

MM PENE Pierre
PIANA Lucien
PICAUD Robert
PIGNOL Fernand
POGGI Louis
POITOUT Dominique
PONCET Michel
POUGET Jean
PRIVAT Yvan
QUILICHINI Francis
RANQUE Jacques
RANQUE Philippe
RICHAUD Christian
ROCHAT Hervé
ROHNER Jean-Jacques
ROUX Hubert
ROUX Michel
RUFO Marcel
SAHEL José
SALAMON Georges
SALDUCCI Jacques
SAN MARCO Jean-Louis
SANKALE Marc
SARACCO Jacques
SARLES Jean-Claude
SASTRE Bernard
SCHIANO Alain
SCOTTO Jean-Claude
SEBAHOUN Gérard
SERMENT Gérard
SERRATRICE Georges
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TARANGER-CHARPIN Colette
THOMASSIN Jean-Marc
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIALETTES Bernard
WEILLER Pierre-Jean

PROFESSEURS HONORIS CAUSA

1967

MM. les Professeurs — DADI (Italie)
CID DOS SANTOS (Portugal)

1974

MM. les Professeurs — MAC ILWAIN (Grande-Bretagne)
T.A. LAMBO (Suisse)

1975

MM. les Professeurs — O. SWENSON (U.S.A.)
Lord J.WALTON of DETCHANT (Grande-Bretagne)

1976

MM. les Professeurs — P. FRANCHIMONT (Belgique)
Z.J. BOWERS (U.S.A.)

1977

MM. les Professeurs — C. GAJDUSEK-Prix Nobel (U.S.A.)
C.GIBBS (U.S.A.)
J. DACIE (Grande-Bretagne)

1978

M. le Président — F. HOUPHOUET-BOIGNY (Côte d'Ivoire)

1980

MM. les Professeurs — A. MARGULIS (U.S.A.)
R.D. ADAMS (U.S.A.)

1981

MM. les Professeurs — H. RAPPAPORT (U.S.A.)
M. SCHOU (Danemark)
M. AMENT (U.S.A.)
Sir A. HUXLEY (Grande-Bretagne)
S. REFSUM (Norvège)

1982

M. le Professeur — W.H. HENDREN (U.S.A.)

1985

MM. les Professeurs — S. MASSRY (U.S.A.)
KLINSMANN (R.D.A.)

1986

MM. les Professeurs — E. MIHICH (U.S.A.)
T. MUNSAT (U.S.A.)
LIANA BOLIS (Suisse)
L.P. ROWLAND (U.S.A.)

1987

M. le Professeur — P.J. DYCK (U.S.A.)

1988

MM. les Professeurs — R. BERGUER (U.S.A.)
W.K. ENGEL (U.S.A.)
V. ASKANAS (U.S.A.)
J. WEHSTER KIRKLIN (U.S.A.)
A. DAVIGNON (Canada)
A. BETTARELLO (Brésil)

1989

M. le Professeur — P. MUSTACCHI (U.S.A.)

1990

MM. les Professeurs — J.G. MC LEOD (Australie)
J. PORTER (U.S.A.)

1991

MM. les Professeurs — J. Edward MC DADE (U.S.A.)
W. BURGDORFER (U.S.A.)

1992

MM. les Professeurs — H.G. SCHWARZACHER (Autriche)
D. CARSON (U.S.A.)
T. YAMAMURO (Japon)

1994

MM. les Professeurs — G. KARPATI (Canada)
W.J. KOLFF (U.S.A.)

1995

MM. les Professeurs — D. WALKER (U.S.A.)
M. MULLER (Suisse)
V. BONOMINI (Italie)

1997

MM. les Professeurs — C. DINARELLO (U.S.A.)
D. STULBERG (U.S.A.)
A. MEIKLE DAVISON (Grande-Bretagne)
P.I. BRANEMARK (Suède)

1998

MM. les Professeurs — O. JARDETSKY (U.S.A.)

1999

MM. les Professeurs — J. BOTELLA LLUSIA (Espagne)
D. COLLEN (Belgique)
S. DIMAURO (U. S. A.)

2000

MM. les Professeurs — D. SPIEGEL (U. S. A.)
C. R. CONTI (U.S.A.)

2001

MM. les Professeurs — P-B. BENNET (U. S. A.)
G. HUGUES (Grande Bretagne)
J-J. O'CONNOR (Grande Bretagne)

2002

MM. les Professeurs — M. ABEDI (Canada)
K. DAI (Chine)

2003

M. le Professeur — T. MARRIE (Canada)
Sir — G.K. RADDA (Grande Bretagne)

2004

M. le Professeur — M. DAKE (U.S.A.)

2005

M. le Professeur — L. CAVALLI-SFORZA (U.S.A.)

2006

M. le Professeur — A. R. CASTANEDA (U.S.A.)

2007

M. le Professeur — S. KAUFMANN (Allemagne)

EMERITAT

2008		
M. le Professeur	LEVY Samuel	31/08/2011
Mme le Professeur	JUHAN-VAGUE Irène	31/08/2011
M. le Professeur	PONCET Michel	31/08/2011
M. le Professeur	KASBARIAN Michel	31/08/2011
M. le Professeur	ROBERTOUX Pierre	31/08/2011
2009		
M. le Professeur	DJIANE Pierre	31/08/2011
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2012
2010		
M. le Professeur	MAGNAN Jacques	31/12/2014
2011		
M. le Professeur	DI MARINO Vincent	31/08/2015
M. le Professeur	MARTIN Pierre	31/08/2015
M. le Professeur	METRAS Dominique	31/08/2015
2012		
M. le Professeur	AUBANIAC Jean-Manuel	31/08/2015
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2015
M. le Professeur	CAMBOULIVES Jean	31/08/2015
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2015
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2015
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2015
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2015
2013		
M. le Professeur	BRANCHEREAU Alain	31/08/2016
M. le Professeur	CARAYON Pierre	31/08/2016
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2016
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2016
M. le Professeur	HENRY Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	LE GUICHAOUA Marie-Roberte	31/08/2016
M. le Professeur	RUFO Marcel	31/08/2016
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2016
2014		
M. le Professeur	FUENTES Pierre	31/08/2017
M. le Professeur	GAMERRE Marc	31/08/2017
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2017
M. le Professeur	PERAGUT Jean-Claude	31/08/2017
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2017
2015		
M. le Professeur	COULANGE Christian	31/08/2018
M. le Professeur	COURAND François	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2016
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2016
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2016

2016

M. le Professeur	BONGRAND Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2017
M. le Professeur	BRUNET Christian	31/08/2019
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2017
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2017
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2019
M. le Professeur	JAMMES Yves	31/08/2019
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2017
M. le Professeur	POITOUT Dominique	31/08/2019
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2017
M. le Professeur	VIALETTES Bernard	31/08/2019

2017

M. le Professeur	ALESSANDRINI Pierre	31/08/2020
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2018
M. le Professeur	CHAUVEL Patrick	31/08/2020
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2018
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2018
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2018
M. le Professeur	SEBBAHOUN Gérard	31/08/2018

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI FERRANDES Aubert
ALBANESE Jacques
ALIMI Yves
AMABILE Philippe
AMBROSI Pierre
ANDRE Nicolas
ARGENSON Jean-Noël
ASTOUL Philippe
ATTARIAN Shahram
AUDOUIN Bertrand
AUQUIER Pascal
AVIERINOS Jean-François
AZULAY Jean-Philippe
BAILLY Daniel
BARLESI Fabrice
BARLIER-SETTI Anne
BARTHET Marc
BARTOLI Jean-Michel
BARTOLI Michel
BARTOLIN Robert Surnombre
BARTOLOMEI Fabrice
BASTIDE Cyrille
BENSOUSSAN Laurent
BERBIS Philippe
BERDAH Stéphane
BERLAND Yvon Surnombre
BERNARD Jean-Paul
BEROUD Christophe
BERTUCCI François
BLAISE Didier
BLIN Olivier
BLONDEL Benjamin
BONIN/GUILLAUME Sylvie
BONELLO Laurent
BONNET Jean-Louis
BOTTA/FRIDLUND Danielle
BOUBLI Léon
BOYER Laurent
BREGEON Fabienne
BRETELLE Florence
BROUQUI Philippe
BRUDER Nicolas
BRUE Thierry
BRUNET Philippe
BURTEY Stéphane
CARCOPINO-TUSOLI Xavier
CASANOVA Dominique
CASTINETTI Frédéric
CECCALDI Mathieu
CHABOT Jean-Michel
CHAGNAUD Christophe
CHAMBOST Hervé
CHAMPSAUR Pierre
CHANEZ Pascal
CHARAFFE-JAUFFRET Emmanuelle
CHARREL Rémi
CHARPIN Denis Surnombre
CHAUMOITRE Kathia
CHIARONI Jacques
CHINOT Olivier
CHOSSEGROS Cyrille
CLAVERIE Jean-Michel Surnombre
COLLART Frédéric
COSTELLO Régis
COURBIERE Blandine
COWEN Didier
CRAVELLO Ludovic
CUISSET Thomas
CURVALE Georges
DA FONSECA David
DAHAN-ALCARAZ Laetitia
DANIEL Laurent
DARMON Patrice
D'ERCOLE Claude
D'JOURNO Xavier
DEHARO Jean-Claude
DELPERO Jean-Robert
DENIS Danièle
DESSEIN Alain Surnombre
DESSI Patrick
DISDIER Patrick
DODDOLI Christophe
DRANCOURT Michel
DUBUS Jean-Christophe
DUFFAUD Florence
DUFOUR Henry
DURAND Jean-Marc
DUSSOL Bertrand
ENJALBERT Alain Surnombre
EUSEBIO Alexandre
FAKHRY Nicolas
FAUGERE Gérard Surnombre
FELICIAN Olvier
FENOLLAR Florence
FIGARELLA/BRANGER Dominique
FLECHER Xavier
FOURNIER Pierre-Edouard
FRANCES Yves Surnombre
FUENTES Stéphane
GABERT Jean
GAINNIER Marc
GARCIA Stéphane
GARIBOLDI Vlad
GAUDART Jean
GAUDY-MARQUESTE Caroline
GENTILE Stéphanie
GERBEAUX Patrick
GEROLAMI/SANTANDREA René
GILBERT/ALESSI Marie-Christine
GIORGI Roch
GIOVANNI Antoine
GIRARD Nadine
GIRAUD/CHABROL Brigitte
GONCALVES Anthony
GORINCOUR Guillaume
GRANEL/REY Brigitte
GRANVAL Philippe
GREILLIER Laurent
GRILLO Jean-Marie Surnombre
GRIMAUD Jean-Charles
GROB Jean-Jacques
GUEDJ Eric
GUIEU Régis
GUIS Sandrine
GUYE Maxime
GUYOT Laurent
GUYS Jean-Michel
HABIB Gilbert
HARDWIGSEN Jean
HARLE Jean-Robert
HOFFART Louis
HOUVENAEGHEL Gilles
JACQUIER Alexis
JOURDE-CHICHE Noémie
JOUVE Jean-Luc
KAPLANSKI Gilles
KARSENTY Gilles
KERBAUL François
KRAHN Martin
LAFFORGUE Pierre
LAGIER Jean-Christophe
LAMBAUDIE Eric
LANCON Christophe
LA SCOLA Bernard
LAUNAY Franck
LAVIEILLE Jean-Pierre
LE CORROLLER Thomas
LE TREUT Yves-Patrice Surnombre
LECHEVALLIER Eric
LEGRE Régis
LEHUCHER-MICHEL Marie-Pascale
LEONE Marc
LEONETTI Georges
LEPIDI Hubert
LEVY Nicolas
MACE Loïc
MAGNAN Pierre-Edouard
MARANINCHI Dominique Surnombre
MARTIN Claude Surnombre
MATONTI Frédéric
MEGE Jean-Louis
MERROT Thierry
METZLER/GUILLEMAIN Catherine
MEYER/DUTOUR Anne
MICCALEF/ROLL Joëlle
MICHEL Fabrice
MICHEL Gérard
MICHELET Pierre
MILH Mathieu
MOAL Valérie
MONCLA Anne
MORANGE Pierre-Emmanuel
MOULIN Guy
MOUTARDIER Vincent
MUNDLER Olivier Surnombre
NAUDIN Jean
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier
NICOLLAS Richard
OLIVE Daniel

OUAFIK L'Houcine
PAGANELLI Franck
PANUEL Michel
PAPAZIAN Laurent
PAROLA Philippe
PARRATTE Sébastien
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure
PELLETIER Jean
PETIT Philippe
PHAM Thao
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique
PIQUET Philippe
PIRRO Nicolas
POINSO François
RACCAH Denis
RAOULT Didier
REGIS Jean
REYNAUD/GAUBERT Martine
REYNAUD Rachel
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth
RIDINGS Bernard Surnombre
ROCHE Pierre-Hugues
ROCH Antoine
ROCHWERGER Richard
ROLL Patrice
ROSSI Dominique
ROSSI Pascal
ROUDIER Jean
SALAS Sébastien
SAMBUC Roland Surnombre
SARLES Jacques
SARLES/PHILIP Nicole
SCAVARDA Didier
SCHLEINITZ Nicolas
SEBAG Frédéric
SEITZ Jean-François
SIELEZNEFF Igor
SIMON Nicolas
STEIN Andréas
TAIEB David
THIRION Xavier
THOMAS Pascal
THUNY Franck
TREBUCHON-DA FONSECA Agnès
TRIGLIA Jean-Michel
TROPIANO Patrick
TSIMARATOS Michel
TURRINI Olivier
VALERO René
VAROQUAUX Arthur Damien
VELLY Lionel
VEY Norbert
VIDAL Vincent
VIENS Patrice
VILLANI Patrick
VITON Jean-Michel
VITTON Véronique
VIEHWEGER Heide Elke
VIVIER Eric
XERRI Luc

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal
AGHABABIAN Valérie
BELIN Pascal
CHABANNON Christian
CHABRIERE Eric
FERON François
LE COZ Pierre
LEVASSEUR Anthony
RANJEVA Jean-Philippe
SOBOL Hagay

PROFESSEUR CERTIFIE

BRANDENBURGER Chantal

PRAG

TANTI-HARDOUIN Nicolas

PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE *A MI-TEMPS*

ADNOT Sébastien
FILIPPI Simon

PROFESSEUR ASSOCIE *A TEMPS PARTIEL*

BURKHART Gary

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ACHARD Vincent (disponibilité)
ANGELAKIS Emmanouil
ATLAN Catherine (disponibilité)
BARTHELEMY Pierre
BARTOLI Christophe
BEGE Thierry
BELIARD Sophie
BERBIS Julie
BERGE-LEFRANC Jean-Louis
BEYER-BERJOT Laura
BIRNBAUM David
BONINI Francesca
BOUCRAUT Joseph
BOULAMERY Audrey
BOULLU/CIOCCA Sandrine
BUFFAT Christophe
CAMILLERI Serge
CARRON Romain
CASSAGNE Carole
CHAUDET Hervé
COZE Carole
DADOUN Frédéric (disponibilité)
DALES Jean-Philippe
DAUMAS Aurélie
DEGEORGES/VITTE Joëlle
DEL VOLGO/GORI Marie-José
DELLIAUX Stéphane
DESPLAT/JEGO Sophie
DEVEZE Arnaud Disponibilité
DUBOURG Grégory
DUFOUR Jean-Charles
EBBO Mikaël
FABRE Alexandre
FOLETTI Jean- Marc
FOUILLOUX Virginie
FROMONOT Julien
GABORIT Bénédicte
GASTALDI Marguerite
GELSI/BOYER Véronique
GIUSIANO Bernard
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie
GONZALEZ Jean-Michel
GOURIET Frédérique
GRAILLON Thomas
GRISOLI Dominique
GUENOUN MEYSSIGNAC Daphné
GUIDON Catherine
HAUTIER/KRAHN Aurélie
HRAIECH Sami
KASPI-PEZZOLI Elise
L'OLLIVIER Coralie
LABIT-BOUVIER Corinne
LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina
LAGIER Aude (disponibilité)
LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude
LEVY/MOZZICONACCI Annie
LOOSVELD Marie
MANCINI Julien
MARY Charles
MASCAUX Céline
MAUES DE PAULA André
MILLION Matthieu
MOTTOLA GHIGO Giovanna
NGUYEN PHONG Karine
NINOVE Laetitia
NOUGAIREDE Antoine
OLLIVIER Matthieu
OUDIN Claire
OVAERT Caroline
PAULMYER/LACROIX Odile
PERRIN Jeanne
RANQUE Stéphane
REY Marc
ROBERT Philippe
SABATIER Renaud
SARI-MINODIER Irène
SARLON-BARTOLI Gabrielle
SAVEANU Alexandru
SECQ Véronique
TOGA Caroline
TOGA Isabelle
TROUSSE Delphine
TUCHTAN-TORRENTS Lucile
VALLI Marc
VELY Frédéric
VION-DURY Jean
ZATTARA/CANNONI Hélène

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

ABU ZAINEH Mohammad
BARBACARU/PERLES T. A.
BERLAND/BENHAIM Caroline
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise
BOYER Sylvie
COLSON Sébastien
DEGIOANNI/SALLE Anna
DESNUES Benoît
MARANINCHI Marie
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky
MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte
POGGI Marjorie
RUEL Jérôme
STEINBERG Jean-Guillaume
THOLLON Lionel
THIRION Sylvie
VERNA Emeline

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

GENTILE Gaëtan

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS

BARGIER Jacques
BONNET Pierre-André
CALVET-MONTREDON Céline
GUIDA Pierre
JANCZEWSKI Aurélie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à MI-TEMPS

REVIS Joana

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à TEMPS-PLEIN

TOMASINI Pascale

PROFESSEURS DES UNIVERSITES et MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS
PROFESSEURS ASSOCIES, MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES mono-appartenants

ANATOMIE *4201*

CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)
LE CORROLLER Thomas (PU-PH)
PIRRO Nicolas (PU-PH)

GUENOUN-MEYSSIGNAC Daphné (MCU-PH)
LAGIER Aude (MCU-PH) disponibilité

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section)

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES *4203*

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)
DANIEL Laurent (PU-PH)
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)
GARCIA Stéphane (PU-PH)
XERRI Luc (PU-PH)

DALES Jean-Philippe (MCU-PH)
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)
MAUES DE PAULA André (MCU-PH)
SECQ Véronique (MCU-PH)

ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ; MEDECINE URGENCE *4801*

ALBANESE Jacques (PU-PH)
BRUDER Nicolas (PU-PH)
KERBAUL François (PU-PH)
LEONE Marc (PU-PH)
MARTIN Claude (PU-PH) Surnombre
MICHEL Fabrice (PU-PH)
MICHELET Pierre (PU-PH)
VELLY Lionel (PU-PH)

GUIDON Catherine (MCU-PH)

ANGLAIS *11*

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

BURKHART Gary (PAST)

BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE *5405*

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (PU-PH)

PERRIN Jeanne (MCU-PH)

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE *4301*

GUEDJ Eric (PU-PH)
GUYE Maxime (PU-PH)
MUNDLER Olivier (PU-PH) Surnombre
TAIEB David (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)
RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)
VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Téodora Adriana (MCF) (69ème section)

BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE ET TECHNOLOGIES DE COMMUNICATION *4604*

CLAVERIE Jean-Michel (PU-PH) Surnombre
GAUDART Jean (PU-PH)
GIORGI Roch (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)
DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)

ANTHROPOLOGIE *20*

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)
VERNA Emeline (MCF)

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE *4501*

CHARREL Rémi (PU PH)
DRANCOURT Michel (PU-PH)
FENOLLAR Florence (PU-PH)
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)
LA SCOLA Bernard (PU-PH)
RAOULT Didier (PU-PH)

ANGELAKIS Emmanouil (MCU-PH)
DUBOURG Grégory (MCU-PH)
GOURIET Frédérique (MCU-PH)
NOUGAIREDE Antoine (MCU-PH)
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)
LEVASSEUR Anthony (PR) (64ème section)
DESNUES Benoit (MCF) (65ème section)
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky (MCF) (87ème section)

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE *4401*

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)
ENJALBERT Alain (PU-PH) Surnombre
GABERT Jean (PU-PH)
GUIEU Régis (PU-PH)
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BUFFAT Christophe (MCU-PH)
FROMONOT Julien (MCU-PH)
MOTTOLA GHIGO Giovanna (MCU-PH)
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

BIOLOGIE CELLULAIRE *4403*

ROLL Patrice (PU-PH)

GASTALDI Marguerite (MCU-PH)
KASPI-PEZZOLI Elise (MCU-PH)
LEVY-MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)

CARDIOLOGIE *5102*

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)
BONELLO Laurent (PU PH)
BONNET Jean-Louis (PU-PH)
CUISSET Thomas (PU-PH)
DEHARO Jean-Claude (PU-PH)
FRANCESCHI Frédéric (PU-PH)
HABIB Gilbert (PU-PH)
PAGANELLI Franck (PU-PH)
THUNY Franck (PU-PH)

CHIRURGIE DIGESTIVE *5202*

BERDAH Stéphane (PU-PH)
HARDWIGSEN Jean (PU-PH)
LE TREUT Yves-Patrice (PU-PH) Surnombre
SIELEZNEFF Igor (PU-PH)

BEYER-BERJOT Laura (MCU-PH)

CHIRURGIE GENERALE *5302*

GIUSIANO Bernard (MCU-PH)
MANCINI Julien (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section)
BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE *5002*

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)
BLONDEL Benjamin (PU-PH)
CURVALE Georges (PU-PH)
FLECHER Xavier (PU PH)
PARRATTE Sébastien (PU-PH)
ROCHWERGER Richard (PU-PH)
TROPIANO Patrick (PU-PH)

OLLIVIER Matthieu (MCU-PH)

CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE *4702*

BERTUCCI François (PU-PH)
CHINOT Olivier (PU-PH)
COWEN Didier (PU-PH)
DUFFAUD Florence (PU-PH)
GONCALVES Anthony PU-PH)
HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)
LAMBAUDIE Eric (PU-PH)
MARANINCHI Dominique (PU-PH) Surnombre
SALAS Sébastien (PU-PH)
VIENS Patrice (PU-PH)

SABATIER Renaud (MCU-PH)

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE *5103*

COLLART Frédéric (PU-PH)
D'JOURNO Xavier (PU-PH)
DODDOLI Christophe (PU-PH)
GARIBOLDI Vlad (PU-PH)
MACE Loïc (PU-PH)
THOMAS Pascal (PU-PH)

FOUILLOUX Virginie (MCU-PH)
GRISOLI Dominique (MCU-PH)
TROUSSE Delphine (MCU-PH)

CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE *5104*

ALIMI Yves (PU-PH)
AMABILE Philippe (PU-PH)
BARTOLI Michel (PU-PH)
MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)
PIQUET Philippe (PU-PH)

SARLON-BARTOLI Gabrielle (MCU PH)

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE *4202*

GRILLO Jean-Marie (PU-PH) Surnombre
LEPIDI Hubert (PU-PH)

ACHARD Vincent (MCU-PH) disponibilité
PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE *5003*

BERBIS Philippe (PU-PH)
GAUDY/MARQUESTE Caroline (PU-PH)
GROB Jean-Jacques (PU-PH)
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

DUSI

COLSON Sébastien (MCF)

ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ; GYNECOLOGIE MEDICALE *5404*

BRUE Thierry (PU-PH)
CASTINETTI Frédéric (PU-PH)

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION *4601*

AUQUIER Pascal (PU-PH)
BOYER Laurent (PU-PH)
CHABOT Jean-Michel (PU-PH)
GENTILE Stéphanie (PU-PH)
SAMBUC Roland (PU-PH) Surnombre
THIRION Xavier (PU-PH)

DELPERO Jean-Robert (PU-PH)
MOUTARDIER Vincent (PU-PH)
SEBAG Frédéric (PU-PH)
TURRINI Olivier (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)
BIRNBAUM David (MCU-PH)

CHIRURGIE INFANTILE *5402*

GUYS Jean-Michel (PU-PH)
JOUVE Jean-Luc (PU-PH)
LAUNAY Franck (PU-PH)
MERROT Thierry (PU-PH)
VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE *5503*

CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)
GUYOT Laurent (PU-PH)

FOLETTI Jean-Marc (MCU-PH)

CHIRURGIE PLASTIQUE,

RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛLOLOGIE *5004*

CASANOVA Dominique (PU-PH)
LEGRE Régis (PU-PH)

HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE *5201*

BARTHET Marc (PU-PH)
BERNARD Jean-Paul (PU-PH)
BOTTA-FRIDLUND Danielle (PU-PH)
DAHAN-ALCARAZ Laetitia (PU-PH)
GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)
GRANDVAL Philippe (PU-PH)
GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)
SEITZ Jean-François (PU-PH)
VITTON Véronique (PU-PH)

GONZALEZ Jean-Michel (MCU-PH)

GENETIQUE *4704*

BEROUD Christophe (PU-PH)
KRAHN Martin (PU-PH)
LEVY Nicolas (PU-PH)
MONCLA Anne (PU-PH)
SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

NGYUEN Karine (MCU-PH)
TOGA Caroline (MCU-PH)
ZATTARA/CANNONI Hélène (MCU-PH)

GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE *5403*

AGOSTINI Aubert (PU-PH)
BOUBLI Léon (PU-PH)
BRETELLE Florence (PU-PH)
CARCOPINO-TUSOLI Xavier (PU-PH)
COURBIERE Blandine (PU-PH)
CRAVELLO Ludovic (PU-PH)
D'ERCOLE Claude (PU-PH)

BERBIS Julie (MCU-PH)
LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)
TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

IMMUNOLOGIE *4703*

KAPLANSKI Gilles (PU-PH)
MEGE Jean-Louis (PU-PH)
OLIVE Daniel (PU-PH)
VIVIER Eric (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)
DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)
DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)
ROBERT Philippe (MCU-PH)
VELY Frédéric (MCU-PH)

BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES *4503*

BROUQUI Philippe (PU-PH)
LAGIER Jean-Christophe (PU-PH)
PAROLA Philippe (PU-PH)
STEIN Andréas (PU-PH)

MILLION Matthieu (MCU-PH)

MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT ; MEDECINE GENERALE ; ADDICTOLOGIE *5301*

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)
DISDIER Patrick (PU-PH)
DURAND Jean-Marc (PU-PH)
FRANCES Yves (PU-PH) Surnombre
GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)
HARLE Jean-Robert (PU-PH)
ROSSI Pascal (PU-PH)
SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH)

EBBO Mikael (MCU-PH)

GENTILE Gaëtan (MCF Méd. Gén. Temps plein)

ADNOT Sébastien (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)
FILIPPI Simon (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

BARGIER Jacques (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)
BONNET Pierre-André (MCF associé Méd. Gén à mi-temps)
CALVET-MONTREDON Céline (MCF associé Méd. Gén. à temps plein)
GUIDA Pierre (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
JANCZEWSKI Aurélie (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

NUTRITION *4404*

DARMON Patrice (PU-PH)
RACCAH Denis (PU-PH)
VALERO René (PU-PH)

ATLAN Catherine (MCU-PH) disponibilité
BELIARD Sophie (MCU-PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)

CHABANNON Christian (PR) (66ème section)
SOBOL Hagay (PR) (65ème section)

OPHTALMOLOGIE *5502*

DENIS Danièle (PU-PH)
HOFFART Louis (PU-PH)
MATONTI Frédéric (PU-PH)
RIDINGS Bernard (PU-PH) Surnombre

HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION *4701*

BLAISE Didier (PU-PH)
COSTELLO Régis (PU-PH)
CHIARONI Jacques (PU-PH)
GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)
MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)
VEY Norbert (PU-PH)

GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)
LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)
LOOSVELD Marie (MCU-PH)

POGGI Marjorie (MCF) (64ème section)

MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE *4603*

LEONETTI Georges (PU-PH)
PELISSIER/ALICOT Anne-Laure (PU-PH)
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

BARTOLI Christophe (MCU-PH)
TUCHTAN-TORRENTS Lucile (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)

MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION *4905*

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)
VITON Jean-Michel (PU-PH)

MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL *4602*

LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (PU-PH)

BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)
SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

NEPHROLOGIE *5203*

BERLAND Yvon (PU-PH) Surnombre
BRUNET Philippe (PU-PH)
BURTEY Stépahne (PU-PH)
DUSSOL Bertrand (PU-PH)
JOURDE CHICHE Noémie (PU PH)
MOAL Valérie (PU-PH)

NEUROCHIRURGIE *4902*

DUFOUR Henry (PU-PH)
FUENTES Stéphane (PU-PH)
REGIS Jean (PU-PH)
ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)
SCAVARDA Didier (PU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)
GRAILLON Thomas (MCU PH)

NEUROLOGIE *4901*

ATTARIAN Sharham (PU PH)
AUDOIN Bertrand (PU-PH)
AZULAY Jean-Philippe (PU-PH)
CECCALDI Mathieu (PU-PH)
EUSEBIO Alexandre (PU-PH)
FELICIAN Olivier (PU-PH)
PELLETIER Jean (PU-PH)

PEDOPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE *4904*

DA FONSECA David (PU-PH)
POINSO François (PU-PH)

OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE *5501*

DESSI Patrick (PU-PH)
FAKHRY Nicolas (PU-PH)
GIOVANNI Antoine (PU-PH)
LAVIEILLE Jean-Pierre (PU-PH)
NICOLLAS Richard (PU-PH)
TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)

DEVEZE Arnaud (MCU-PH) Disponibilité

REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE *4502*

DESSEIN Alain (PU-PH) Surnombre

CASSAGNE Carole (MCU-PH)
L'OLLIVIER Coralie (MCU-PH)
MARY Charles (MCU-PH)
RANQUE Stéphane (MCU-PH)
TOGA Isabelle (MCU-PH)

PEDIATRIE *5401*

ANDRE Nicolas (PU-PH)
CHAMBOST Hervé (PU-PH)
DUBUS Jean-Christophe (PU-PH)
GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH)
MICHEL Gérard (PU-PH)
MILH Mathieu (PU-PH)
REYNAUD Rachel (PU-PH)
SARLES Jacques (PU-PH)
TSIMARATOS Michel (PU-PH)

COZE Carole (MCU-PH)
FABRE Alexandre (MCU-PH)
OUDIN Claire (MCU-PH)
OVAERT Caroline (MCU-PH)

PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE *4903*

BAILLY Daniel (PU-PH)
LANCON Christophe (PU-PH)
NAUDIN Jean (PU-PH)

'CHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PCYCHOLOGIE SOCIALE 16

AGHABABIAN Valérie (PR)

RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE *4302*

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)
CHAGNAUD Christophe (PU-PH)
CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)
GIRARD Nadine (PU-PH)
GORINCOUR Guillaume (PU-PH)
JACQUIER Alexis (PU-PH)
MOULIN Guy (PU-PH)
PANUEL Michel (PU-PH)
PETIT Philippe (PU-PH)
VAROQUAUX Arthur Damien (PU-PH)
VIDAL Vincent (PU-PH)

REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE *4802*

GAINNIER Marc (PU-PH)
GERBEAUX Patrick (PU-PH)
PAPAZIAN Laurent (PU-PH)
ROCH Antoine (PU-PH)

HRAIECH Sami (MCU-PH)

RHUMATOLOGIE *5001*

GUIS Sandrine (PU-PH)
LAFFORGUE Pierre (PU-PH)
PHAM Thao (PU-PH)
ROUDIER Jean (PU-PH)

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE - PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE *4803*

BLIN Olivier (PU-PH)
FAUGERE Gérard (PU-PH) Surnombre
MICALLEF/ROLL Joëlle (PU-PH)
SIMON Nicolas (PU-PH)

BOULAMERY Audrey (MCU-PH)
VALLI Marc (MCU-PH)

PHILOSPHIE *17*

LE COZ Pierre (PR) (17ème section)

PHYSIOLOGIE *4402*

BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH)
BREGEON Fabienne (PU-PH)
MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)
TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (PU-PH)

BARTHELEMY Pierre (MCU-PH)
BONINI Francesca (MCU-PH)
BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH)
DADOUN Frédéric (MCU-PH) (disponibilité)
DEL VOLGO/GORI Marie-José (MCU-PH)
DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)
GABORIT Bénédicte (MCU-PH)
REY Marc (MCU-PH)

LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise (MCF) (40ème section) Retraite 1/5/2018
RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)
STEINBERG Jean-Guillaume (MCF) (66ème section)
THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE *5101*

ASTOUL Philippe (PU-PH)
BARLESI Fabrice (PU-PH)
CHANEZ Pascal (PU-PH)
CHARPIN Denis (PU-PH) Surnombre
GREILLIER Laurent (PU PH)
REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

MASCAUX Céline (MCU-PH)

TOMASINI Pascale (Maitre de conférences associé des universités)

THERAPEUTIQUE; MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE *4804*

AMBROSI Pierre (PU-PH)
BARTOLIN Robert (PU-PH) Surnombre
VILLANI Patrick (PU-PH)

DAUMAS Aurélie (MCU-PH)

UROLOGIE *5204*

BASTIDE Cyrille (PU-PH)
KARSENTY Gilles (PU-PH)
LECHEVALLIER Eric (PU-PH)
ROSSI Dominique (PU-PH)

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A Madame la Professeure Florence Duffaud,

Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour votre accueil lors de mes débuts d'interne et dans la suite de mon cursus. Votre confiance et votre bienveillance tout au long de ce parcours m'ont permis de progresser et de prendre confiance en moi.

A Monsieur le Professeur Salas Sébastien,

Merci pour votre aide, votre écoute et vos conseils tout au long de ce travail de thèse.
Merci d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Je suis très honorée de pouvoir continuer à travailler avec vous par la suite.

A Madame le Docteur Corinne Bouvier,

Merci beaucoup pour votre gentillesse, vos conseils et votre disponibilité durant tout ce travail de thèse. Ça a été un réel plaisir de travailler avec vous.

A Monsieur le Professeur Francois Bertucci,

Je suis sincèrement honorée de votre participation à ce jury de thèse et vous en remercie.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A ma mère et mon père sans qui je ne serai pas la femme que je suis actuellement. Vous m'avez toujours entourée d'amour dans les bons moments comme dans les descentes… Votre soutien indéfectible pendant ces presque 30 ans de mon existence ont fait de moi une femme accomplie et heureuse. Et maintenant que j'ai mes enfants, je sais à quel point rien n'est facile quand on est parents, on fait des erreurs on tâtonne en n'ayant toujours comme seul objectif que nos enfants soient épanouis. Vous avez largement réussi, je vous aime tellement. Soyez fiers.

A ma sœur Oriane et à mon frère Florian avec qui j'ai passé des années d'insouciance, de bonheur et de rigolade. Vous êtes deux piliers de ma vie. A tous nos souvenirs de vacances que j'aime à me remémorer et à tous nos souvenirs futurs qui je l'espère seront aussi heureux. Je vous aime fort.

A Mercedes et Yves, pas évident de trouver son équilibre dans nos foyers recomposés, mais tout s'apaise et je suis très heureuse maintenant de vous avoir comme belle-mère et beau-père. Je sais que vous avez dû faire preuve de patience et de ténacité, alors merci pour ce temps que vous avez pris pour laisser les choses se faire sereinement. Prenez soin de mon père et de ma mère, aimez-les comme ils le méritent.

A Thibault, mon double, mon alter ego, l'amour de toute ma vie. Tu es mon foyer, mes racines et ma ressource. Je n'aurais jamais cru qu'un regard pouvait changer si profondément une vie. On a grandi ensemble, on a vieilli, on a ri, on a pleuré, on s'est fait un peu de mal, on a rêvé, on a voyagé et on n'a jamais cessé de s'aimer. Tu es ma force, et tu sais quelle part importante tu as joué aussi dans celle que je suis devenue. Aux soixante prochaines années de notre vie mon amour ! Et surtout, surtout, JOYEUX ANNIVERSAIRE mon chéri, à tes 30 ans !

A Raphaël, mon fils, mon premier né. 3 ans et demi que tu as débarqué dans nos vies, et on ne se lasse pas de te voir grandir. Tu as rendu nos vies légères. Tu es une bulle, un soleil. Que tu grandisses toujours dans notre amour. Je t'aime des antilopes et des lions…

A Diane, crois en toi, ne te laisse pas impressionner par les autres. Tu vaudras toujours autant sinon plus qu'eux. Ton père et moi serons toujours là pour toi, t'aimer, te soutenir, te chérir et te rendre la vie plus douce. Je t'aime fort.

A ma belle-famille, Véronique, Clémentine, Lucas, Marion avec qui j'ai partagé des moments doux et joyeux.

A ma belle-famille du Nord, Ralph, Carol, Abigaël, Sara, Anouk qui m'ont toujours accueillie avec amour et bienveillance.

A mes grands-parents

Merci à l'équipe du docteur **Sylviane Olschwang**, plus particulièrement à **Arnaud Lagarde**, pour ses explications précieuses tout au long de ce travail, pour son aide plus que cruciale pour les manipulations, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Un grand merci également à **Aurélie Fabre** pour sa disponibilité, son aide dans le tri de variants, et son écoute**.**

A Marie-Aimée, j'ai longtemps été méfiante en amitié jusqu'à ce que je te rencontre. Avec toi je suis toute entière avec mes forces et mes faiblesses. Tu m'as rendue l'internat plus léger. Je chéris nos souvenirs et ne me lasse pas de relire toutes nos anecdotes, et toutes nos bourdes partagées ensemble. Tu es une personne magnifique. Que l'on partage encore plein de jolis moments ensemble mon amie ! Te quiero !

A Myriam, toi qui a été notre assistante en OM3. Qu'est-ce que ça a été agréable de travailler avec toi. J'admire ton humeur toujours égale, ta gentillesse, ton efficacité. Ça a été un vrai plaisir de passer ces 6 mois avec toi et j'ai adoré remettre ça à l'hôpital de jour. Tu sais tout le bien que je pense de toi.

A Nathalie, et Béatrice, et à toutes nos soirées, entre discussions sérieuses et futilités. Tous ces moments qui sont autant de parenthèses agréables dans un quotidien parfois stressant et trop speed. J'adore partager ces moments avec vous, et Raphaël aussi qui aime bien voir l'Italie ! Vous êtes deux amies formidables.

A Isabelle, rencontrée autour d'une table de médecin légiste et retrouvée en onco. Il ne faut pas se fier à ta discrétion première, car tu es vraiment drôle et j'aime passer du temps avec toi.

A Marine, Loriane, Fanny, Camille et Emilie qui ont accompagné mes premiers pas d'étudiante en médecine. Il est plus dur de se voir maintenant (les enfants, le travail, la distance) mais je ne vous oublie pas. J'ai passé de très belles années à vos côtés. Soyez heureuses dans vos vies et votre travail.

A Clothilde, à 10 jours près on a vécu la même expérience révolutionnaire !

A mes co-internes avec qui j'aime échanger, discuter, rigoler

A Maeva et Mathilde, à nos 6 mois d'hôpital de jour, un peu débordées, mais c'était chouette de travailler avec vous.

A Marie et Marjorie

A Remi, un peu grande gueule (tu le sais, mais c'est pour ça qu'on t'aime) mais tellement drôle. C'est toujours un plaisir de te retrouver.

A Arnaud, une sorte de Myriam au masculin, toujours de bonne humeur

A Thomas, calme, souriant, efficace

A Alice, discrète et souriante, sois heureuse

A Coline, dynamique, un chouia speed, mais tellement drôle, j'espère que l'on travaillera encore ensemble car l'on ne s'ennuie pas avec toi

A Ferdinand, la tornade. Rencontré à la greffe, attention cet hémato fait déménager le quotidien. Là aussi on ne s'ennuie pas. Tu m'as fait voyager cette année lors de ton road trip américain. A très vite pour la suite

A Catalina, Valerio, et Sandrine mes co-internes de la greffe ça a été un réel plaisir de faire votre connaissance et de travailler avec vous.

A tous ceux avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler : Brice, Emmanuel, Domitille, Philippe, Alexandre, Morgane, Marie, Axel

A tous les médecins qui m'ont aidée et m'ont fait progresser dans ce parcours pas toujours évident de l'internat

A Jean-Laurent qui surveille toujours de façon active ma moitié lorsque celle-ci daigne se rappeler que ce n'était pas une rhino. Merci pour ton soutien dans cette étape de notre vie. On ne s'ennuie pas avec toi. J'admire ton dynamisme, ta compétence.

A Charlotte, derrière ta réserve, tu n'es en réalité pas la dernière à rire. J'aime bien cette façon détachée que tu as de lâcher un bon mot, une phrase un peu piquante.

A Marie, chat noir, et à mes 3 mois d'initiation aux soins palliatifs.

A Frédérique, Cécile, et Louis, c'est toujours un plaisir de travailler avec vous. Vous faites une belle équipe.

A la dream team de la greffe qui a réussi à me faire aimer l'hémato malgré mon appréhension initiale : **Sabine, Catherine, Samia, Raynier, Faizeh, Angela, Stefania, Beatrice, Laurence**, cela a été un réel enrichissement de travailler avec vous. Vous m'avez beaucoup appris.

A Renaud, Delphine et Anne qui m'ont initiée à l'oncologie thoracique

A toutes les IDEPS formidables qui par leurs connaissances m'ont évité quelques écueils. Bienveillance et bonne humeur toujours au rendez-vous avec vous, sans oublier rigueur et efficacité : Merci **Sandrine**, Merci **Vanessa**, Merci **Salima**, Merci **Julie,** Merci **Laurence**, Merci **Hanane**. Vous êtes juste au top, restez comme vous êtes, rien à changer.

A toutes les infirmières que j'ai croisées, qui m'ont aidées, m'ont appris, n'ont pas été jugeantes.

Merci aux patients

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS **2**

1. INTRODUCTION **3**
1.1. Epidémiologie 3
1.2. Clinique 3
1.3. Histologie 5
1.4. Traitement 5
1.5. Génétique 7
1.6. Problématique 8
1.7. Objectifs 9

2. MATERIEL ET METHODES **10**
2.1. Population d'étude 10
2.2. Extraction de l'ADN 10
2.3. Préparation des banques 11
2.4. Séquençage 14
2.5. Sélection des variants 16
2.6. Identification des voies biologiques et des gènes potentiellement actionnables 20

3. RESULTATS **21**
3.1. Population d'étude 21
3.2. Analyse des mutations 21
3.3. Analyse des voies biologiques 24
3.4. Analyse des cibles potentielles 26

4. DISCUSSION **28**
4.1. Les limites techniques 28
4.2. Les différents aspects de la résistance tumorale 30
4.3. Validité des cibles identifiées ? 30
4.4. Les différentes voies biologiques et les gènes impliqués 31

5. CONCLUSION **33**

6. ANNEXES **34**

7. BIBLIOGRAPHIE **39**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide RiboNucléique

BR : Bons Répondeurs

CNV: Copy Number Variation

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

GATK: Genome Analysis Tool Kit

GnomAD: Genome Aggregation Database

GST: Gène Suppresseur de Tumeur

HSF: Human Splicing Finder

ICGC: International Cancer Genome Consortium

IGV: Integrative Genomics Viewer

IL: Interleukine

Indels: Insertions/Délétions

LDH : Lactate Déshydrogénase

MAP : Methotrexate Adriamycine Cisplatine

MR : Mauvais Répondeurs

MSI : MicroSatellite Instability

MSS : MicroSatellite Stability

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

p*: p-valeur ajustée

pb : Paires de Bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

RC: Rémission Complète

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

SNV: Single Nucleotide Variation

TKI: Inhibiteur de Tyrosine Kinase

VarAFT: Variant Annotation and Filtering Tool

1. INTRODUCTION

1.1. EPIDEMIOLOGIE

Les ostéosarcomes sont des tumeurs osseuses primitives qui se caractérisent par la formation d'os ou d'ostéoïde par des cellules tumorales. Bien que rares, avec une incidence d'environ 5 cas par millions et par an, ils représentent le troisième cancer le plus fréquent chez les enfants entre 12 et 18 ans derrière les leucémies et les lymphomes[1]. Dans sa forme non métastatique, la survie globale à 5 ans est de 70%[2]. Cependant, malgré un traitement agressif, près de 30 à 40% des patients rechutent le plus souvent sous une forme métastatique pulmonaire[3].

Les principaux facteurs pronostiques cliniques des formes non métastatiques sont l'âge, le sexe, la localisation et la taille tumorale. Ainsi sont considérés comme des facteurs pronostiques péjoratifs un âge au diagnostic supérieur à 60 ans, le sexe masculin, la localisation axiale et une taille tumorale de plus de 10 centimètres. Sur le plan paraclinique, les facteurs pronostiques péjoratifs retenus sont un taux supérieur à la normale de LDH et de phosphatases alcalines[4–8]. Cependant, le principal facteur pronostique indépendant est avant tout histologique, correspondant au pourcentage de nécrose obtenu à l'issue de la chimiothérapie néoadjuvante sur la pièce opératoire, et correspondant au grading de Huvos[8–10]. Les patients avec au moins 90% de nécrose tumorale sont alors définis comme bons répondeurs et à l'inverse les patients avec moins de 90% de nécrose sur pièce opératoire sont définis comme des mauvais répondeurs. Ainsi la survie globale à 5 ans chez les patients bons répondeurs est évaluée à 75-80% alors qu'elle n'est que de 50% chez les mauvais répondeurs[8].

1.2. CLINIQUE

La maladie est le plus souvent révélée par une douleur persistante entraînant une limitation dans les activités quotidiennes et des réveils nocturnes. On retrouve parfois un syndrome de masse. Plus rarement la pathologie est révélée par une fracture pathologique. Les ostéosarcomes peuvent se développer à partir de tous les os du corps mais touchent en priorité la métaphyse des os longs ; les trois topographies préférentielles de cette tumeur étant la partie distale du fémur, la partie proximale du tibia et la partie proximale de l'humérus[11]. Au diagnostic, la maladie est le plus souvent localisée, et est métastatique d'emblée dans 15 à 20% des cas, le plus souvent au niveau pulmonaire.

Le bilan paraclinique comprend une IRM du membre atteint qui permet outre l'évaluation de la taille tumorale, la recherche de *skip* métastases et l'évaluation de l'extension aux parties

Osteosarcoma Types
Central
High-grade
Conventional
Telangiectatic
Small cell
Epithelioid
Osteoblastoma-like
Chondroblastoma-like
Fibrohistiocytic
Giant cell–rich
Low-grade
Low-grade central
Fibrous dysplasia–like
Desmoplastic fibroma–like
Surface
Low-grade
Parosteal
Intermediate-grade
Periosteal
High-grade
Dedifferentiated parosteal
High-grade surface
Intracortical
Gnathic
Extraskeletal
High-grade
Low-grade

Tableau 1. Les différentes formes histologiques d'ostéosarcome
Klein, M. J. & Siegal, G. P. Osteosarcoma: Anatomic and Histologic Variants. *American Journal of Clinical Pathology* 125, 555–581 (2006).

molles. Le bilan d'extension nécessite un scanner thoracique à la recherche de localisations secondaires pulmonaires.

1.3. HISTOLOGIE

Il existe une large variété histologique d'ostéosarcomes. Les ostéosarcomes primaires sont divisés en trois catégories en fonction de leur localisation; les ostéosarcomes centraux, développés à partir de la cavité médullaire de la métaphyse des os longs, les ostéosarcomes de surface, et les ostéosarcomes de siège intracortical. Les ostéosarcomes peuvent être de haut grade de malignité (ostéosarcomes conventionnels centraux), de grade intermédiaire de malignité (ostéosarcomes périostés) ou de bas grade de malignité (ostéosarcomes paraostéaux). Les ostéosarcomes conventionnels sont la forme histologique la plus représentée et sont eux-mêmes divisés en 3 sous-types en fonction de la matrice extracellulaire la plus représentée. On distingue ainsi les ostéosarcomes conventionnels de type fibroblastique, ostéoblastique et chondroblastique (**Tableau 1**). Il est à noter que cette distinction n'impacte pas les modalités de traitement, et que la survie pour ces 3 sous-types est comparable[12,13].

1.4. TRAITEMENT

Le traitement des ostéosarcomes est multimodal et agressif. La principale révolution dans leur prise en charge a reposé sur l'avènement de la chimiothérapie adjuvante permettant de passer d'une survie globale de 20% à 70%[14,15]. La séquence thérapeutique comprend actuellement une chimiothérapie néoadjuvante, qui dans les formes pédiatriques, associe Methotrexate hautes doses, ifosfamide et VP16, suivie d'une chirurgie carcinologique puis d'une chimiothérapie adjuvante[16]. Le choix de la chimiothérapie adjuvante est guidé par le grading de Huvos. Les patients « bons répondeurs » reçoivent le même schéma thérapeutique que celui reçu en néoadjuvant, alors que les patients « mauvais répondeurs » reçoivent une association Methotrexate hautes doses, adriamycine et cisplatine (**Figure 1**). A l'issue de la chimiothérapie néoadjuvante la répartition est classiquement de moitié entre bons et mauvais répondeurs[2].

Outre l'amélioration de la survie globale, la chimiothérapie néoadjuvante a permis de modifier les pratiques chirurgicales, permettant de passer d'une chirurgie radicale à une chirurgie conservatrice dans environ 80% des cas[17,18]. Cependant depuis les années 70, le traitement de l'ostéosarcome a été peu modifié avec échec de la plupart des essais cliniques.

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Chimio	M	M	M	VI			M	M	VI			M	M	Chirurgie

BR

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Chimio	M	M	M	VI			M	M	M	VI			M	M	M	I			M	M	M		

MR

Semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Chimio	M	AP			M	AP			M	AP			M	AP			M	AP					

M= Methotrexate 12g/m² J1

V= VP 16 75mg/m²/j J1-J4

I= Ifosfamide 3g/m² J1-J4

A=Adriamycine 37,5mg/m²/j J1-J2

C= Cisplatine 120mg/m²J2

Figure 1 : Modalités thérapeutiques des ostéosarcomes pédiatriques

Ainsi dans l'essai EURAMOS 1 l'adjonction de l'immunothérapie par Interféron en adjuvant chez les patients bons répondeurs a échoué à améliorer leur survie[19]. De même une chimiothérapie intensive par MAP Ifosfamide et Etoposide en adjuvant chez les patients mauvais répondeurs a également échoué à changer leur pronostic[20].

En ce qui concerne les thérapies ciblées, l'émergence de ces drogues dans cette pathologie est rendue difficile par sa rareté, sa complexité génétique, et la poursuite d'une évaluation RECIST qui probablement sous-estime les taux de réponses et empêche la poursuite du développement clinique de ces molécules au cours des phases précoces[21].

1.5. GENETIQUE

La plupart des ostéosarcomes sont sporadiques. Cependant certaines mutations germinales augmentent le risque d'ostéosarcome. Ainsi le syndrome de Li Fraumeni dû à une mutation germinale du gène *TP53* entraîne une augmentation du risque de développer un ostéosarcome avec une incidence de 12%[22]. De même les mutations germinales du gène *RB1* entraînent un doublement du risque de développer un ostéosarcome par rapport à la population générale[23]. Les autres syndromes génétiques à risque sont le syndrome de Rothmund Thomson, le syndrome de Bloom et le syndrome de Werner respectivement dus à des mutations des gènes *RECQL4*,*RECQL2* et *RECQL3*[24].

L'étude des ostéosarcomes sur un plan génétique est rendue difficile par deux points essentiels, d'une part la rareté de ces tumeurs, d'autre part leur hétérogénéité intra et intertumorale[25]. Il est intéressant de noter que sur le plan mutationnel les ostéosarcomes pédiatriques ont plutôt tendance à se comporter comme des tumeurs de l'adulte et non des tumeurs de l'enfant. Les tumeurs pédiatriques présentent un taux moyen de mutations somatiques faible de 0,1 mutation par mégabase, avec quelques variations en fonction du type histologique, pouvant atteindre jusqu'à 0,5 mutation par mégabase dans le neuroblastome et le médulloblastome qui font partie des tumeurs pédiatriques génétiquement les plus remaniées[26]. A l'inverse les ostéosarcomes ont un taux moyen de mutations somatiques de 1,2 mutations par mégabase ce qui aurait tendance à les rapprocher par exemple du cancer du sein[26,27]. Ce phénomène contribue en partie à expliquer l'hétérogénéité de ces tumeurs.

Afin de mieux comprendre l'oncogenèse et de tenter de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques, quelques équipes se sont intéressées au séquençage des ostéosarcomes. En 2014, Chen a réalisé le séquençage de 34 échantillons d'ostéosarcomes

issus de population pédiatrique. Il s'agissait d'une analyse « whole genome » à partir à la fois de biopsies pré-thérapeutiques de la tumeur initiale mais également de métastases. Chen et son équipe ont mis en évidence des mutations récurrentes dans 4 gènes, *TP53*, *RB1*, *ATRX* et *DLG2*.

La même année, Perry et son équipe ont réalisé un séquençage « whole exome » à partir de 59 échantillons d'ostéosarcomes de patients adultes et pédiatriques dont la moitié était métastatique. Ils ont mis en évidence une moyenne de 1.2 mutations par mégabase et 230 réarrangements par tumeur. Presque 25% des patients présentaient une altération dans la voie PI3K/AKT/mTOR et un tiers présentaient une altération potentiellement « ciblable »[27]. En 2015, Kovac et son équipe ont réalisé un séquençage « whole exome » à partir de 123 échantillons d'ostéosarcomes de patients adultes et pédiatriques. Ils ont mis en évidence 14 gènes comme étant les principaux « drivers » dans cette pathologie. Dans 47% des cas des mutations de *TP53* ou *RB1* expliquaient le processus de sarcomatogenèse. Dans 40% des cas, ce processus était expliqué par une mutation dans l'un de ces 12 autres drivers : *BRCA2*, *BAP1*, *RET*, *PTEN*, *MUTYH*, *ATM*,*WRN*, *RECQL4*, *ATRX*, *FANCA*, *NUMA1* et *MDC1*[28]. Ces études de séquençage soulignent le rôle clé de l'implication de *TP53* et *RB1* dans la sarcomatogenèse, *TP53* étant retrouvé muté ou inactivé via d'autres mécanismes (amplification de COPS3 ou de MDM2) dans 47 à 90% des cas. L'inactivation de RB1 est elle retrouvée dans 47 à 61% des cas. Plus récemment, Livingstone et son équipe ont réalisé un séquençage de mutations hotspots et une étude d'altérations du nombre de copies sur 64 échantillons de patients pédiatriques et adultes présentant des ostéosarcomes récurrents ou métastatiques. Les mutations les plus fréquemment mise en évidence concernaient *TP53* avec seize mutations mises en évidence et *RB1*, avec onze mutations mises en évidence. Une altération génétique potentiellement actionnable était retrouvée chez un tiers de l'effectif[29].

Il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée de séquençage permettant de différencier dès le diagnostic les patients bons répondeurs (BR) des patients mauvais répondeurs (MR).

1.6. PROBLEMATIQUE

Depuis l'avènement de la chimiothérapie dans les ostéosarcomes il y a presque trente ans, le pronostic de cette pathologie n'a pas évolué. Avec une survie globale à 5 ans de 50% pour les mauvais répondeurs et un risque de rechute métastatique nettement plus élevé que les bons répondeurs, il semble essentiel de pouvoir identifier dès le diagnostic cette catégorie de patients. En effet les modifications de traitement en post-opératoire (par exemple,

chimiothérapie intensive) n'ont pas permis d'améliorer la survie chez ces patients et il semblerait qu'agir en amont en leur proposant dès le diagnostic un traitement différentiel pourrait être intéressant[20]. D'autre part les études de séquençage pourraient permettre de mettre en évidence de possibles cibles récurrentes exploitables sur un plan thérapeutique.

1.7. OBJECTIFS

Les études de séquençage actuelles ont été jusqu'ici réalisées dans des populations très hétérogènes (pédiatrique et adulte / non métastatique et métastatique) et non corrélées aux données cliniques. Il semblait ainsi utile et innovant de réaliser une étude de séquençage dans une population homogène pour laquelle nous disposions des données cliniques et notamment du statut BR ou MR à la chimiothérapie néoadjuvante. La population sélectionnée est donc exclusivement une population pédiatrique non métastatique au diagnostic prise en charge au CHU de la Timone à Marseille ou au CHU de Toulouse. Les gènes d'intérêt ont été sélectionnés à partir de la publication de Kovac et al. correspondant aux gènes retrouvés mutés à partir d'une analyse « whole exome » de 31 ostéosarcomes[28] (**Annexe 1**). Les objectifs de ce travail ont été de réaliser un séquençage de 523 gènes d'intérêt à partir des biopsies congelées pré-thérapeutiques, et de corréler les données obtenues à la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante afin de déterminer s'il existe des mutations ou des gènes récurrents permettant de distinguer dès le diagnostic les bons répondeurs des mauvais répondeurs. L'objectif secondaire est de déterminer les cibles thérapeutiques exploitables dans cette pathologie.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1.POPULATION D'ETUDE

La population d'étude correspond à une population pédiatrique non métastatique au diagnostic pour laquelle un fragment biopsique a été conservé et congelé au moment de la prise en charge. Les prélèvements ont été examinés et contrôlés par un cytopathologiste. Tous les patients ont bénéficié du même régime de chimiothérapie néoadjuvante par Methotrexate, VP16, Ifosfamide. Tous les patients ou leurs représentants légaux ont signé un formulaire de consentement pour une analyse génétique tumorale et constitutionnelle.

2.2. EXTRACTION DE L'ADN

Vingt biopsies congelées ont été déstockées auprès de la tumorothèque de l'hôpital de la Timone, et quatre prélèvements provenaient de la tumorothèque de Toulouse. L'extraction a été réalisée grâce au kit Allprep DNA/RNA kit® de la marque QIAGEN. Dans un premier temps le fragment de biopsie contenu dans un tube Eppendorf 1,5 ml a été placé dans un mortier contenant de l'azote liquide et broyé avec un pilon. Une fois le matériel réduit en fine poudre, 350 à 600µl de tampon Buffer RLT-plus et 3,5 µl de β mercapthoéthanol ont été ajoutés. Des étapes de lavage sur colonne puis une étape finale d'élution avec du Buffer EB, selon le protocole du fournisseur, permettait l'extraction de l'ADN. L'ensemble des échantillons ont bénéficié d'une étape de « clean up » afin d'améliorer les rapports d'absorbance 260/230 et 260/280. L'ADN était quantifié initialement par Nanodrop®, ce qui permettait également d'estimer la pureté de nos échantillons. Dans un deuxième temps, une quantification Qubit®, permettant de doser spécifiquement l'ADN double brin, était réalisée avant de débuter la préparation des banques.

Pour vingt et un de ces échantillons, des blocs de paraffine obtenus après chimiothérapie néoadjuvante à partir de la pièce opératoire ont pu être récupérés. Pour chacun de ces blocs une lecture anatomopathologique a permis de repérer les zones de tissus sains à récupérer afin de procéder à l'extraction de l'ADN de tissu normal. Cette extraction a été réalisée grâce au kit QIAamp DNA mini de la marque QIAGEN. Pour ce faire, nous récupérions de fins copeaux de tissus à l'aide d'un scalpel dans les zones préalablement cerclés avant d'ajouter 360µl de tampon ATL permettant une lyse tissulaire. Les protéines étaient ensuite digérées grâce à l'adjonction de 40µl de protéinase K. Des étapes de lavage sur colonne étaient ensuite réalisées avant de procéder à l'élution avec de l'eau permettant l'extraction de l'ADN. De

même que pour l'ADN tumoral, l'ADN extrait du tissu normal était dosé à la fois par Nanodrop® et par Qubit®. Malheureusement l'extraction d'ADN du tissu sain à partir des blocs de paraffine n'a pas permis de récupérer suffisamment de matériel pour quatorze échantillons, et ce malgré des tentatives de concentration, probablement en raison d'une trop grande dégradation de la molécule d'ADN. Nous disposions d'ADN en quantité suffisante pour 7 échantillons pour lesquels nous avons pu passer aux étapes ultérieures de préparation des banques.

2.3. PREPARATION DES BANQUES

Les banques d'ADN ont été préparées à l'aide d'un kit « Haloplex HS Target enrichment system » (Agilent) pour un séquençage sur le NextSeq 500 d'Illumina.

Chaque échantillon a été préalablement dilué à une concentration finale de 1,8 ng/µl, concentration requise avant de débuter les banques. Pour chaque échantillon une quantité minimale de 50 ng d'ADN était nécessaire. Les différentes étapes de préparation des banques selon le protocole du fournisseur sont les suivantes (**Figure 2**) :

1) Digestion enzymatique de l'ADN par 8 couples d'enzymes
2) Hybridation avec les sondes d'intérêt
3) Ligation des fragments d'ADN hybridés avec les sondes
4) Capture des fragments d'ADN d'intérêt grâce à des billes streptavidine
5) Amplification par PCR
6) Purification
7) Analyse de la qualité des banques sur puce Bioanalyzer

La première étape de préparation des banques (**Etape 1 Figure 2**) a consisté en une fragmentation enzymatique des échantillons par 8 couples d'enzymes indépendants, puis une dénaturation permettant de générer de multiples fragments d'ADN simple brin. Un ADN contrôle permettait de valider l'efficacité de la digestion enzymatique (analyse sur puce Bioanalyzer). Au cours de la deuxième étape une hybridation était réalisée (**Etape 2 Figure 2**) entre les sondes d'intérêt et les fragments d'ADN. Les sondes étaient constituées des éléments suivant : à chacune de leurs extrémités se trouvaient une séquence complémentaire aux extrémités des fragments contenant une région cible permettant l'hybridation, immédiatement après ces séquences complémentaires se trouvaient des amorces de séquençage. Entre les amorces de séquençage, un index, spécifique à chaque échantillon,

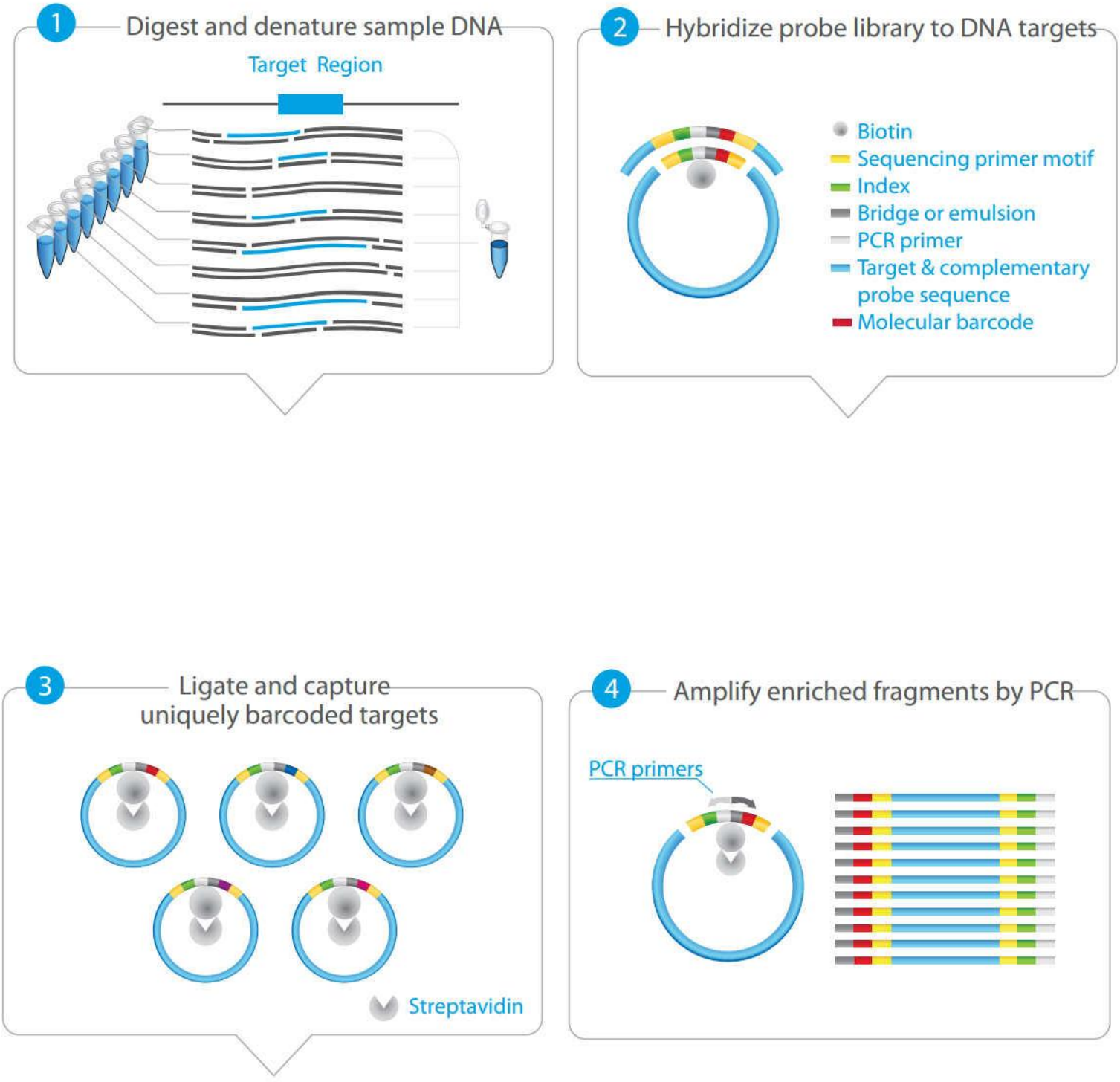


Figure 2 : Les différentes étapes de la production des banques d'ADN pour un séquençage Illumina (Haloplex HS Target enrichment system - Agilent)

permettait de réattribuer chaque séquence identifiée au bon patient, permettant ainsi de séquencer plusieurs échantillons provenant de patients différents en même temps. Le barre code moléculaire permettait lui de soustraire les duplicats de PCR au moment de l'analyse. L'amorce de PCR (représentée en gris clair sur **l'étape 2 de la figure 2**) était nécessaire pour l'étape de PCR finale de la constitution des banques. Le bridge ou émulsion (représenté en gris foncé sur **l'étape 2 figure 2)** était lui nécessaire pour l'étape de PCR en pont qui se faisait sur la flow cell. Chaque sonde est par ailleurs couplée à de la biotine. Après une étape de ligation entre les fragments d'ADN circularisés et les sondes, les fragments étaient capturés grâce à des billes streptavidine présentant une affinité pour la biotine (**Etape 3 Figure 2**). Les fragments d'intérêt ainsi sélectionnés étaient ensuite amplifiés par PCR puis purifiés (**Etape 4 Figure 2**). Chaque échantillon était ensuite analysé sur puce Bioanalyzer afin de s'assurer d'avoir une banque d'ADN de quantité et de qualité satisfaisantes avant de débuter l'étape de séquençage proprement dite. Un profil était jugé de qualité satisfaisante si les amplicons avaient une taille comprise entre 190 paires de bases (pb) et 640 pb, la majorité des amplicons devant se situer entre 225 et 540 paires de bases. Comparativement aux profils attendus notre banque était constituée dans sa plus grande partie de petits fragments et ceci de façon reproductible entre les différentes banques.

2.4. SEQUENCAGE

Les échantillons ont été séquencés sur le NextSeq 500 d'Illumina. Les étapes de ce séquençage sont les suivantes **(Figure 3)** :

2.4.1. Amplification par PCR « en pont » et génération de clusters

Chaque banque d'ADN est chargée sur une puce dédiée appelée « flow cell », où chaque fragment s'hybride grâce à des adaptateurs complémentaires présents sur la « flow cell » (**Figure 3A(1)**). Une fois fixé, une copie du brin d'ADN est réalisée par PCR à partir du brin matrice, puis la molécule d'ADN est dénaturée et le brin matrice éliminé. Le brin restant vient alors se fixer en « pont » sur les amorces complémentaires situées à proximité et un brin complémentaire est de nouveau synthétisé par PCR. Des étapes successives de dénaturation/hybridation en pont/PCR sont réalisées permettant l'amplification rapide et dans les deux sens d'un même fragment d'ADN sur un espace réduit constituant un « cluster » **(Figure 3A(2))**.

2.4.2. Séquençage par synthèse

Avant l'étape de séquençage par synthèse, le brin antisens est éliminé et seul le brin sens est conservé dans un premier temps (**Figure 3A(3)**). Une amorce de séquence vient s'hybrider sur chaque fragment, et le processus de séquençage proprement dit peut alors commencer. Chaque nucléotide, A, T, C ou G utilisé au cours de l'étape de séquençage est associé à un fluorophore spécifique. Dès qu'un nucléotide est incorporé par complémentarité avec le fragment matrice, un signal lumineux est émis et acquis, permettant son identification (**Figure 3B**). La succession des acquisitions permet de reconstituer la séquence. Des millions de fragments d'ADN sont ainsi séquencés en même temps sur une seule et même puce.

En cas de lecture « paired-end », le même processus est effectué mais à partir du brin antisens cette fois ci (**Figure 3C**). Dans le cadre de notre projet, une lecture « paired-end » en 2 fois 150 paires de bases était réalisée.

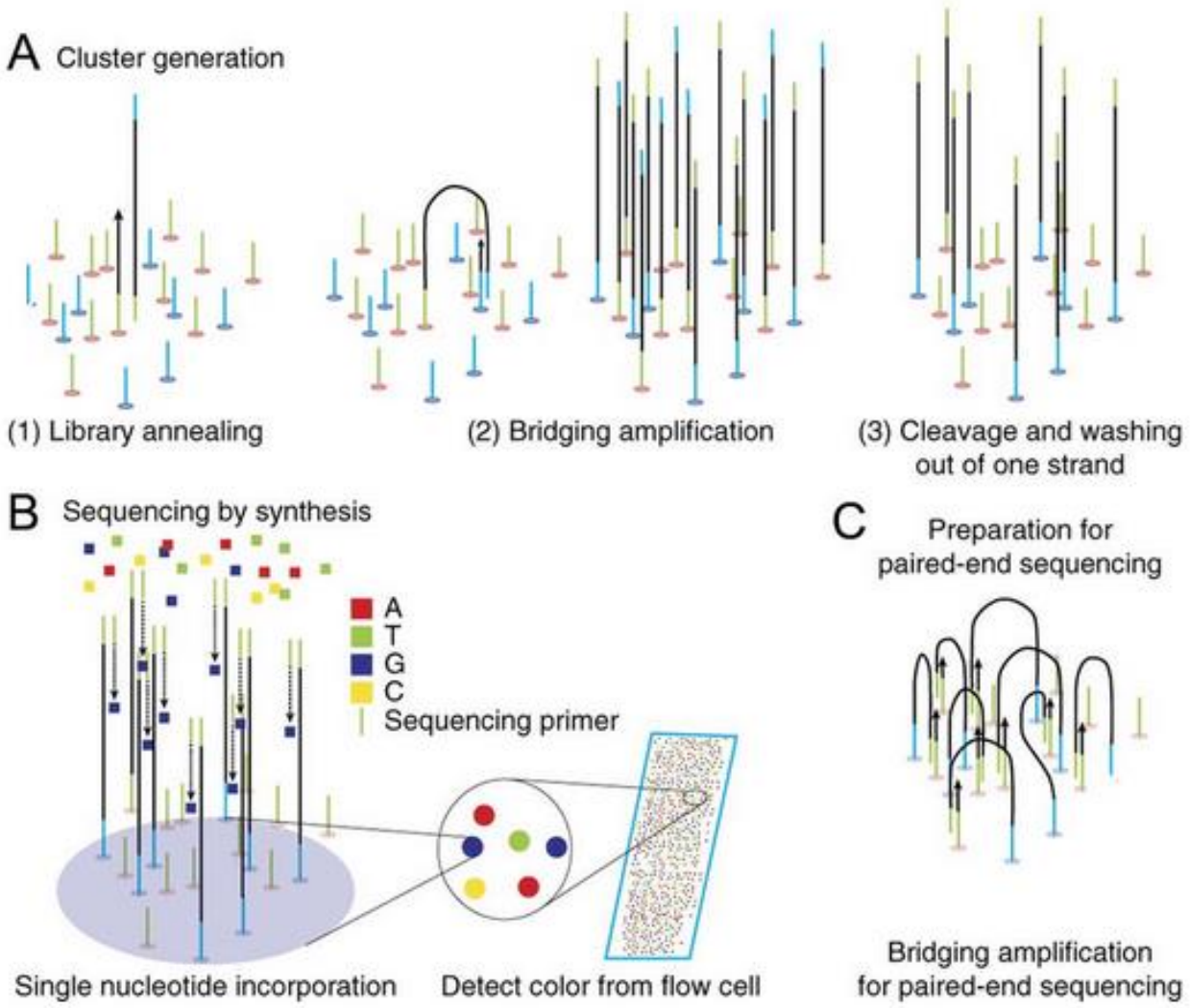


Figure 3 : Principe du séquençage Illumina.
(d'après researchgate.net)

A. (1) Un fragment d'ADN se fixe à une amorce complémentaire fixée sur la puce de séquençage (2) Amplification PCR en pont. (3) Le brin antisens est éliminé de la flow cell.

B. Etape de séquençage par synthèse. Un nucléotide est associé par complémentarité à partir du brin d'ADN fixé sur la puce. Chaque incorporation de nucléotide va générer un signal lumineux détecté par un laser.

C. Le même procédé est répété à partir du brin antisens dans le cas d'une lecture « paired-end »

2.4.3. Traitement bio-informatique des données

Différentes étapes sont réalisées au cours de l'analyse bio-informatique :

- **Base calling** : les données brutes au format BCL issues du séquenceur sont converties en fichier de séquence exploitable appelé fichier FASTQ
- **Alignement** : les séquences générées sont ensuite comparées puis alignées sur le génome de référence Hg19 via le logiciel BWA, permettant l'obtention d'un fichier BAM.
- **Variant calling** : les variants, c'est-à-dire toute base, à une position donnée, différente du génome de référence sont détectés grâce au logiciel GATK. A la fois les SNV et les petites insertions ou délétions vont être détectés au cours de cette étape.
- **Annotation** : l'annotation permet suite au recoupement d'informations disponibles dans différentes bases de données de déterminer le type de variant (par exemple mutation de type synonyme, faux sens ou non sens), et son impact potentiel fonctionnel estimé par différents logiciels de prédiction *in silico*.

Le fichier VCF obtenu à la suite de l'annotation est ensuite exploitable sur le logiciel VarAFT®. VarAFT® est un logiciel en ligne (http://varaft.eu) qui permet d'aider à filtrer et annoter les variants identifiés au cours de l'étape de séquençage, en interrogeant directement différentes bases de données et logiciels de prédiction en ligne.

2.5. SELECTION DES VARIANTS

2.5.1. Sélection des variants sans contribution du normal

L'ADN constitutionnel des patients n'étant pas disponible pour 17 de nos échantillons, il n'a pas été possible de distinguer, parmi l'ensemble des variants retrouvés après séquençage des échantillons tumoraux, les variants exclusivement somatiques.

Pour filtrer et catégoriser les variants, l'outil VarAFT® a permis, dans un premier temps, d'écarter les variants non exoniques (5'UTR, 3'UTR, introns en dehors des sites d'épissage). Le second paramètre de tri s'est fait sur la fréquence retrouvée des variants en population générale. L'outil VarAFT® permet en effet de sélectionner les variants ayant une fréquence inférieure à 1% en population générale, permettant de s'affranchir des polymorphismes les plus fréquents (seuil communément utilisé). Ainsi les variants retrouvés à une fréquence supérieure ou égale à 1% dans les bases de données 1000Genomes, KAVIAR et ExAC n'ont pas été conservés pour la suite de l'analyse. Les variants synonymes ont également été exclus de l'analyse.

Chaque variant a été ensuite analysé de façon individuelle et noté de 0 à 3 en fonction de sa probabilité de pathogénicité et d'action dans la tumorigenèse. Le premier filtre s'est fait à partir de score de prédiction *in silico* sur l'impact fonctionnel supposé du variant. Cinq outils ont été utilisés ; mutation taster, mutation assessor, SIFT, UMD-Predictor et Polyphen2. Parallèlement les bases de données OMIM, GeneCards et MalaCards étaient consultées pour chaque gène. Ces bases de données fournissent des informations sur l'implication des gènes dans les pathologies humaines, leur rôle dans les voies de signalisation biologique, l'expression tissulaire du gène et éventuellement des données sur les modèles animaux existants. Les variants étaient ensuite classés comme ci-après (**Figure 4**) :

Score 0 :

- Variants prédits comme polymorphes ou neutres par au moins 4 des 5 outils de prédiction

Score 1 :

- Variants prédits comme polymorphes ou neutres par 3 des 5 outils de prédiction

Score 2 :

- Variants pour lesquels aucune ou une seule donnée de prédiction est disponible et ce quel que soit le résultat
- Variant de type STOP (non-sens)/ SPLICE (dans les sites canoniques d'épissage) /FRAMESHIFT (décalage du cadre de lecture)
- Variants prédits comme pathogènes par au moins 4 des 5 outils de prédiction

Score 3 :

- Variants non polymorphes (cf score 2) dans des gènes déjà identifiés par séquençage dans les ostéosarcomes (données bibliographiques)

Les variants de catégorie 2 et 3 étaient considérés comme les variants les plus probablement d'origine somatique exclusive, et donc les meilleurs candidats pour expliquer la tumorigénèse des ostéosarcomes.

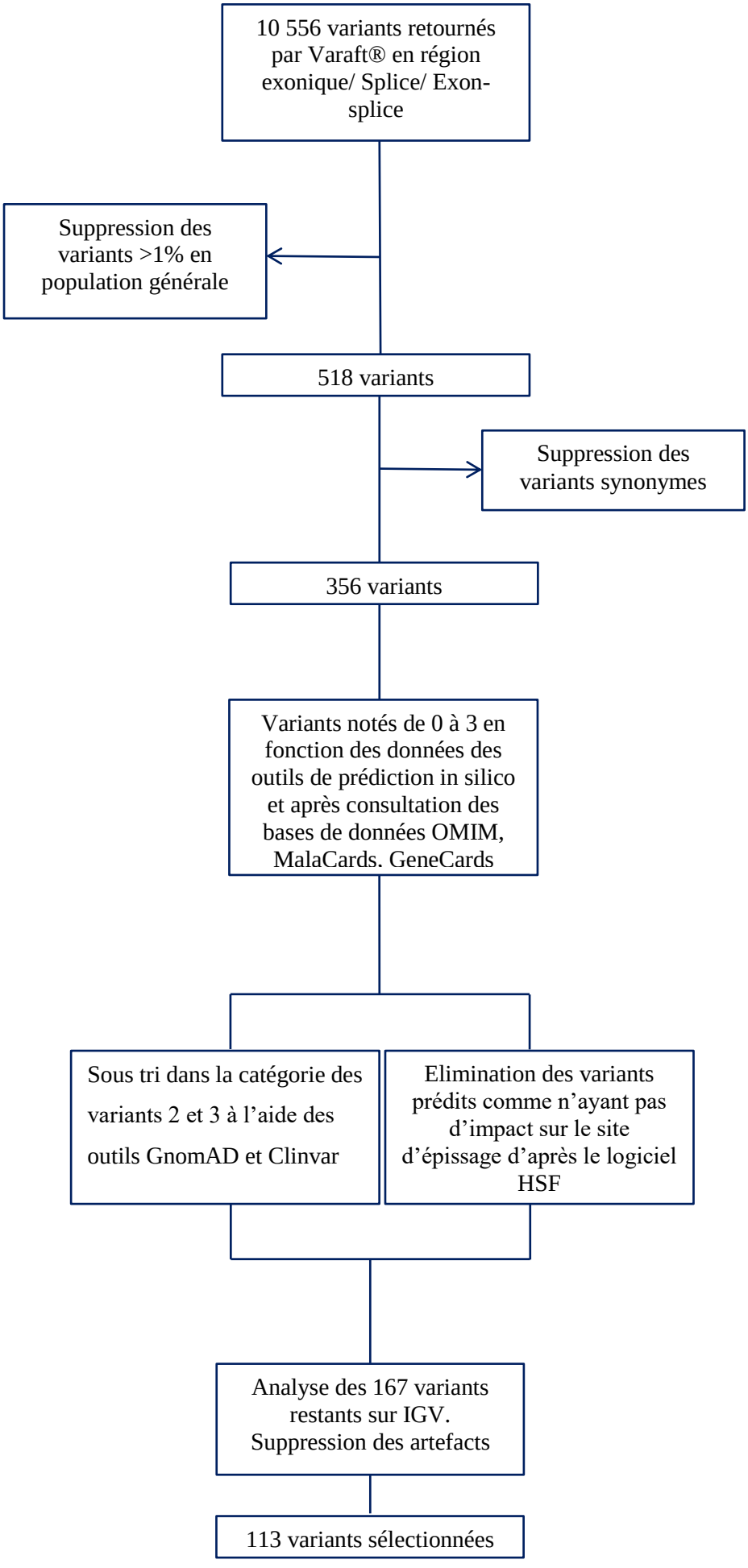


Figure 4 : Algorithme de sélection des variants pour les échantillons sans contribution du normal

Le deuxième niveau de tri a consisté à identifier, parmi ces variants, tous ceux situés sur des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs à partir des données de la littérature, puis à les filtrer grâce à la base de données en ligne GnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org).

Les variants retrouvés à une fréquence supérieure ou égale à 1% en population européenne étaient reclassés en score 0. Les variants pour lesquels des cas d'homozygotie germinale étaient décrits étaient également reclassés en score 0. Depuis GnomAD un lien sur la base de données ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) était possible et a permis de reclasser également en 0 tous les variants classés comme « bénins » ou « probablement bénins » sur la base de plusieurs publications concordantes ou d'avis consensuels de panel d'experts.

Dans un troisième temps, les variants introniques ou exoniques proches des sites d'épissage ont été évalués grâce à l'outil en ligne HumanSplicingFinder (http://www.umd.be/HSF3/). Cet outil permettait de reclasser en zéro les variants prédits comme n'ayant pas d'impact sur l'épissage.

Les variants restants ont enfin été analysés sur le logiciel de visualisation de séquence IGV (http://software.broadinstitute.org/software/igv/) via les fichiers BAM, afin d'éliminer les artefacts de technique (lecture en extrémité de fragment) et les biais sens de lecture (un seul sens séquencé).

2.5.2. Sélection des variants pour les échantillons couples normal/tumoral

Pour les échantillons couples, la sélection des variants a été plus facile, puisque la contribution du normal permettait de soustraire parmi les variants retrouvés dans le tumoral tous les variants constituant des polymorphismes rares propres à chaque patient. Pour chaque fichier VCF normal et tumoral les variants non exoniques (5'UTR, 3'UTR, introns en dehors des sites d'épissage) ont été retirés de l'analyse, ainsi que les variants synonymes et les variants supérieurs à 1% en population générale (base de données 1000genomes, KAVIAR, ExAC). A partir de ce tri, chaque variant communément partagé entre le normal et le tumoral était retiré de l'analyse car considéré comme un polymorphisme rare à l'exception de TP53 et RB1 qui pouvait constituer des mutations germinales. La visualisation physique des reads sur IGV des couples normal et tumoral permettait également de retirer des variants communément partagés et qui n'avaient pas été « appelés » par VarAFT®. Les variants

restant au niveau tumoral étaient alors considérés comme des variants d'origine somatique sans préjuger de leur caractère driver ou passenger.

2.6. IDENTIFICATION DES VOIES BIOLOGIQUES ET DES GENES POTENTIELLEMENT « ACTIONNABLES »

Les voies biologiques d'intérêt ont été identifiées grâce à l'outil bio-informatique PathScore. Cet outil s'appuie sur des algorithmes mathématiques pour déterminer à partir des gènes mutés l'enrichissement de voies biologiques[30]. L'identification des mutations pouvant bénéficier d'une thérapeutique de type thérapie ciblée a été réalisée grâce au logiciel Cancer Genome Interpreter (https://www.cancergenomeinterpreter.org/home). L'identification de cible potentielle est rendue possible grâce à la base de données dédiée « Cancer Biomarkers database » (https://www.cancergenomeinterpreter.org/biomarkers), permettant d'identifier la mutation comme étant une mutation de sensibilité ou de résistance à une drogue tout en indiquant le niveau de preuve scientifique. Ce niveau de preuve s'échelonne de « case report » à recommandations d'experts en passant par phase pré-clinique, essai clinique de phase précoce (phase I-II) et essai clinique de phase avancée (phase III).

3. RESULTATS

3.1.POPULATION D'ETUDE

La population d'étude concerne exclusivement des sujets pédiatriques non métastatiques au diagnostic et traités selon les protocoles pédiatriques. Les patients ont été pris en charge sur l'hôpital de la Timone entre 2000 et 2016 et sur l'hôpital de Toulouse entre 2012 et 2014. L'âge médian au diagnostic était de 13,5 ans. Le suivi médian a été de 60,5 mois. La population comprenait 10 mauvais répondeurs et 14 bons répondeurs. A la date d'analyse, 25% de l'effectif était décédé. Le **tableau 2** résume les caractéristiques des patients inclus.

3.2. ANALYSE DES MUTATIONS

Les échantillons tumoraux ont été séquencés avec une profondeur moyenne de 1212X (824-2184). En moyenne, 98,7% [94,5-99,29] des gènes cibles ont été lus avec une profondeur supérieure à 20X et 97,6% [89,4-98,9] des gènes cibles ont été lus avec une profondeur supérieure à 50X.

Pour les 7 échantillons de tissu non tumoral la profondeur moyenne était de 278X (156-390). En moyenne, 75,7% [65-86] des gènes cibles ont été lus avec une profondeur supérieure à 20X et 65,5% [52-76,8] des gènes cibles ont été lus avec une profondeur supérieure à 50X.

Après séquençage des 17 échantillons tumoraux sans contribution du normal, 10556 variants retrouvés en région exonique/épissage/jonction ont été identifiés. Parmi ceux-ci, les variants retrouvés dans moins de 1% de la population générale se comptent à 518. L'exclusion des variants synonymes ramène ce chiffre à 356. L'application de la méthode de classement (cf matériel et méthodes, paragraphe 2.5), permet de retenir 193 variants en catégories 2 et 3 (meilleurs candidats pour expliquer la tumorigénèse des ostéosarcomes). Les 167 variants restant après filtre avec le logiciel HSF et les bases de données GnomAD et ClinVar, sont réduits à 113 après analyse sur le logiciel IGV (**Figure 4**). Pour l'analyse des résultats, ces 113 variants sont considérés comme des variants pathogènes, appelés par la suite mutations.

Pour les couples normal/tumoral, après soustraction des variants de fréquence supérieure à 1% en population générale et soustraction des variants synonymes, on obtenait 122 variants. Le contrôle de ces variants sur IGV a permis de retenir 39 variants tumoraux.

Parmi le panel des 523 gènes analysés, 109 gènes présentaient une ou plusieurs mutations (**Annexe 2**). Le nombre moyen de mutations par échantillon était de 6 chez les bons répondeurs [2 ; 11] et de 7 chez les mauvais répondeurs [4 ; 14]. Les mutations les plus représentées étaient les mutations de type faux-sens. Le gène retrouvé le plus fréquemment muté était *TP53* avec 7 mutations dont 6 mutations faux-sens et une mutation non-sens. Les autres gènes les plus mutés étaient *PCDH15* (4 mutations dont 2 dans un même échantillon), *TET2* (4 mutations), *PPP1R3A* (3 mutations), *ATAD2* (3 mutations), *TSC2* (3 mutations), *ATRX* (3 mutations), *CYP2D6* (3 mutations) (**Annexe 3**).

	Total (n=24)	BR (n=14)	MR (n=10)
Age			
5-10 ans	5	4	0
11-15 ans	14	8	7
16-19 ans	5	2	3
Sexe			
Masculin	13	7	6
Féminin	11	7	4
Localisation			
Fémur	15	7	8
Tibia	6	4	2
Humérus	3	3	0
Récidive			
Oui	9	4	5
Non	15	10	5
Vivant en RC	17	12	5
Vivant en progression	1	0	1
Décédé	6	2	4

Table 2 : Caractéristiques des patients inclus

3.3. ANALYSE DES VOIES BIOLOGIQUES

L'identification des voies d'intérêt s'est faite à partir de l'outil bio-informatique PathScore. Cet outil s'appuie sur des algorithmes mathématiques pour déterminer à partir des gènes mutés l'enrichissement de voies biologiques[30]. Le dendrogramme présenté en **annexe 4** représente l'ensemble des voies retrouvées de manière significatives dans les ostéosarcomes séquencés. Si l'on ne considère que les voies ayant une p-value ajustée (p*) significative, les voies de régulation des ostéosarcomes étudiés sont les suivantes :

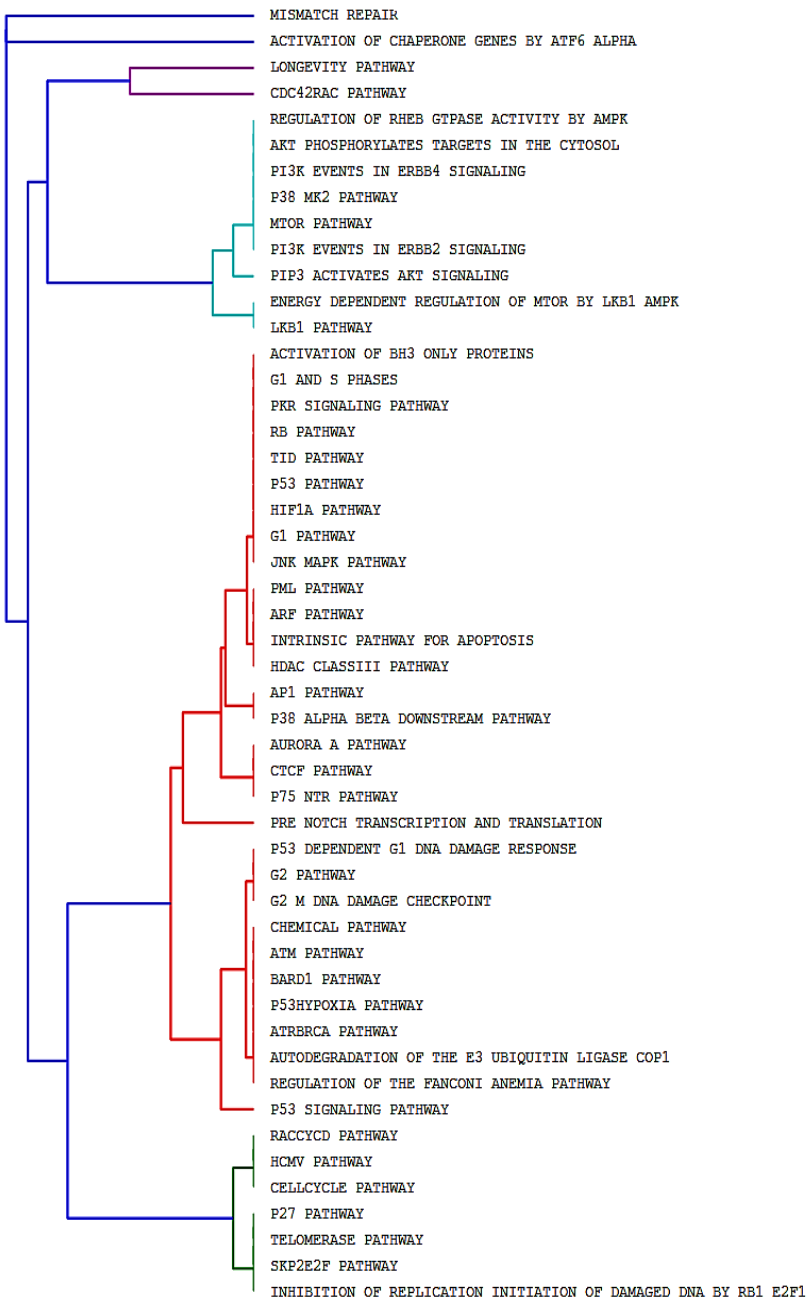
- P53 signaling pathway qui correspond à 37.5% des échantillons ($p^* = 2{,}6.10^{-6}$)
- PI3K events in ERBB2 signaling qui correspond à 37.5% des échantillons ($p^* = 6.10^{-7}$)
- PI3K events in ERBB4 signaling qui correspond à 33.3% des échantillons ($p^* = 2{,}5.10^{-6}$)
- PI3K AKT activation qui correspond à 29.2% des échantillons ($p^* = 1{,}3.10^{-4}$)
- GAB1 signalosome qui correspond à 29.2% des échantillons ($p^* = 1{,}1.10^{-4}$)
- mTOR pathway qui correspond à 25% des échantillons ($p^* = 2.10^{-4}$)
- HCMV pathway qui correspond à 20,8% des échantillons (p*=0,0016)

Par ailleurs, toutes les voies du dendrogramme à branchement vert ont également une p-value ajustée significative compte tenu du poids de TP53 dans toutes ces voies.

Lorsque l'on considère les bons répondeurs de façon exclusive, les voies avec une p-value ajustée significative sont les suivantes :

- Telomerase pathway qui correspond à 50% de l'échantillon ($p^* = 5{,}1.10^{-8}$)
- LKB1 pathway qui correspond à 42,9% de l'échantillon ($p^* = 6{,}5.10^{-5}$)
- PI3K events in ERBB2 signaling qui correspond à 35,7% de l'échantillon (p*=0,0029)
- PI3K events in ERBB4 signaling qui correspond à 35,7% de l'échantillon ($p^* = 8{,}2.10^{-4}$)

Par ailleurs, toutes les voies du dendrogramme à branchement rouge ont également une p-value ajustée significative compte tenu du poids de TP53 dans ces voies (**Figure 5**).



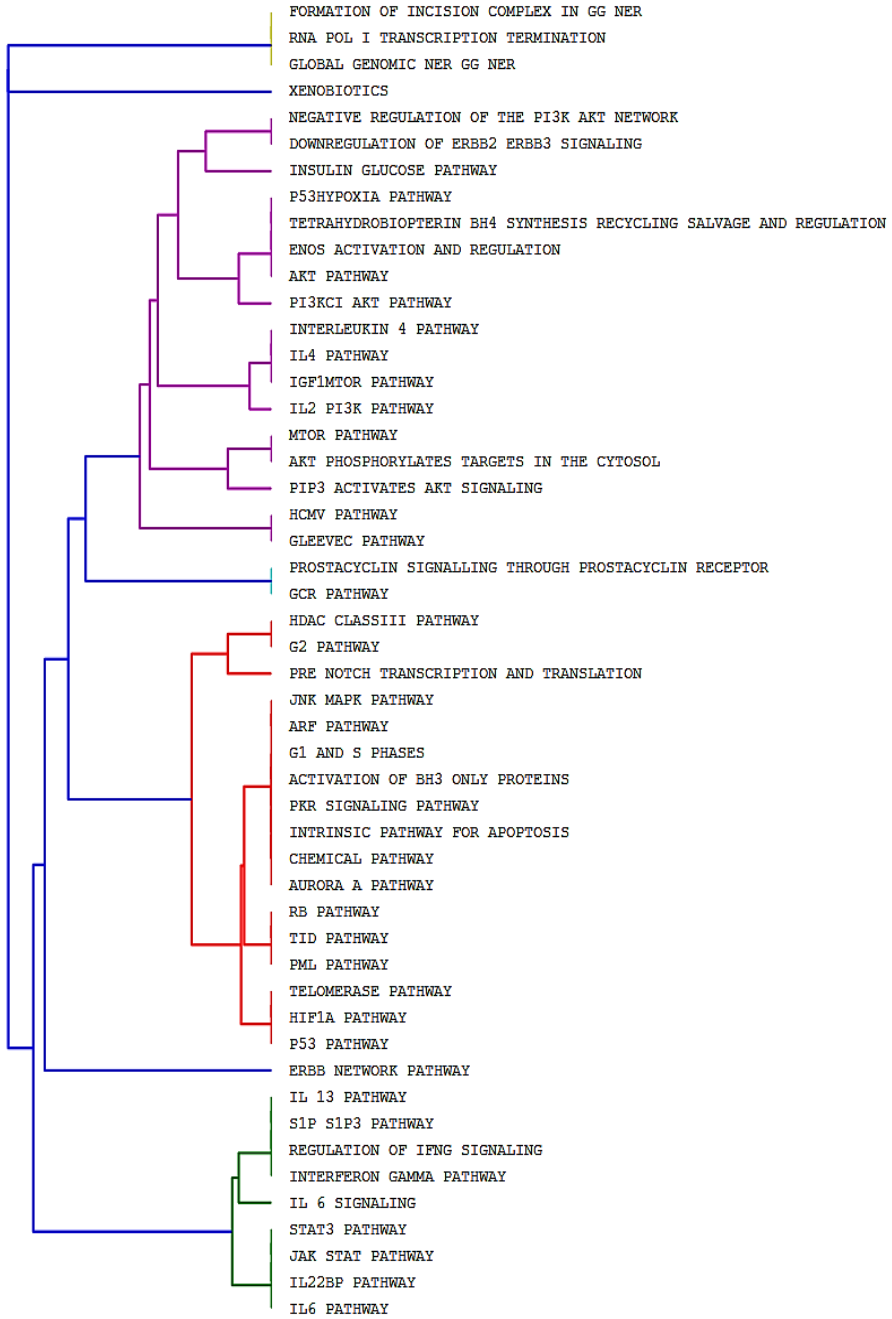


Figure 5 : Dendrogramme des voies biologiques des bons répondeurs (à gauche) et des mauvais répondeurs (à droite)

En ce qui concerne les mauvais répondeurs, les voies avec une p-value ajustée significative sont les suivantes :

- P53 hypoxia pathway qui correspond à 40% des échantillons (p*=0,0050)
- Interleukine 4 pathway qui correspond à 40% des échantillons (p*=0,0058)
- Interleukine 2 PI3K pathway qui correspond à 40% des échantillons (p*=0,016)
- PI3KCIAKT pathway qui correspond à 40% des échantillons (p*=0,019)
- Telomerase pathway qui correspond à 40% des échantillons (p*=0,011)
- HIF1A pathway qui correspond à 30% des échantillons (p*0,038)
- Xenobiotics qui correspond à 30% des échantillons (p*=0,031)
- TID pathway qui correspond à 30% des patients (p*=0,045)

Ce travail n'a pas permis de mettre en évidence une mutation permettant de distinguer dès le diagnostic les bons des mauvais répondeurs, cela pouvant s'expliquer à la fois par le faible effectif de notre échantillon, mais également par la faible récurrence des mutations.

3.4. ANALYSE DES CIBLES POTENTIELLES

Parmi les 24 échantillons, 14 (58%) présentent une altération dans un gène « actionnable », c'est-à-dire pour lequel une thérapie ciblée existe ou est en cours de développement dans des essais cliniques. La voie qui semble la plus intéressante à exploiter est la voie PI3K/AKT/mTOR, avec 6 échantillons présentant une mutation dans cette voie-là (**Tableau 3**). Certains récepteurs tyrosines kinase seraient également potentiellement « actionnables ». La principale réserve est que les mutations identifiées dans cette étude n'étaient pas nécessairement les mutations cibles qui ont permis les AMM de ces thérapies ciblées.

CIBLE	GENE	MUTATION	ECHANTILLON
Voie PI3K	PI3KCA	D1029E	1941
	TSC2	R1795C	5090
	TSC2	V1144M	6500
	TSC2	P1770L	6699
	RICTOR	T1029A	6188
	AKT1	R144C	3103
Voie NOTCH	NOTCH2	R91L	2523
	NOTCH3	G1710D	8781
Récepteurs tyrosine kinase	JAK3	R925S	6537
	ERBB2	L15F	2254
	ERBB4	H631Y	4462
	KIT	L117I	4001
	PDGFRA	K455N	4665
	ALK	N654K	4078

Tableau 3 : Cibles thérapeutiques potentiellement actionnables chez les bons et mauvais répondeurs

4. DISCUSSION

Ce travail portait sur l'analyse de mutations de 24 ostéosarcomes issus de patients pédiatriques non métastatiques au diagnostic répartis en 10 mauvais répondeurs et 14 bons répondeurs. Aucune mutation ni gène muté de façon récurrente n'a permis de distinguer dès le diagnostic les bons des mauvais répondeurs. En revanche, il semblerait qu'un peu plus de la moitié de notre effectif pourrait se voir proposer un traitement par thérapie ciblée. La voie PI3K/AKT/mTOR semble plus particulièrement intéressante avec 25% de notre effectif présentant une altération dans cette voie-là. En ce sens, ces données confirment celles de Perry et al. qui retrouvaient que 24% de leur cohorte présentait une altération dans la voie PI3K/mTOR.

4.1. Les limites techniques

Une des limites de ce travail est l'effectif réduit de notre population. Cet effectif réduit s'explique à la fois par la rareté de cette pathologie mais aussi par le choix initial de sélectionner une population très homogène présupposant que l'hétérogénéité biologique des ostéosarcomes était peut-être en partie le reflet de l'hétérogénéité des populations étudiées et du matériel utilisé dans les précédentes études de séquençage[27,28,31].

D'autre part, l'absence d'ADN constitutionnel pour 17 patients au moment de l'expérimentation a rendu complexe la sélection des mutations exclusivement tumorales. Malgré le soin porté à la méthode de sélection des variants d'intérêt, il est impossible de s'affranchir de toute erreur. Des variants constitutionnels ont pu être sélectionnés à tort et des variants tumoraux écartés également à tort de l'analyse. La cohorte des patients étant relativement ancienne, un prélèvement sanguin systématique n'a pas été possible (patients décédés ou éloignés géographiquement). Bien que nous disposions de 21 blocs en paraffine l'extraction de l'ADN constitutionnel n'a été malheureusement possible que pour 7 de ces échantillons, avec une quantité d'ADN trop faible et donc non exploitable pour les 14 échantillons restants malgré nos tentatives de concentration de l'ADN. De nombreuses études ont bien montré que l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons FFPE est rendue plus difficile qu'à partir de tissus congelés du fait de la dégradation de la molécule d'ADN[32,33]. D'autre part, plus la durée de stockage est longue, plus l'on peut s'attendre à une dégradation de plus en plus importante de l'ADN. Ainsi, Guyard et al. ont montré qu'après une période de stockage de 5 ans, la quantité d'ADN issue de mêmes blocs FFPE est réduite de moitié[34].

Par ailleurs, contrairement à d'autres études publiées s'appuyant sur le séquençage d'exome entier ou « whole exome » (WES), ce travail repose sur le séquençage d'un panel de 523 gènes, identifiés préalablement comme mutés parmi 31 échantillons d'ostéosarcomes d'origine hétérogène ayant bénéficié d'un séquençage d'exome. La méthode d'analyse justifie ce choix : en l'absence d'ADN constitutionnel pour la majorité de notre cohorte, il aurait été très difficile d'analyser le grand nombre de variants générés par un séquençage « whole exome » et de déterminer le rôle de ces variants dans l'oncogenèse et la chimio-résistance. De plus une analyse ciblée sur 523 gènes permet un séquençage plus profond qu'un WES (100X), et augmente ainsi la sensibilité de détection des variants tumoraux. C'est d'ailleurs l'une des principales critiques que nous pouvons faire au travail de Chiappetta et al. paru dans Oncotarget en 2017[35]. Ce travail portait sur une analyse « whole exome sequencing » de 8 échantillons d'ostéosarcomes obtenus avant chimiothérapie néoadjuvante. L'un des objectifs annoncé des auteurs était d'identifier des traitements ciblés via le séquençage des échantillons FFPE d'ostéosarcome. Cependant les auteurs ne disposaient pas d'une contribution du normal et l'analyse « whole exome » n'a permis en moyenne qu'une profondeur de lecture de 17X ce qui est vraiment faible et sujet à caution dans le cas d'une maladie polyclonale et hétérogène comme le cancer. Ils ont donc échoué à trouver des cibles thérapeutiques.

Ce travail va être avantageusement complété par d'autres techniques d'analyses génétiques, notamment de la CGH array, les techniques de séquençage ne permettant pas jusqu'ici de mettre en évidence des anomalies du nombre de copies de l'ADN (CNV) comme les amplifications ou les délétions supérieures à 50 paires de bases (remaniements de grande taille). Or il s'agit vraisemblablement du mécanisme préférentiel d'altération génétique dans les tumeurs et les ostéosarcomes ne font pas exception[36,37]. Ainsi Kovac et al. rapportent que la taille médiane des CNV dans les ostéosarcomes est de 4,7Mb et qu'en moyenne il existe 69 évènements de ce type par tumeur. Ces CNV concernent autant des gains que des pertes de copies. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, dans cette étude, les gènes impliqués dans la voie de la recombinaison homologue (*BRCA2, BAP1, PTEN,et PALB2*) présentaient des altérations du nombre de copies et aucune mutation ponctuelle[28]. Un travail collaboratif avec l'équipe de Vincent Gelly au CRCM de Marseille est en cours pour réalisation de la CGH array sur ces échantillons ainsi qu'une analyse transcriptomique.

4.2. Les différents aspects de la résistance tumorale

Concernant la résistance tumorale, un seul volet de la chimiorésistance est abordé dans ce travail, à savoir la résistance primaire tumorale, mais il existe d'autres mécanismes de résistance, probablement co-existants. Par exemple il est aujourd'hui avéré que des polymorphismes constitutionnels de gènes impliqués dans le métabolisme des drogues de chimiothérapie confèrent une sensibilité ou une résistance à certaines drogues, ou encore une toxicité parfois mortelle. Dans les ostéosarcomes, le variant c.313A>G du gène *GSTP1*, impliqué dans la détoxification de drogues, et le variant c.24C>T du gène *ABCC2* impliqué dans le transport de drogues, seraient associés à la chimiorésistance[38]. Un autre mécanisme de résistance, est la résistance tumorale secondaire qui apparait sous pression de sélection. C'est le cas de la mutation T790M portée par l'exon 20 du gène *EGFR* qui apparait dans un délai plus ou moins long après traitement par inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) chez environ 50% des patients traités pour un cancer du poumon[39]. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une même mutation peut correspondre à la fois à un mécanisme de résistance secondaire mais aussi à un mécanisme de résistance primaire, puisqu'on estime qu'un peu moins de 1% des tumeurs du poumon naïves de traitement par TKI sont porteuses de la mutation T790M dans des sous-clones tumoraux[40]. Pour identifier le mécanisme majoritaire de résistance au traitement dans les ostéosarcomes, résistance primaire ou secondaire, il pourrait être envisagé une étude prospective consistant à comparer par séquençage l'ADN tumoral au diagnostic et l'ADN tumoral après chimiothérapie néoadjuvante. Deux profils moléculaires comparables feraient penser à une résistante primaire tumorale préférentielle alors qu'une différence significative des profils ferait plutôt évoquer une résistance tumorale secondaire se développant sous pression de sélection.

4.3.Validité des cibles identifiées ?

Un peu plus de la moitié de notre effectif, d'après ce travail de séquençage, pourrait bénéficier d'une thérapeutique ciblée. Ce pourcentage est proche de celui observé dans l'essai MOSCATO, où 49% de l'effectif avait une altération moléculaire actionnable en utilisant des techniques de CGH et de NGS dans différentes histologies de cancers solides[41]. De même l'essai ProfiLER, présenté à l'ASCO 2017, retrouve 51% de patients présentant une altération actionnable à partir des techniques de NGS et CGH réalisées sur 69 gènes impliqués dans la cancérologie. Une thérapie ciblée a pu être proposée à 35% des patients[42]. Dans notre travail, la voie biologique qui semble la plus exploitable est la voie PI3K/AKT/mTOR, avec 6

échantillons sur 24 présentant une mutation d'un des gènes de cette voie, ce qui est comparable avec les données de Perry qui retrouve un quart de patients présentant une altération génétique dans cette voie biologique[27]. Néanmoins, l'analyse des altérations « actionnables », doit être jugée avec prudence. La plupart des mutations que nous avons mises en évidence dans notre travail de séquençage ne sont pas des mutations décrites comme précédemment ciblables par un traitement (mutation « HOT SPOT »). Ainsi l'AMM du Glivec® concerne uniquement les mutations de l'exon 9 et 11 du gène *KIT*. Si d'autres variants sont identifiés dans ce gène, comme le variant L117I dans ce travail, seules des études fonctionnelles pourraient permettre de les classer comme « actionnables ». D'autre part il ne faut pas perdre de vue qu'une mutation « actionnable » dans une histologie particulière peut ne pas l'être dans une autre. C'est le cas notamment de la mutation V600E dans l'oncogène *BRAF*, retrouvé dans 50% des mélanomes, et pour lequel des inhibiteurs de BRAF sont efficaces[43]. Mais la même mutation dans le cancer du côlon n'est pourtant pas inhibée par les inhibiteurs de BRAF du fait d'une activation secondaire de la voie de l'EGFR[44]. Par ailleurs le nombre d'altérations potentiellement actionnables est certainement sous-estimé, les altérations génomiques de grande taille n'étant pas prises en compte ici.

4.4. Les différentes voies biologiques et les gènes impliqués

Si ce travail n'a pu mettre en évidence de mutation récurrente, ni de gène muté de façon récurrente permettant de distinguer dès le diagnostic bon et mauvais répondeurs, il semblerait néanmoins que des voies biologiques différentes soient empruntées par ces deux catégories de patients.

Les mauvais répondeurs semblent emprunter un grand nombre de voies biologiques pouvant expliquer leur chimiorésistance, un grand nombre d'entre elles ayant en commun le gène *AKT1*. Les autres gènes impliqués dans ces voies sont : *JAK2, JAK3, RPS6KB1, HSP90AA1, PRKDC, RICTOR, CYP2D6, EP300, TP53*. Le gène *AKT1* est connu pour favoriser la prolifération cellulaire, la survie, et la dissémination métastatique dans de nombreux cancers[45]. Plusieurs publications soulignent également son implication dans la chimiorésistance. Girouard el al. ont montré que l'utilisation d'un ARN interférent inhibant AKT1 et AKT2 restaurait la sensibilité de cellules cancéreuses endométriales au cisplatine[46]. Zhu et al. ont eux étudié le rôle de RANK et AKT1 dans 78 échantillons d'ostéosarcome. Ils ont retrouvé une expression d'AKT1 dans 74,4% des cas, et celle-ci était corrélée à une moins bonne survie[47].

Le gène *PRKDC,* situé sur le chromosome 8, est impliqué dans la réparation de l'ADN, notamment les coupures double brin. Dans le cancer du sein, il a été montré que des hauts niveau d'expression de PRKDC étaient associés à un grade tumoral plus élevé, à la chimiorésistance et à l'invasion ganglionnaire tumorale[48]. Li et al. ont eux montré que l'inhibition de PRKDC dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome MG63 restaurait leur sensibilité au cisplatine et au VP16[49].

Le gène *JAK2* est surtout connu pour son rôle dans les syndrômes myéloprolifératifs, dans lesquels la mutation V617F est retrouvée entre 50 et 95% des cas[50]. La voie JAK/STAT joue un rôle clé dans l'hématopoïèse et la réponse inflammatoire. Lorsque la kinase JAK est activée par phosphorylation, elle recrute des facteurs de transcription STATs qui régulent la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Les données scientifiques sur le rôle de JAK2 et JAK3 dans les tumeurs solides sont plus parcellaires. Néanmoins, il semblerait que l'utilisation d'inhibiteurs de JAK2/STAT3 *in vitro* et *in vivo* ralentirait la croissance tumorale dans des modèles animaux d'ostéosarcomes[51].

Il est intéressant de noter que la voie Mismatch Repair, bien que n'atteignant pas le seuil de significativité, n'est représentée que chez les bons répondeurs, impliquant les gènes MLH1, PMS2 et MLH3. Il semble donc intéressant de développer des essais d'immunothérapie dans cette catégorie de patients et après recherche d'instabilité microsatellitaire, compte tenu du fait que de récentes études ont mis en évidence l'efficacité de l'immunothérapie dans les tumeurs solides présentant une instabilité microsatellitaire[52,53]. Ainsi dans l'étude de Le et al, 53% des tumeurs solides métastatiques présentant une instabilité microsatellitaire ont présenté une réponse radiologique après traitement par immunothérapie et 21% de réponses complètes ont pu être observées[53].

5. CONCLUSION

Le séquençage ciblé de biopsies initiales congelées d'ostéosarcomes de patients pédiatriques non métastatiques au diagnostic n'a pas permis de mettre en évidence une mutation ou un gène muté de façon récurrente permettant de distinguer dès le diagnostic les bons répondeurs des mauvais répondeurs. Ce travail confirme la très grande hétérogénéité de ces tumeurs y compris dans une population très homogène. La voie P53 reste la principale voie d'initiation de l'oncogenèse dans les ostéosarcomes. Il est en revanche intéressant de noter qu'un peu plus de la moitié de notre effectif pourrait se voir proposer un traitement par thérapie ciblée, incitant à inclure ces patients dans ces essais cliniques. L'une des voies qui semble la plus intéressante semble la voie PI3K/AKT/mTOR, avec 25% de notre cohorte présentant une altération dans cette voie.

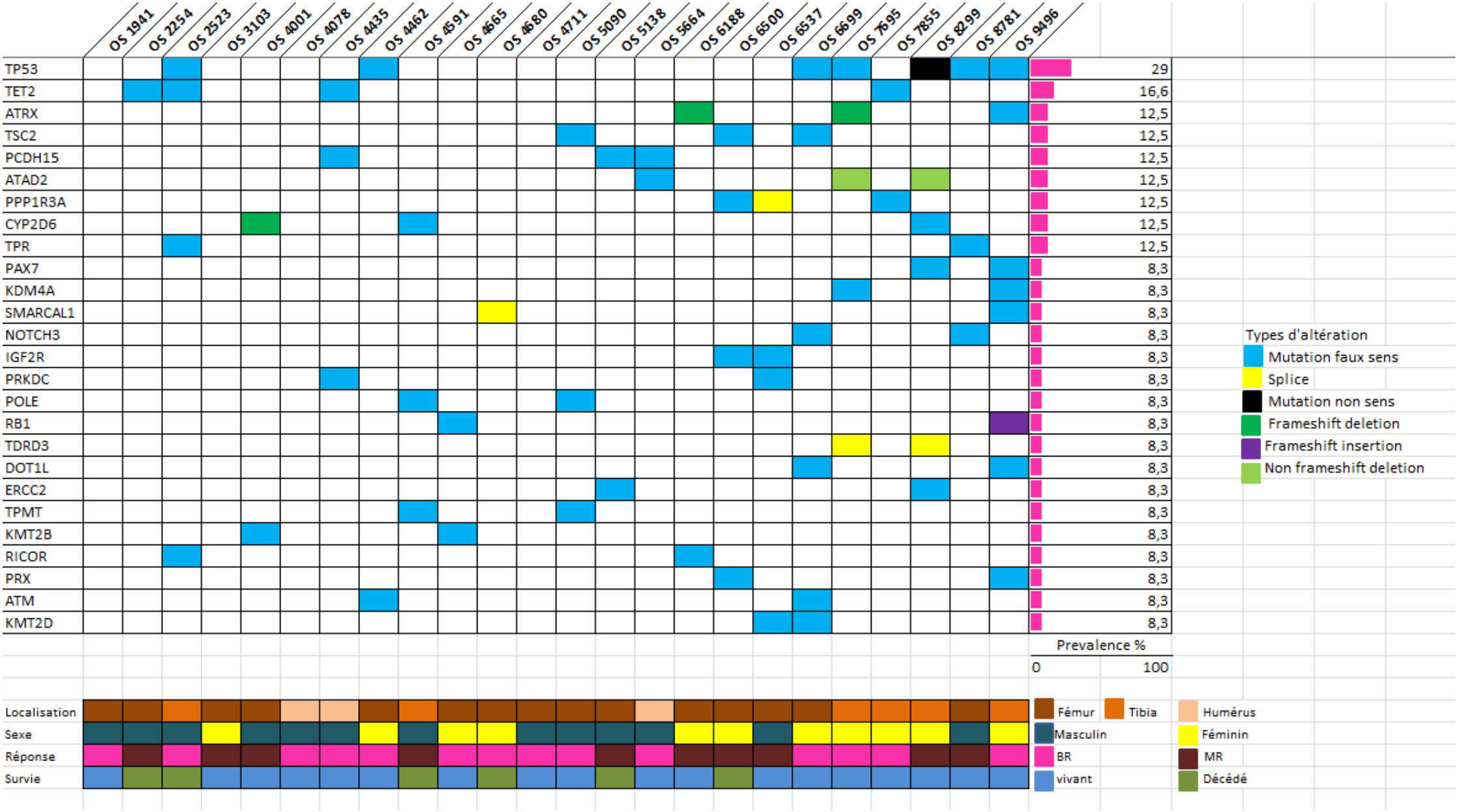
AXIN1	PAK7	CDA	TAB3	RAD51	RBM10	PDGFRA	GSTP1	FGF5	PTCH1	UGT8	FOXL2	NAF1
KDM5A	VHL	RIOK3	DDX11	SFRP1	SETD2	KIT	SMAD3	LIN7A	IGF1R	MET	NOTCH1	MECOM
HRAS	ROPN1L	CRKL	KLF13	BRCA1	ARAF	PCDH15	PIK3R1	TSHR	CYP3A5	ROS1	TRAF2	SELL
TYMS	APCDD1	SLCO1B1	STK19	CTNNB1	SMARCC1	TBPL2	CTCF	ZNF704	CYP3A4	RAD21	BRAF	PHF10
RSPO4	KEAP1	LATS2	NOTCH4	CYP2A6	MSH2	KDR	SOCS6	CDH13	STK3	BHLHE40	MAGEC3	NPM1
SNTG2	BAGE	CDKN2A	KIF5B	EP300	SPOP	MAP3K1	RAD51B	TCF7L1	ST8SIA4	MLL	ATR	TNFSF10
RAD52	SMARCA4	CDKN2B	WT1	CYP2B6	MSH6	RNF43	IFNG	CCDC89	ACTL6B	UBE2A	PRSS1	PDK1
STK11	HCCS	MAPK1	BRCA2	ETV4	NIPAL1	ERBB3	CDH1	DACH2	SIM1	INSIG2	KYNU	HPGD
TERT	MTOR	NIPA1	DAXX	AXL	PORCN	SMARCC2	PREX2	BCL10	RNF19A	CBL	CYP11B2	NAALADL2
DLGAP2	SOCS1	PRDM9	RAD51D	PHOX2B	SMAD4	RAD51C	MDM2	FLRT2	ABCC2	NR1I2	TPK1	FGFR4
FOXC1	HS3ST1	SS18	PRLR	KAT6A	GATA1	GNAS	CCND1	GRM3	CHUK	GSK3B	SMARCA5	NSD1
FGFR3	ETV6	PALB2	TBX20	LTK	PRKDC	PLK2	NQO1	SLITRK6	BIRC3	REG4	AFF2	NFE2L2
WHSC1	MTHFR	PRKCB	IL7R	CCND3	PIM2	IMPAD1	MITF	ABCB1	BIRC2	NOTCH2	EZH2	PIK3CA
SMARCA2	MAP2K4	SMARCB1	NFKBIA	PLAT	RB1	RPS6KB1	ANO1	NTRK2	HSP90AA1	STXBP5L	PDGFRB	ABL2
TSC2	RAF1	GSTT1	RUNX1	EML4	MLL2	CDK4	KLHL1	NTRK3	TRAF3	SRFBP1	LATS1	ACTL6A
IGF2	CDKN1B	MPP6	MLL4	CYP2D6	MST1	SETD6	MED12	ABCG2	SUFU	KDM2B	MCL1	FLT4
DOT1L	TBC1D7	PARP4	MELK	YAF2	DCC	ZNF324	FXN	MMP16	HSP90B1	FGFR2	SMARCD3	SOX2
TRAF7	ETV1	KRAS	MYH9	CIC	WDFY4	CDH20	PHLPP2	EPHA3	CYP17A1	FGF2	RND3	MAP3K13
PDPK1	FLRT3	DNMT3A	NKX2-1	TMPRSS2	MST1R	JUN	MOB1B	PTEN	AKT1	ATAD2	MLL3	IRF2
FOXM1	NOTCH3	WSB1	MLH1	RET	BRD7	CCNB2	NEGR1	FANCA	MRPS9	CHEK1	MBNL1	ETV5
GNA11	NDE1	HIST1H3B	PIM1	ABCG1	PIM3	BCL2	PKM2	IDH2	TET2	RSPO3	RPTN	TPR
TP73	NCOR1	ARID1A	CDK12	VEGFA	SMARCD1	TDRD3	DPF3	BACH2	PIK3CG	PPP6C	ESR1	PTGS2
CREBBP	NCOR1	BBOX1	ERBB2	MPL	USP8	BIRC7	GRB2	ARRDC3	PRDM1	ISOC1	HRNR	TLR3
MAP2K2	ABCC1	FLT3	FOXA1	ALKBH3	POLD1	SMARCD2	MOB1A	FAM190A	NTNG1	FLI1	FLG	BCL6
CCND2	MYCN	SULT1A1	RSPO1	XRCC1	SAV1	FAM123B	MLH3	BARHL2	ATM	SMARCA1	FLG2	ZSWIM2
KDM4B	JAK3	FLT1	WHSC1L1	KDM4A	CDKN2C	PTP4A1	DTX2	BLM	MORC1	MYC	FBXW7	SF3B1

JAK2	TPMT	DSG3	FGFR1	HSP90AB1	PKHD1	PRKCA	KAT6B	RPS6KA5	RSPO2	SMO	IRAK1	CASP8
PMS2	NAT2	CHEK2	CYP1B1	U2AF1	CYP19A1	MEN1	ATRX	CDK6	GSTM1	MBD4	G6PD	MDM4
CHD5	PIK3R2	DUSP4	DPF1	KDM6A	PARP3	ESR2	ROBO2	TNKS2	KLF4	IMP4	RNF32	CTLA4
RAC1	PIK3C2G	ALK	SMARCE1	BCL3	ZNF217	DPF2	PARD6G	GPC6	IRS2	MGMT	NTRK1	IKBKE
CHD4	LDHC	NF1	RICTOR	PTCH2	ACVR1B	JAK1	GAB2	SMARCAD1	DCX	RAD50	ARID1B	IDH1
KDM4C	PAX7	EWSR1	PIK3C3	SMAD2	BAP1	MAX	WWOX	DICER1	BCL2L11	POLE	PEA15	ERBB4
INSR	MAPK7	NF2	TOP1	FKBP3	PBRM1	EPHA5	RPTOR	ABCC4	APC	CHFR	IGF2R	RPS6KC1
RBFOX1	CHODL	MAPK3	ERG	ERCC2	PPP2R1A	RABGEF1	ROBO1	CYP2C19	PTPN11	ABL1	PPM1L	BARD1
TP53	RAB5A	BCL2L1	BCOR	ERCC1	KDM5C	CDH5	MSH3	EPHA6	PPP1R3A	PCDH10	CD302	SMARCAL1
GATA3	PLXDC2	CCNE1	LHFP	IGFBP3	OLFM4	PRKAR1A	NDFIP2	ELK3	PROZ	B3GAT1	GABRA6	H3F3A
AURKB	RPS6KA3	TGFBR2	MYCL1	ARID2	DKK1	MAP2K1	BCL2A1	CYP2C9	PTPN22	MYB	FCGR2A	PARP1
LMO1	SLIT2	BACH1	STAT3	ZC3H13	PRKCG	AR	GNAQ	CYP2C8	TCF7L2	TSC1	FCGR3A	IRS1
PTPRD	VPREB1	TEX15	AKT2	PPARA	AURKA	KDM2A	TTK	DUSP2	TBX3	KHDRBS3	PARK2	SLC35F3
TNKS	PARP2	PCDH7	PRX	SLC19A1	EGFR	CBFB	PPIF	DPYD	NRAS	KDM3B	DDR2	UGT1A1
FH												
BOK												
AKT3												

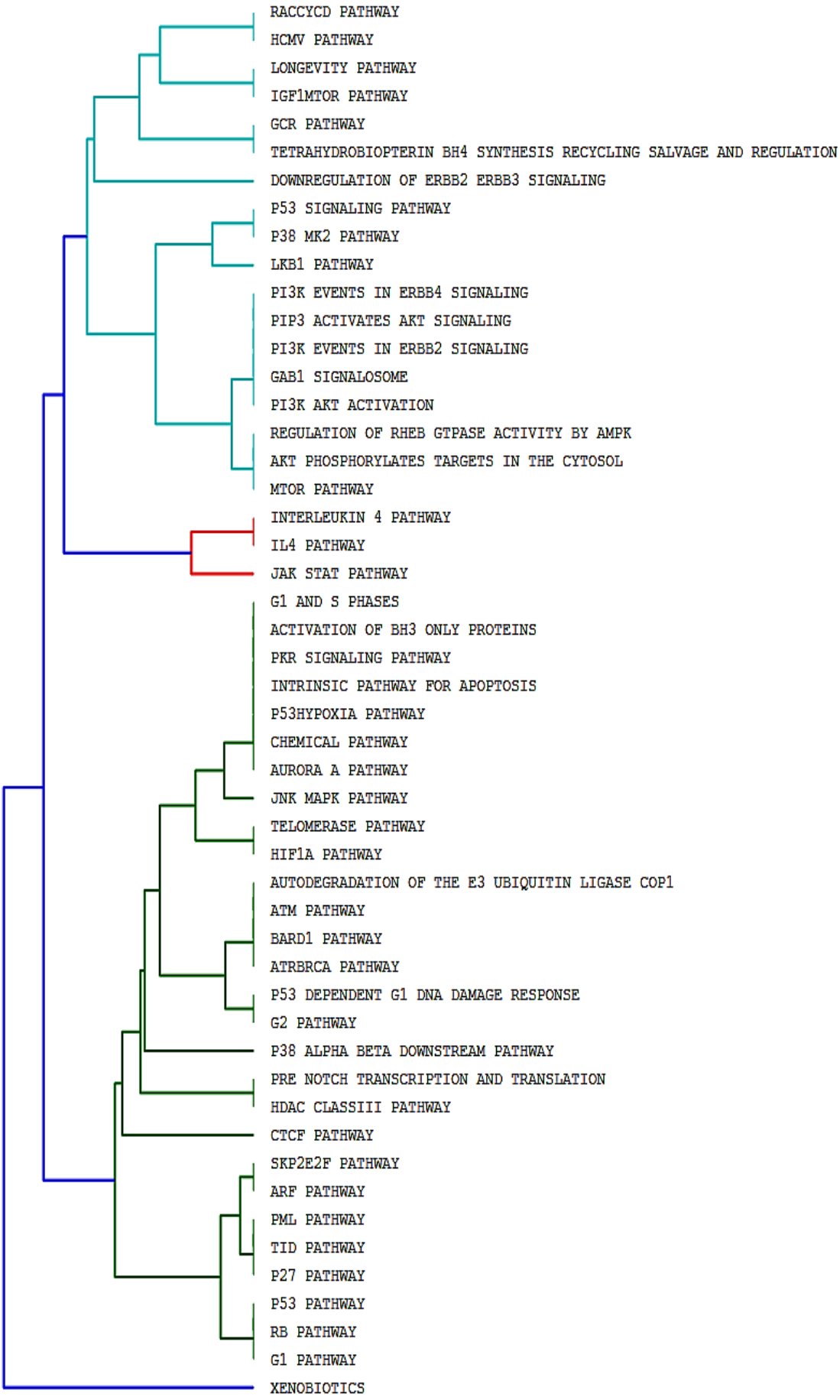
Annexe 1 : Gène analysés

ABCC2	DICER1	IGF1R	NOTCH3	PTCH2	TNKS
ABCG2	DOT1L	JAK2	NOTCH4	PTPN22	TP53
AFF2	DPYD	JAK3	PALB2	PTPRD	TPMT
AKT1	DTX2	KDM4A	PARP3	RAD50	TPR
ALK	DUSP2	KDM6A	PAX7	RAD51C	TRAF3
ALKBH3	EP300	KIT	PCDH15	RB1	TSC2
AMER1	EPHB3	KMT2B	PCDH7	RICTOR	USP8
ANO1	ERBB2	KMT2C	PDGFRA	RPS6KB1	WHSC1
ARAF	ERBB4	KMT2D	PDGFRB	RPS6KC1	WWOX
ARID1A	ERCC2	LTK	PHOX2B	SF3B1	
ARID1B	ETV4	MAP3K1	PIK3CA	SLC35F3	
ATAD2	EWSR1	MAP3K13	PIM3	SLITRK6	
ATM	FLG	MITF	PKHD1	SMARCAD1	
ATRX	FLT1	MLH1	PLAT	SMARCAL1	
CCSER1	FOXA1	MSH3	PMS2	ST20	
CYP11B1	FOXM1	MSH6	POLE	STAT3	
CYP1B1	GNAS	NAALADL2	PPP1R3A	SULT1A1	
CYP2C9	HRNR	NAT1	PRDM1	TBC1D7	
CYP2D6	HSP90AA1	NCOR1	PRKDC	TDRD3	
DDX11	HSP90B1	NOTCH2	PRX	TET2	

Annexe 2 : Gènes retrouvés mutés parmi les 24 échantillons



Annexe 3 : Gènes pour lesquels deux mutations ou plus ont été identifiées entre des échantillons différents.



Annexe 4 : Voies de régulation biologiques des ostéosarcomes

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152,** 3–13 (2009).
2. December;44:547-553, A. J. O. 2015. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *The American Journal of Orthopedics* **44,** (2015).
3. Bacci, G. *et al.* Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* **106,** 1154–1161 (2006).
4. Kaste, S. C. *et al.* Tumor size as a predictor of outcome in pediatric non-metastatic osteosarcoma of the extremity. *Pediatr Blood Cancer* **43,** 723–728 (2004).
5. Clark, J. C. M., Dass, C. R. & Choong, P. F. M. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134,** 281–297 (2008).
6. Bacci, G. *et al.* Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: recent experience at Rizzoli Institute. *Oncol. Rep.* **9,** 171–175 (2002).
7. Duchman, K. R., Gao, Y. & Miller, B. J. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiology* **39,** 593–599 (2015).
8. Bielack, S. S. *et al.* Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.* **20,** 776–790 (2002).
9. Davis, A. M., Bell, R. S. & Goodwin, P. J. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J. Clin. Oncol.* **12,** 423–431 (1994).
10. Bramer, J. a. M., van Linge, J. H., Grimer, R. J. & Scholten, R. J. P. M. Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: a systematic review. *Eur J Surg Oncol* **35,** 1030–1036 (2009).
11. Zs, K. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma., Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J Orthop* **48, 48,** 238, 238–246 (2014).

12. Klein, M. J. & Siegal, G. P. Osteosarcoma: Anatomic and Histologic Variants. *American Journal of Clinical Pathology* **125,** 555–581 (2006).
13. Gomez-Brouchet, A. *et al.* Rôle du pathologiste dans la prise en charge des tumeurs osseuses primitives malignes : ostéosarcomes et tumeurs de la famille Ewing après traitement néoadjuvant. *Annales de Pathologie* **31,** 455–465 (2011).
14. Link, M. P. *et al.* The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N. Engl. J. Med.* **314,** 1600–1606 (1986).
15. Link, M. P. *et al.* Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 8–14 (1991).
16. Le Deley, M.-C. *et al.* SFOP OS94: A randomised trial comparing preoperative high-dose methotrexate plus doxorubicin to high-dose methotrexate plus etoposide and ifosfamide in osteosarcoma patients. *European Journal of Cancer* **43,** 752–761 (2007).
17. Bacci, G. *et al.* Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *J Bone Joint Surg Br* **84,** 88–92 (2002).
18. Bacci, G. *et al.* Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J. Clin. Oncol.* **18,** 4016–4027 (2000).
19. Bielack, S. S. *et al.* Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* **33,** 2279–2287 (2015).
20. Marina, N. M. *et al.* Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **17,** 1396–1408 (2016).
21. Bishop, M. W., Janeway, K. A. & Gorlick, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. *Curr. Opin. Pediatr.* **28,** 26–33 (2016).

22. Gokgoz, N. *et al.* Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer* **92,** 2181–2189 (2001).
23. Marees, T. *et al.* Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *J. Natl. Cancer Inst.* **100,** 1771–1779 (2008).
24. Rickel, K., Fang, F. & Tao, J. Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone* (2016). doi:10.1016/j.bone.2016.10.017
25. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer* **14,** 722–735 (2014).
26. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499,** 214–218 (2013).
27. Ja, P. *et al.* Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111,** E5564-73 (2014).
28. Kovac, M. *et al.* Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun* **6,** (2015).
29. Livingston, J. A. *et al.* Analysis of osteosarcoma subtypes by clinical genomic testing to identify clinically actionable alterations. *JCO* **35,** 11019–11019 (2017).
30. Gaffney, S. G. & Townsend, J. P. PathScore: a web tool for identifying altered pathways in cancer data. *Bioinformatics* **32,** 3688–3690 (2016).
31. Chen, X. *et al.* Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep* **7,** 104–112 (2014).
32. Hedegaard, J. *et al.* Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS ONE* **9,** e98187 (2014).
33. Ferrer, I. *et al.* Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol.* **17,** 297–303 (2007).

34. Guyard, A. *et al.* DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch.* **471,** 491–500 (2017).
35. Chiappetta, C. *et al.* Whole-exome analysis in osteosarcoma to identify a personalized therapy. *Oncotarget* **8,** 80416–80428 (2017).
36. Alkan, C., Coe, B. P. & Eichler, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* **12,** 363–376 (2011).
37. Beroukhim, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463,** 899–905 (2010).
38. Windsor, R. E., Strauss, S. J., Kallis, C., Wood, N. E. & Whelan, J. S. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study. *Cancer* **118,** 1856–1867 (2012).
39. Gao, X., Le, X. & Costa, D. B. The safety and efficacy of osimertinib for the treatment of EGFR T790M mutation positive non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **16,** 383–390 (2016).
40. Yu, H. A. *et al.* Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann. Oncol.* **25,** 423–428 (2014).
41. Massard, C. *et al.* High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov* **7,** 586–595 (2017).
42. Meeting Library | Routine molecular screening of advanced refractory cancer patients: An analysis of the first 2490 patients of the ProfilER Study. Available at: http://meetinglibrary.asco.org/record/152168/abstract. (Accessed: 28th August 2017)
43. Gonzalez, D. *et al.* BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel. *Br. J. Dermatol.* **168,** 700–707 (2013).
44. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483,** 100–103 (2012).

45. Mosca, E. *et al.* Systems biology of the metabolic network regulated by the Akt pathway. *Biotechnol. Adv.* **30,** 131–141 (2012).
46. Girouard, J., Lafleur, M.-J., Parent, S., Leblanc, V. & Asselin, E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* **128,** 335–343 (2013).
47. Zhu, J. *et al.* Role of RANK and Akt1 activation in human osteosarcoma progression: A clinicopathological study. *Exp Ther Med* **13,** 2862–2866 (2017).
48. Sun, G. *et al.* PRKDC regulates chemosensitivity and is a potential prognostic and predictive marker of response to adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Oncol. Rep.* **37,** 3536–3542 (2017).
49. Li, X. *et al.* Targeting DNA-PKcs increased anticancer drug sensitivity by suppressing DNA damage repair in osteosarcoma cell line MG63. *Tumour Biol.* **36,** 9365–9372 (2015).
50. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32,** 2601–2613 (2013).
51. Yan, J. *et al.* Inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway exerts a therapeutic effect on osteosarcoma. *Mol Med Rep* **12,** 498–502 (2015).
52. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372,** 2509–2520 (2015).
53. Le, D. T. *et al.* Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357,** 409–413 (2017).

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) 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(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les moeurs.

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(e) et méprisé(e) si j'y manque.

ORDRE NATIONAL DES MÉDECINS
Conseil National de l'Ordre

RESUME

Introduction : Les ostéosarcomes sont des tumeurs primitives osseuses rares de l'enfant et de l'adulte jeune. Le traitement est polymodal et agressif reposant sur la chimiothérapie néoadjuvante, la chirurgie et la chimiothérapie adjuvante. Les patients qui, à l'issue de la chimiothérapie néoadjuvante, auront moins de 90% de nécrose sur pièce opératoire sont des patients mauvais répondeurs pour lesquels la survie globale à 5 ans est de 50%. Ces patients correspondent à près de 50% de la population traitée pour un ostéosarcome. Il semble donc nécessaire de pouvoir dès le diagnostic identifier cette catégorie de patients afin de leur proposer dès le début de la prise en charge un traitement adapté. L'objectif principal de ce travail à travers le séquençage d'un panel de gènes est d'essayer d'identifier des gènes ou des voies biologiques distinctement régulés entre bons répondeurs et mauvais répondeurs. L'objectif secondaire est de déterminer quelles sont les cibles potentiellement exploitables sur un plan thérapeutique.

Matériel et méthodes : 24 biopsies pré-thérapeutiques congelées de patients pédiatriques non métastatiques au diagnostic issus des centres hospitaliers de la Timone à Marseille, ou de Toulouse, ont été séquencées sur le NextSeq 500 d'Illumina. Un panel de 523 gènes a été étudié, établi d'après la publication de Kovac et al. parue dans *Nature* en décembre 2015.

Résultats : Aucune mutation ni gène muté de façon récurrente n'a permis de distinguer dès le diagnostic les bons répondeurs des mauvais répondeurs. Ce travail confirme la très grande hétérogénéité de ces tumeurs y compris dans une population très homogène ainsi que le rôle clé de *TP53* dans l'initiation de la sarcomatogenèse. 58% de notre effectif pourrait se voir proposer une thérapie ciblée dont 25% concernant la voie PI3K/AKT/mTOR.

Conclusion : Le séquençage ciblé de biopsies initiales congelées d'ostéosarcomes de patients pédiatriques non métastatiques au diagnostic n'a pas permis de mettre en évidence une mutation ou un gène muté de façon récurrente permettant de distinguer dès le diagnostic les bons répondeurs des mauvais répondeurs. Il est en revanche intéressant de noter qu'un peu plus de la moitié de notre effectif pourrait se voir proposer un traitement par thérapie ciblée, incitant à inclure ces patients dans ces essais cliniques.

Mots clés : ostéosarcome, séquençage, cibles thérapeutiques.