



HAL
open science

Carcinogenèse commune des cancers

Diaddin Hamdan

► **To cite this version:**

Diaddin Hamdan. Carcinogenèse commune des cancers. Cancer. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2021. Français. NNT : 2021PA131062 . tel-03875153

HAL Id: tel-03875153

<https://theses.hal.science/tel-03875153>

Submitted on 28 Nov 2022

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

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

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD
École doctorale Sciences, Technologies, Santé Galilée

Carcinogène commune des cancers

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par

Diaddin HAMDAN

Laboratoire Inserm UMR942

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN EN SCIENCE

soutenue le 03/12/2021 devant le jury d'examen constitué de :

Guilhem BOUSQUET, Université Sorbonne Paris Nord, Président du jury

Jacqueline LEHMANN-CHE, Université de Paris, Rapportrice

Jean-Paul FEUGEAS, Université de Franche-Comté, Rapporteur

Mélanie DI BENEDETTO, Université Sorbonne Paris Nord, Directrice de thèse

Titre : Carcinogénèse commune des cancers

Résumé :

Contexte : La carcinogénèse est le résultat de l'accumulation de mutations constitutionnelles et acquises. La génétique constitutionnelle à forte pénétrance pourrait suffire à la cancérogénèse comme les mutations de *BRCA*. Aussi, des facteurs externes bien connus comme le tabac sont probablement suffisants pour expliquer la carcinogénèse. Cependant la forte pénétrance ainsi que les facteurs externes n'expliquent à ce jour qu'environ 5-10 % des cancers. En fait, la plupart des cancers sont probablement le résultat d'une association multifactorielle de mutations constitutionnelles de pénétrance faible à modérée et de mutations acquises induites par des facteurs externes de moindre impact.

Les études de ségrégation familiale, et plus récemment les études sur de larges populations (Genome Wide Association Studies, GWAS) identifient généralement des polymorphismes dont la valeur fonctionnelle reste souvent inconnue et nécessitent beaucoup de ressources.

Afin d'étudier plus finement cet aspect de la faible pénétrance, j'ai choisi d'utiliser une approche individuelle innovante dont nous avons déjà fait la preuve de concept dans notre laboratoire. En effet cette approche a permis de mettre en évidence une mutation constitutionnelle dans le gène *MET* chez une jeune femme atteinte d'un cancer du sein, d'un syndrome myéloprolifératif et d'une polyarthrite rhumatoïde sans syndrome génétique de prédisposition connu. Cette mutation nous a permis d'établir un lien fonctionnel via *MET* entre cancer et maladie inflammatoire dans un modèle de souris transgénique.

Méthodes : En interrogeant la tumorothèque de l'Hôpital Saint-Louis, j'ai identifié huit patientes avec un cancer concomitant du sein et de la thyroïde sans syndrome de prédisposition connu de type Cowden, ni facteur de risque environnemental évident.

Une microdissection laser des cellules tumorales a été réalisée pour chacun des prélèvements des cancers puis une analyse génomique à haut débit de type OncoScan™ adaptée aux prélèvements fixés en formol. En parallèle, une analyse de type NGS a été faite sur les échantillons congelés. Le but était la recherche des événements génétiques communs de type mutation, perte d'hétérozygotie (LOH) ou variation de nombre de copies des gènes.

Résultats : 1) L'analyse OncoScan™ a permis d'abord d'identifier deux régions du chromosome X qui ont subi essentiellement des pertes de matériel chez cinq patientes parmi les huit. La probabilité qu'une même région soit le siège d'une perte ou gain de matériel sporadique chez plusieurs patientes est faible, et laisse supposer qu'il s'agit probablement d'un événement constitutionnel impliquées dans la carcinogénèse. 2) Chez une patiente parmi les 8 avec une histoire intrigante de cancers multiple sans facteur de risque évident, j'ai identifié après une analyse par OncoScan™ et NGS des prélèvements tumoraux et constitutionnels, une mutation constitutionnelle d'une valeur fonctionnelle inconnue du gène *PRAME*. Ce gène code pour un antigène associé au cancer qui semble intéressant comme outil diagnostique et thérapeutique pour différents types de cancer.

Conclusions : Par une approche individuelle, nous avons réussi à identifier des événements constitutionnels de faible ou moyenne pénétrance et potentiellement impliquée dans la carcinogénèse. Cette approche est possible mais c'est de plus en plus compliqué à cause de l'hétérogénéité et la poly génie impliquée. Les méthodes biologiques classiques arrivent à leurs limites d'où la question d'utiliser la modélisation mathématique et l'intelligence artificielle.

Mots clefs : Carcinogénèse ; Génétique constitutionnelle ; pénétrance ; Cancer du sein ; Cancer de la thyroïde ; OncoScanTM ; NGS.

Title: Common carcinogenesis of cancers

Abstract:

Background: Carcinogenesis is the result of the accumulation of constitutional and acquired mutations. Constitutional genetics with high penetrance could be sufficient for carcinogenesis like *BRCA* mutations. Also, well-known external factors such as smoking are probably sufficient to explain carcinogenesis. However, this only explains about 5-10% of cancers.

Most cancers are the result of a multifactorial combination of constitutional mutations of low to moderate penetrance and acquired mutations induced by external factors of lesser impact.

Family segregation studies, and more recently Genome Wide Association Studies (GWAS), generally identify polymorphisms with unknown functional value, and require a lot of resources.

In this work I chose to use an innovative individual approach that we have already proved in our laboratory. Indeed, we identified a constitutional mutation in the *MET* gene with unknown functional significance in a young woman with breast cancer, myeloproliferative syndrome and rheumatoid arthritis without a known genetic predisposition syndrome. This mutation allowed us to establish a link between cancer and inflammatory disease in a transgenic mouse model.

Methods: Using the tumor library of the Hôpital Saint-Louis, I identified eight patients with concomitant breast and thyroid cancer without known Cowden-type predisposition syndrome or obvious environmental risk factors.

A laser microdissection of the tumor cells was performed for each of the cancer samples followed by a high-throughput genomic analysis using OncoScanTM technology adapted to formalin-fixed samples. In parallel, an NGS analysis was performed on the frozen samples. The aim was to search for common genetic events such as mutation, loss of heterozygosity (LOH) or gene copy number variation.

Results: 1) OncoScanTM analysis first identified two regions of the X chromosome that were predominantly lost in five of the eight patients. The probability that the same region is lost sporadically in several patients is low, and suggests that it is rather a constitutional event probably involved in carcinogenesis. 2) In one patient among the 8 with an intriguing history of multiple cancers without obvious risk factors, using OncoScanTM and NGS analysis of tumors and constitutional samples, I identified a constitutional mutation of unknown functional value in the *PRAME* gene. This gene encodes a cancer-associated antigen which is gaining progressively a wide interest as a diagnostic and therapeutic tool for different types of cancer.

Conclusions: With the individual approach, we managed to identify constitutional events of low or medium penetrance and potentially involved in carcinogenesis. This approach is possible but it becomes so difficult because of the heterogeneity, and the multiple genes and factors involved. Usual biologic experiences are facing their limits. This raises the question of using mathematical models and artificial intelligence to overcome tumor heterogeneity?

Key words: Carcinogenesis; Constitutional genetics; Penetrance; Breast cancer; Thyroid cancer; OncoScanTM; NGS.

REMERCIEMENTS

Aux membres de jury, Monsieur le Professeur Guilhem BOUSQUET, Madame le Docteur Mélanie Di Benedetto, Madame le Professeur Jacqueline LEHMANN-CHE, et Monsieur le Professeur Jean-Paul FEUGEAS pour leurs disponibilités et leurs conseils.

Je voudrais également remercier Madame le Professeur Anne JANIN de m’avoir accepté dans son unité lors du début de mon travail de thèse.

Je remercie évidemment l’ensemble des membres de l’équipe pour leurs aides et disponibilité.

Et le plus important, je remercie infiniment mon épouse pour son soutien pendant ces années.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
I. INTRODUCTION	9
1. La carcinogenèse.....	9
2. La génétique constitutionnelle	10
3. Epidémiologie des cancers du sein et de la thyroïde.....	18
4. Les associations des cancers du sein et de la thyroïde	19
II. MATERIELS ET METHODES	21
1. Patientes et échantillons tumoraux.....	21
2. Microdissection laser et extraction d'ADN.....	23
3. La technologie OncoScan™ (Affymetrix©).....	25
4. Recherche de microsatellites et séquençage Sanger	27
5. Analyse génomique par séquençage de nouvelle génération	29
6. Immunohistochimie de la protéine PRAME	32
7. Quantification de l'expression de PRAME par RT-ddPCR	33
III. RESULTATS	35
1. Données d'OncoScan™ et identification d'événements génétiques.....	35
2. Les microsatellites et le séquençage Sanger	39
3. Le séquençage de nouvelle génération.....	40
4. Faible expression du PRAME dans les échantillons tumoraux.....	51
IV. DISCUSSION	53
V. PERSPECTIVES et CONCLUSION	59
VI. BIBLIOGRAPHIE	61
VII. ANNEXES	73
VIII. PUBLICATION	76

Table des figures

Figure 1 : Incidences des cancers du sein et de la thyroïde selon l’Institut de veille sanitaire.	18
Figure 2 : Sélection des patientes.....	21
Figure 3 : Arbre généalogique de la patiente Madame S qui a eu 6 cancers différents entre les âges de 39 et 70 ans sans aucun syndrome connu de prédisposition au cancer.	23
Figure 4 : Principe de la microdissection laser. A: le système LMPC. B: les cellules tumorales sélectionnées puis découpées avec précision (d’après Bousquet G et al. Oncotarget 2015).	24
Figure 5 : Principe de la technologie d’OncoScan™ (adapté d’Affymetrix®).....	26
Figure 6 : Séquençage de type Sanger.	29
Figure 7 : Gain de nombre de copie du gène <i>GSTT1</i> avec la technologie OncoScan™ dans 10 prélèvements sur 17 des cancers du sein et de la thyroïde.	36
Figure 8 : Gain de nombre de copie du gène <i>CSMD3</i> avec la technologie OncoScan™ dans 10 prélèvements dans 6 couples de 8 des cancers du sein et de la thyroïde.....	37
Figure 9 : Les deux régions de LOH des chromosomes 4 et 22 dans les échantillons de tumeurs du sein, de la thyroïde et de l'oncocytome de Madame S en utilisant OncoScan™, avec les gènes correspondants et leur classification fonctionnelle.	38
Figure 10 : Régions de pertes du nombre de copies sur le chromosome 22 de l'ADN constitutionnel (15 528 649 - 21 213 133) identifiées à l'aide du NGS qui correspondent plus ou moins au LOH (16 054 713 - 24 341 388) identifié à l'aide d'OncoScan™.....	40
Figure 11 : Analyse de variants constitutionnels et somatiques et les profils des différents échantillons de Madame S.....	47
Figure 12 : a) Structure de la protéine PRAME, avec la flèche montrant la modification de la protéine correspondant à la mutation du gène <i>PRAME</i> trouvée (c.70 C>G p.Arg24Gly). b) Immunomarquage de PRAME et de PS100 dans les tumeurs du sein et de la thyroïde de Madame S et dans une métastase ganglionnaire de mélanome comme contrôle positif. c) ddCR sur des cellules microdisséquées au laser pour analyser le niveau d’expression de l'ARNm de <i>PRAME</i> dans les cellules des cancers du sein et de la thyroïde de Madame S par rapport aux cellules d’un mélanome.....	52
Figure 13 : Réseau d'interaction selon la base de données « String Database » (v.11) pour établir une connexion entre les différentes protéines correspondant à des gènes mutés dans deux échantillons ou plus de Madame S, 10 protéines interconnectées qui peuvent être liées à PRAME par la cadhérine-1 (CDH1).	56

Liste des tableaux et annexes

Tableau 1 : Lignes directrices du « National Comprehensive Cancer Network » pour la prise en charge du cancer du sein et de l'ovaire en fonction du risque génétique et familial.

Tableau 2: Recommandations du Groupe Cancer et Génétique et de l'Institut National du Cancer concernant les analyses de panels de gènes dans le cadre d'une prédisposition héréditaire aux cancers du sein et de l'ovaire.

Tableau 3: Recommandations de dépistage ou de prévention pour les personnes porteuses de mutations des gènes analysés dans le panel du groupe Cancer et Génétique.

Tableau 4 : Données cliniques.

Tableau 5 : Pureté d'un échantillon d'ADN.

Tableau 6 : Les 2 régions du chromosome X affectées par une perte ou un gain du matérielles chez 5 des 8 patientes.

Tableau 7 : Régions de LOH trouvées dans 3 échantillons fixés au formol de tumeurs du sein, de la thyroïde et du rein de la patiente à multiple antécédents de cancers (Madame S) analysés par OncoScan™.

Tableau 8 : Régions de perte de nombre de copie sur le chromosome 22 de l'ADN constitutionnel dans l'échantillon de tissu congelé analysé par NGS.

Tableau 9 : Les variants constitutionnels à fort impact et une fréquence $\leq 0,1$ % chez la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Tableau 10 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans le cancer du sein gauche de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Tableau 11 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans le cancer du sein droit de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Tableau 12 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans la rechute du cancer du sein gauche de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Tableau 13 : Analyse de variants constitutionnels des gènes de la LOH du chromosome 22 en utilisant 3 bases de données (1000 Génomes, GenomeAD et Kaviar) avec un seuil de fréquence $\leq 0,5$ % pour éliminer les polymorphismes.

Tableau 14 : Gènes ayant subi des mutations constitutionnelles ou somatiques dans ≥ 2 échantillons de la patiente Madame S, avec un avec un seuil de fréquence $\leq 0,5$ % dans les 3 bases de données (1000 Génomes, GenomeAD et Kaviar).

Annexe 1 : Les échantillons des 8 patientes.

Annexe 2 : Les évènements d'altérations du nombre de copies identifiées dans les cancers du sein, de la thyroïde et du rein du Madame S utilisant OncoScan™.

I. INTRODUCTION

1. La carcinogénèse

La carcinogénèse est le résultat de l'accumulation d'événements génétiques et épigénétiques, avec un équilibre entre les mutations génétiques constitutionnelles et les anomalies génétiques acquises dues à des facteurs de stress externes.

D'un côté, la génétique constitutionnelle à forte pénétrance pourrait suffire à la cancérogénèse. Ceci est bien décrit avec les mutations constitutionnelles dans les gènes de prédisposition aux cancers, comme les mutations de *BRCA* dans les cancers du sein [1]. De l'autre côté du spectre, des facteurs externes bien connus comme le tabac ou l'exposition au soleil sont peut-être suffisants pour expliquer la carcinogénèse du cancer du poumon ou du mélanome.

Nous pensons que la plupart des cancers, peut-être même tous les cancers, sont le résultat d'une combinaison de mutations constitutionnelles de pénétrance variables et de mutations acquises induites par des facteurs externes également d'impact variable. Le vieillissement, avec l'accumulation de facteurs de stress externes associée à une génétique de pénétrance faible à modérée, pourrait expliquer l'incidence accrue de cancers multiples chez une même personne avançant en âge [2].

Pendant plusieurs décennies et la naissance de la génétique moderne appliquée à la clinique, la génétique constitutionnelle a reposé sur des études de ségrégation familiale. Plus récemment, elle s'est très largement tournée vers des études faites sur de larges populations (Genome Wide Association Studies, GWAS). Ces études identifient généralement des polymorphismes plus ou moins nombreux, mais dont la valeur fonctionnelle reste souvent inconnue, ce qui finalement en limite l'utilité pour le soin au quotidien.

2. La génétique constitutionnelle

Les mutations dans les gènes de prédisposition aux cancers, gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes, perturbent leur fonctionnement et augmentent les risques de développer un cancer [3]. Donc, il est essentiel de localiser ces gènes et de comprendre leur fonctionnement sachant que la transmission d'un génotype et d'un phénotype est très complexe avec des multiples facteurs qui interagissent entre eux [4, 5].

Au début, les études de ségrégation familiale et les études cas-témoins ont permis d'identifier des gènes candidats de prédisposition aux cancers [6].

Les études de ségrégation familiale visent à démontrer une prévalence supérieure du cancer chez les apparentés du premier degré des personnes atteintes comparé à celle de la population générale, et déterminer statistiquement le mode de transmission [7, 8]. Les études de cas-témoins visent à déterminer les facteurs qui contribuent au développement du cancer en comparant les personnes atteintes et exposée au facteur en question, avec celles saines non exposées [9].

L'association génotype-phénotype dépend de la pénétrance des gènes de prédisposition aux cancers identifiés. La pénétrance correspond à la proportion des personnes avec un génotype donné et qui ont le phénotype correspondant [10].

Les gènes de forte pénétrance furent classiquement identifiés par les études de ségrégation familiale et les études cas-témoins. L'identification d'une région génomique précise chez les personnes atteintes d'un cancer suggère une probabilité de présence d'un gène de prédisposition au cancer dans cette région.

Cependant, il est admis que les mutations des gènes de forte pénétrance ne sont responsables que d'environ 5 à 10 % des cancers [11-13]. Le reste est dû à une accumulation d'événements génétiques et épigénétiques, avec l'addition probable de nombreuses mutations génétiques constitutionnelles de faible à moyenne pénétrance et

d'anomalies génétiques acquises dues à des facteurs de stress externes [14, 15]. Les gènes de faible pénétrance sont identifiés par des études d'association entre la présence du variant et la maladie en comparant deux populations, celle avec un cancer et une population contrôle. Les allèles de faible à moyenne pénétrance sont à priori plus fréquents dans la population générale que ceux à forte pénétrance [14].

Familles avec des cancers héréditaires

Certaines familles accumulent plusieurs cas de cancers en raison de facteurs environnementaux communs, mais aussi à la présence de variants alléliques de gènes de prédisposition probable, ou peut-être pour certains simplement par hasard si le cancer est fréquent dans la population générale.

Les études des populations supposent qu'un gène de prédisposition au cancer est identifiable par les antécédents familiaux et personnels de cancer, la clinique et l'étude épidémiologique. Et si l'étude épidémiologique retrouve une augmentation de risque de cancer associé à l'histoire familiale, des études de ségrégation sont menées pour identifier les loci potentiellement concernés, le mode transmission, la fréquence et la pénétrance dans la population générale ainsi que la pénétrance en fonction de l'âge [16, 17].

L'étude des gènes de prédisposition au cancer du sein, du côlon et de la prostate a permis la mise en place de critères pour identifier les familles à risque (critères de Johns Hopkins). Il s'agit de familles avec trois membres ou plus de premier degré de parenté atteint d'un cancer, trois générations successives avec des cas de cancer, ou au moins deux fratries avec le même cancer diagnostiqués avant 56 ans [18, 19]. Ces facteurs augmentent le risque relatif individuel pour les membres de la même famille [14].

Les cartes de liens génétiques et les gènes de prédisposition au cancer

Après avoir identifié les familles à risque du cancer, il faut obtenir l'ADN des sujets atteints de cancer puis les cribler en utilisant des marqueurs de microsatellites polymorphiques ou des SNP (single nucleotide polymorphisms) qui couvrent le génome entier avec une densité élevée, ce qui est appelé l'approche génome entier ou « Genome Wide Scan ». La question posée par cette analyse est celle d'identifier un segment génétique hérité toujours en association avec un trait pathologique comme le cancer. Le succès de l'analyse dépend de la densité des marqueurs.

La carcinogenèse est le plus souvent multifactorielle avec des gènes de forte pénétrance et d'autre de moyenne à faible pénétrance, avec un effet de l'âge, la transmission entre les générations et le croisement maternel et paternel. Tous ces facteurs d'hétérogénéité rendent les études des familles limitées [20]. Il est possible de réduire l'effet de cette hétérogénéité par les études des populations isolées où la consanguinité est élevée, ce qui limite le nombre de variants alléliques impliqués.

Les études de ségrégation familiale ont permis d'identifier des situations où le phénotype est contrôlé par un nombre limité de gènes comme par exemple les gènes *BRCA1/2* qui sont responsables de la majorité des cancers du sein héréditaires [21]. Les gènes de prédisposition au cancer du sein *BRCA1* et 2 sont parmi les premiers à avoir été étudiés chez un grand nombre de familles à risque élevé avec plusieurs membres qui partagent les mêmes caractéristiques pathologiques [22-25].

Grâce à ce type d'études, le gène *MLH1* de réparation des mésappariements d'ADN (DNA mismatch) a été identifié comme un des gènes impliqués dans les cancers colorectaux héréditaires sans polypose (HNPCC) [26]. Aussi, d'autres études importantes ont permis d'identifier en Islande et chez des familles juives Ashkénaze des mutations constitutionnelles de *BRCA1* dont 2 impliquées dans le cancer du sein héréditaire [27-29].

Des recommandations internationales et nationales ont été mise en place afin de préciser les gènes à analyser dans les syndromes de prédisposition héréditaires (Tableaux 1, 2 et 3).

Tableau 1 : Lignes directrices du « National Comprehensive Cancer Network » pour la prise en charge du cancer du sein et de l'ovaire en fonction du risque génétique et familial (Adapté de [30]).

Gene	Breast cancer risk management	Ovarian cancer risk management	Other cancer risk management
<i>ATM</i>	Increased risk Annual mammography and breast MRI starting at 40 years RRS: based on FH	Potential increase in risk with insufficient evidence to recommend RRS	Insufficient evidence for pancreas or prostate cancers
<i>BRCA1</i>	Increased risk 25-29 years , annual breast MRI or mammogram 30-75 years , annual mammogram and breast MRI >75 years , based on IR RRS: based on IR and FH	Increased risk RRS: based on individual risk and FH between 35-40 years	Prostate, uterine (possible)
<i>BRCA2</i>	Increased risk 25-29 years , annual breast MRI or mammogram 30-75 years , annual mammogram and breast MRI >75 years , based on IR RRS: based on IR and FH	Increased risk RRS: based on IR and FH between 40-45 years	Pancreas, prostate, melanoma
<i>PALB2</i>	Increased risk Annual mammography and MRI starting at age 30 years RRS: based on FH	Insufficient evidence	Insufficient evidence
<i>TP53</i>	Increased risk 20-29 years , annual breast MRI 30-75 years , annual breast MRI and mammogram >75 years , based on IR RRS: based on IR and FH	No increased risk	Neurological cancers, colon, skin cancers
<i>CDH1</i>	Increased risk for lobular cancer Annual mammogram and breast MRI starting at age 30 years RRS: based on FH	No increased risk	Diffuse gastric cancer
<i>PTEN</i>	Increased risk Annual mammogram with breast MRI starting at age 30-35 years or 5-10 years before earliest breast cancer in family >75 years , based on IR RRS: based on IR and FH	No increased risk	Endometrial cancer, thyroid, colon, renal cancer, skin cancers
<i>BRIP1</i>	Insufficient evidence	Increased risk Consider RRS at 45-50 years	Not available
<i>CHEK2</i>	Increased risk Annual mammogram and breast MRI starting at age 40 years RRS: based on FH	No increased risk	Colon cancer
<i>NBN</i>	Increased risk Annual mammogram and breast MRI starting at age 40 years RRS: based on FH	Insufficient evidence	Insufficient evidence

<i>NF1</i>	Increased risk Annual mammogram from age 40 years and consider breast MRI from 30-50 years RRS: based on FH	No increased risk	Malignant peripheral nerve sheath tumors, GIST, others
<i>STK11</i>	Increased risk Annual mammogram and breast MRI starting at age 25 years RRS: based on FH	Increased risk of non-epithelial cancers Annual pelvic examination and PAP smear	Colon, stomach, pancreas, cervix, uterine, testis, lung
<i>RAD51C</i>	Insufficient evidence	Increased risk Consider RRS at 45-50 years	Not available
<i>RAD51D</i>	Insufficient evidence	Increased risk Consider RRS at 45-50 years	Not available
<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i>	Insufficient evidence, manage based on FH	Increased risk	Colon, uterine, others

MRI: Magnetic Resonance Imaging; RRS: Risk reduction surgery; FH: Family History; IR: Individual Risk.

L'approche du « Genome Wide Scan » est la base de l'analyse de type « genome wide association study » (GWAS). Elle utilise jusqu'à 1000 000 de marqueurs, et étudie un grand nombre de sujets atteints de cancer et un grand nombre de sujets témoins. Elle dépend de la distance qui sépare les loci du cancer et les marqueurs microsatellites en recouvrant la totalité du génome, et leur ségrégation lors la recombinaison après la méiose cellulaire.

Plus un marqueur est proche d'un gène de prédisposition, plus la probabilité qu'ils se ségrége ensemble est élevée, et donc que les 2 soient liés. Cette probabilité est estimé par l'unité de mesure de *centimorgan* [31]. Sauf que pour cette probabilité reste significative à $\leq 0,05$, il faudrait diminuer significativement la chance du hasard pour chaque marqueur testé ($p \leq 0,0000001$). Donc, la méthode GWAS ne détecte que les événements génétiques importants, une raison pour laquelle il faut inclure un grand nombre de sujets malades et des sujets témoins dans l'analyse. Aussi, cette méthode nécessite un déséquilibre de liaison génétique ou « linkage disequilibrium » entre le gène en question et le marqueur génotypé. Cependant les marqueurs utilisés sont des SNP fréquents, liés à des variants

généétiques fréquents qui sont responsables d'environ 10 % de l'héritabilité, ce qui omet le rôle des autres variants [32].

Tableau 2: Recommandations du Groupe Cancer et Génétique et de l'Institut National du Cancer français concernant les analyses de panels de gènes dans le cadre d'une prédisposition héréditaire aux cancers du sein et de l'ovaire (Adapté de [33]).

Gene	Cytogenetic location	Penetrance	Protein functions	Cumulate risk of breast cancer	References
<i>BRCA1</i>	17q21.31	High	Repair of DNA double-strand breaks using homologous recombination, cell cycle control, maintaining of genome integrity	46 – 87 % lifetime risk	[34, 35]
<i>BRCA2</i>	13q13.1	High	Repair of DNA double-strand breaks using homologous recombination	38 – 84 % lifetime risk	[34, 36]
<i>PALB2</i>	16p12.2	Moderate	Partner of <i>BRCA2</i> and regulator of its stability and its nuclear localization	35 % at 70 years	[37, 38]
<i>TP53</i>	17p13.1	High	Transcription Factor, cellular cycle, apoptosis, senescence, DNA Repair	80 % life-time risk (premenopausal)	[39, 40]
<i>CDH1</i>	16q22.1	Moderate	E-cadherin, cellular adhesion molecule	39 – 52 % before 40 years (lobular cancer)	[41, 42]
<i>PTEN</i>	10q23.31	High	Tumor phosphatase suppressor inhibiting PI3K and MAPK pathways	25 – 50 % lifetime risk	[43, 44]
<i>RAD51C</i>	17q22	Moderate	Repair of DNA using homologous recombination in interaction with <i>BRCA1/2</i>	Not known	[45-48]
<i>RAD51D</i>	17q12	Moderate	Repair of DNA using homologous recombination and maintaining of telomere	Not known	[49-51]
<i>MLH1</i>	3p22.2	High	Mismatch repair system	5 – 18 %	[52-57]
<i>MSH2</i>	2p21-p16				
<i>MSH6</i>	2p16.3	Moderate	Partner of <i>MSH2</i>	Not known	
<i>PMS2</i>	7p22.1				
<i>EPCAM</i>	2p21				

Tableau 3: Recommandations de dépistage ou de prévention pour les personnes porteuses de mutations des gènes analysés dans le panel du groupe Cancer et Génétique (Adapté de [58])

Gene	Breast surveillance	Risk reduction surgery		Gynecologic surveillance
		Breast	Pelvis	
<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	30 - 65 year , annual MRI + mammogram (+/- Ultrasound) After 65 years , mammogram +/- Ultrasound	Prophylactic mastectomy (Recommendation s HAS 2014 * and INCa 2017**)	Prophylactic annexectomy (discussed from the age of 40 years and according to mutations and FH of OC) **	Before RRS: standard surveillance and no efficacious ovarian screening available *
<i>PALB2</i> <i>CDHI</i>	(Recommendations HAS 2014 * and INCa 2017**)		No specific gynecological guidelines If FH of OC: MDC	Standard surveillance
<i>PTEN</i>				Standard surveillance If gynecologic lesions of CD: MDC
<i>TP53</i>	Starting at 20 years , annual MRI + Ultrasound (no systematic mammogram)			Standard surveillance
<i>RAD51C</i> <i>RAD51D</i>	No specific breast surveillance To be adapted to FH of BC	Not indicated	Prophylactic annexectomy (discussed from the age of 45 years and according to FH of OC)	Before RRS: standard surveillance and no efficacious ovarian screening to be proposed **
<i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i>	according to guidelines HAS 2014*		Ovarian and/or uterine RRS To be discussed in MDC according to Lynch syndrome guidelines	Uterine surveillance according to Lynch syndrome guidelines

BC: Breast Cancers; OC: Ovarian Cancers; FH: Family History; CD: Cowden disease; MDC: Multidisciplinary Committee; RRS: Risk reduction surgery.

* Recommendation of French Health Authority (HAS) 2014: French Breast cancer National screening program.

** © / Recommendation of French National Cancer Institute (INCa), April 2017.

Le séquençage de tous l'exome ou (Whole Exome Sequencing) vient compléter la méthode GWAS pour capturer l'ensemble des séquences codantes qui concentrent jusqu'à 85 % des mutations potentiellement pathogènes [59].

Ces méthodes basées sur les SNP ne détectent pas les variants de grande tailles comme les délétions, les duplications et les variations de nombre de copies, ni les interactions gène-environnement [60, 61]. Aussi, ces méthodes ne peuvent pas prendre en compte l'empreinte parentale, l'épigénétique ou les interactions avec les micro-ARN [60, 62-66].

L'analyse des liens génétiques utilise l'hybridation génomique comparative (CGH) et permet d'identifier les gains et les pertes de matériel génétique dans la tumeur en le comparant avec l'ADN normal et un ADN de référence afin de mesurer la différence d'intensité de fluorescence qui corrèle avec le nombre de copies [67, 68]. Une autre méthode est la puce (array) d'expression génétique qui analyse la différence de niveau d'expression des gènes dans la tumeur et dans un tissu normal, ce qui peut identifier des gènes impliqués dans la carcinogenèse et des voies de signalisation impliquées [69].

Les études d'association

Ces études analysent la présence d'une altération spécifique de l'ADN chez des sujets atteints de cancer en comparaison avec des personnes en bonne santé pour déterminer si cette altération est significativement plus fréquente chez les patients. Elles sont utilisées pour étudier les gènes candidats par une fonction, séquences ou positions, ainsi que les gènes de prédisposition identifiés dans les études de types GWAS.

Ces études peuvent utiliser des analyses de cohortes de sujets non atteints de cancer mais exposés à un facteur de risque spécifique, pour estimer le risque relatif et absolu du cancer. Elles peuvent aussi analyser des cas-témoins où les patients et les sujets sains sont choisis au sein de la même population avec des caractères similaires pour déterminer la prévalence du facteur de risque en question dans la population.

Ces analyses doivent prendre en compte les différents biais potentiels tel que l'âge, l'ethnicité ou le biais de rappel [14, 70-72]. L'association retrouvée entre le caractère en question et la maladie étudiée doit être confirmée par des études fonctionnelles [73, 74].

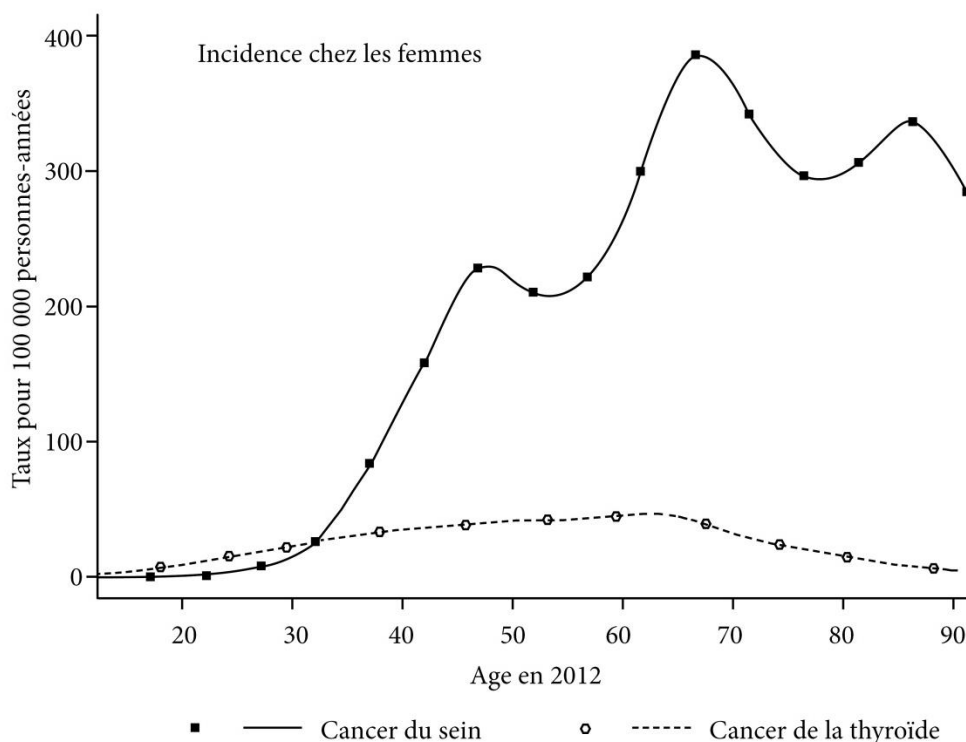
Cependant, les différents types d'études génétiques mentionnées ci-dessus ne détectent pas les variants rares (fréquence allélique < 0,5%) qui ont un effet moins fort que les variants « hotspot » [75].

3. Epidémiologie des cancers du sein et de la thyroïde

Le cancer du sein est le premier cancer chez la femme avec 50000 nouveaux cas par an en France, et un âge moyen de survenue à 65 ans (Figure 1) [76]. Les mutations des gènes de forte pénétrance, notamment *BRCA1* et *BRCA2*, ont été identifiées dans 30% des formes familiales de cancers du sein [22, 23, 77]. En revanche, les gènes de faible pénétrance sont difficilement identifiables, jusqu'alors sur des études génomiques de populations à faible risque de cancer, et leur valeur fonctionnelle demeure inconnue [78, 79].

Le cancer de la thyroïde est moins fréquent chez la femme avec 5000 nouveaux cas par an en France et un pic à 64 ans (Figure 1) [76]. Il existe des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde dans le cadre des néoplasies endocriniennes multiples (MEN2) avec des mutations constitutionnelles de l'oncogène *RET*. Et les formes familiales des cancers non médullaires sont liées à des mutations dans des gènes de plus faible pénétrance comme *BRAF* et *RAS* [80].

Figure 1 : Incidences des cancers du sein et de la thyroïde selon l'Institut de veille sanitaire (Adapté de [76]).



4. Les associations des cancers du sein et de la thyroïde

Ces deux cancers sont rares chez les femmes de moins de 40 ans, et plus encore leur association chez un même patient [76]. Les associations des formes non sporadiques sont décrites dans les syndromes de Cowden et Cowden-like. L'incidence est estimée à 1:200000. Ces syndromes sont liés à une mutation constitutionnelle du gène suppresseur de tumeur *PTEN*, ou à des variants des gènes *SDHx* (Succinate déshydrogénase) ou *KLLN* (killin, un inhibiteur de la réplication de l'ADN dépendant de p53) [9-13]. Les associations de formes sporadiques pourraient être liées à soit des interactions réciproques entre les voies de signalisation dépendantes des hormones thyroïdiennes et celles dépendantes de l'estradiol, et/ou l'exposition aux rayonnements ionisants : typiquement, la radiothérapie mammaire favoriserait la survenue secondaire d'un cancer de la thyroïde [81, 82]. Le cancer du sein augmente le risque de survenue de cancer de la thyroïde d'environ 50% (risque relatif RR=1.55), peut-être par irradiation de la thyroïde lors de la radiothérapie mammaire et sus-claviculaire dans le cadre du traitement de cancer du sein. Le cancer de la thyroïde augmente aussi le risque de cancer du sein d'environ 20% (RR=1.18). La raison est moins évidente, peut être liée en partie à la radiothérapie thyroïdienne [81].

En dehors de ces deux types d'association, environ 10 % des patientes certaines patientes développent des cancers du sein et de la thyroïde sans facteur de risque connu, ce qui peut être expliqué par des gènes de plus faible pénétrance non encore identifiés [83, 84].

L'idée de ce travail est née de la prise en charge de deux patientes de moins de 40 ans ayant un cancer du sein et de la thyroïde concomitants, où ni la radiothérapie ni les interactions hormonales ne peuvent expliquer la survenue concomitante de ces deux cancers. En outre, il n'y avait pas d'argument pour un syndrome génétique constitutionnel type Cowden. L'une des deux patientes avait également été opérée pour une oncocytome qui est une tumeur bénigne du rein.

Nous avons fait l'hypothèse chez ces deux patientes d'une carcinogenèse commune liée à des gènes de plus faible pénétrance. J'ai alors décidé de réutiliser une approche individuelle dont nous avons fait la preuve du concept dans notre laboratoire grâce aux nouvelles technologies appliquées à la génomique et à la transgénèse. Ainsi, chez une jeune femme atteinte d'un cancer du sein, d'un syndrome myéloprolifératif et d'une polyarthrite rhumatoïde sans syndrome génétique de prédisposition connu, en comparant l'ADN du cancer du sein, l'ADN des cellules triées CD34 de la moelle et l'ADN constitutionnel, une mutation constitutionnelle dans le gène *MET* c.2962C>T p.Arg988Cystéine a pu être identifiée. En utilisant la technologie CRISPR-Cas9, un modèle de souris transgéniques KI pour cette mutation *MET* a été obtenu reproduisant une myéloprolifération et des manifestations auto-immunes. Des facteurs d'exposition cancérigènes externes supplémentaire (UVB) étaient nécessaires pour le développement accru de cancers cutanés et thyroïdiens chez ces souris [85].

Donc, le but de ce travail est d'explorer la génétique de faible pénétrance avec comme exemple la carcinogenèse des cancers concomitant de la thyroïde et du sein non liée à un syndrome de prédisposition connu en confirmant la pertinence d'une méthode basée sur une approche individuelle qui permet de s'affranchir des limites des approches classiques des études génomiques.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Patientes et échantillons tumoraux

Après avoir interrogé le registre de la tumorothèque de l'Hôpital Saint-Louis pour les cancers de la thyroïde pris en charge entre 1995-2015, nous avons identifié 1073 patientes dont 41 (3,5%) ont eu un cancer du sein pendant cette même période. Trente-deux cas étaient des cancers métachrones et ont été exclus de ce travail, afin d'éliminer les facteurs de risque environnementaux et surtout le rôle de la radiothérapie mammaire dans la carcinogénèse thyroïdienne. Nous avons ainsi identifié 8 patientes (0,8%) avec un cancer concomitant du sein et de la thyroïde (Figure 2).

Aucune de ces 8 patientes ne répondait aux critères cliniques de syndrome de Cowden. Leurs données cliniques sont résumées dans le tableau 4. Quatre patientes avaient au moins 3 antécédents de cancers, sans association syndromique connue.

Figure 2 : Sélection des patientes.

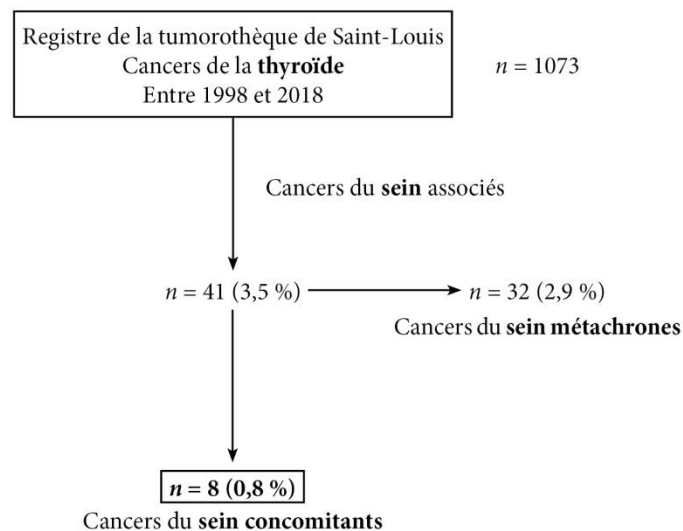


Tableau 4 : Données cliniques.

Patiente	Antécédents familiaux	Age au diagnostic	Cancer de la thyroïde	Cancer du sein	Tumeurs associées
1PLU	Fibrome utérin	37	Papillaire	CCI, RE- RP- HER2+	Mélanome
2PARA	Tumeur cérébral	49		CCI, RE+ RP+ HER2-	col
3 Madame S	Cancer du sein	40		CCI, RE+ RP+ HER2-	rein et ovaire
4BRO	Cancer du sein	56		CCI, RE- RP- HER2+	cutanée
5OUS	Kyste ovarien	40		CLI, RE+ RP+ HER2-	-
6MER	Cancer de l'estomac	49		CCI, RE- RP- HER2+	-
7LEG	-	64		CCI, RE+ RP+ HER2+	-
8ROZ	-	57		CCI, nd	-

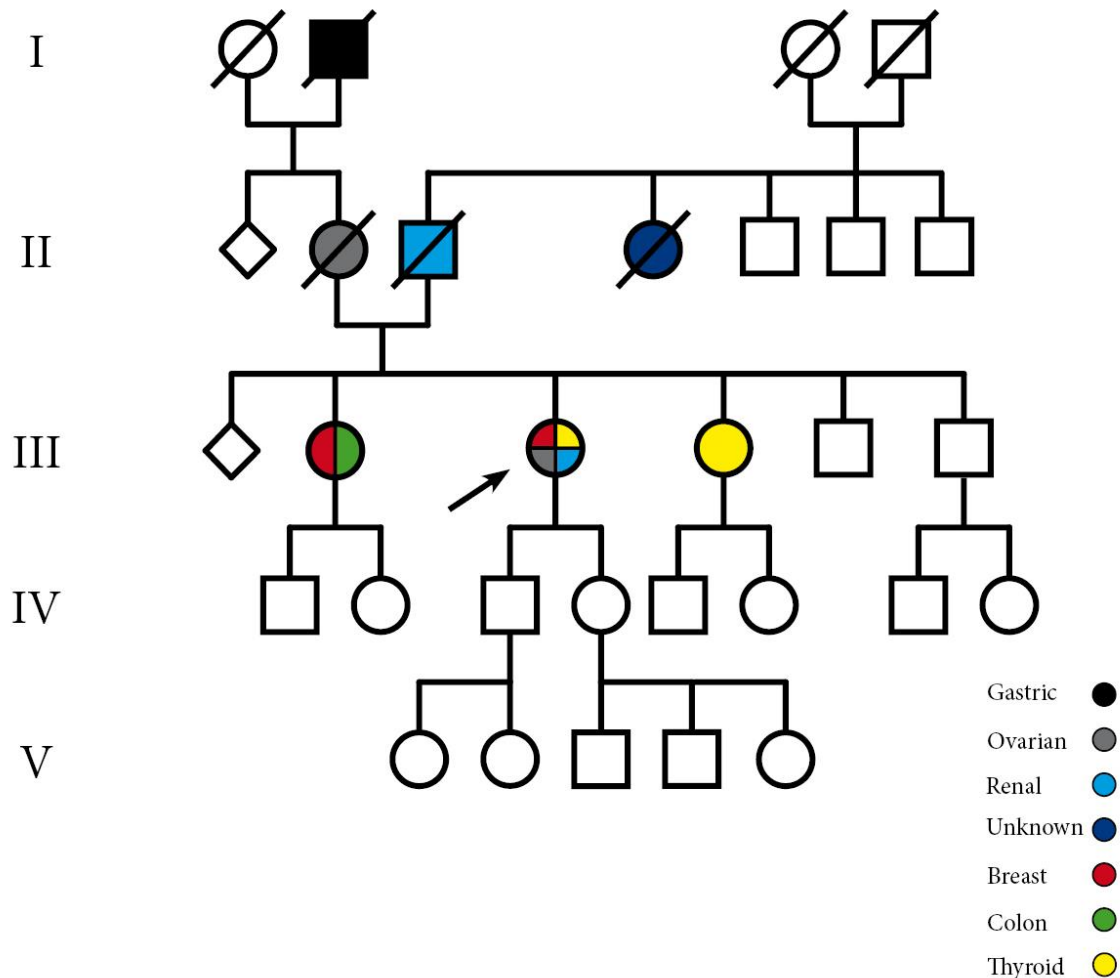
CCI : carcinome canalaire infiltrant, CLI : carcinome lobulaire infiltrant, RE : récepteur de l'œstrogène, RP : récepteur de la progestérone, HER2 : human epidermal growth factor receptor-2, nd : non disponible.

Parmi les 8 patientes, une (Madame S) avait une histoire personnelle étonnante de 6 cancers différents entre les âges de 39 et 70 ans (Figure 3). Et, malgré une histoire familiale de cancer sur trois générations, incluant des cancers du sein, de l'ovaire, du côlon et de la thyroïde, aucun syndrome de prédisposition au cancer n'a été identifié chez elle, en particulier les syndromes BRCA1/2, Li-Fraumeni, Cowden ou HNPCC.

Conformément à la loi française de bioéthique (2004-800 ; 8 juin 2004), nous avons informé toutes les patientes de l'utilisation à des fins de recherche d'une partie de leurs échantillons restants après l'établissement du diagnostic auquel elles ne s'étaient pas opposées. Elles nous ont également donné son consentement écrit pour réaliser des études génétiques identifiantes.

Un total de 20 prélèvements était disponible dans la tumorotheque de l'hôpital Saint-Louis dont 17 fixés au formol pour les 8 patientes et 3 congelés de tumeurs du sein de Madame S. L'ADN constitutionnel de Madame S a été également obtenu à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (Annexe 1).

Figure 3 : Arbre généalogique de la patiente Madame S qui a eu 6 cancers différents entre les âges de 39 et 70 ans sans aucun syndrome connu de prédisposition au cancer.



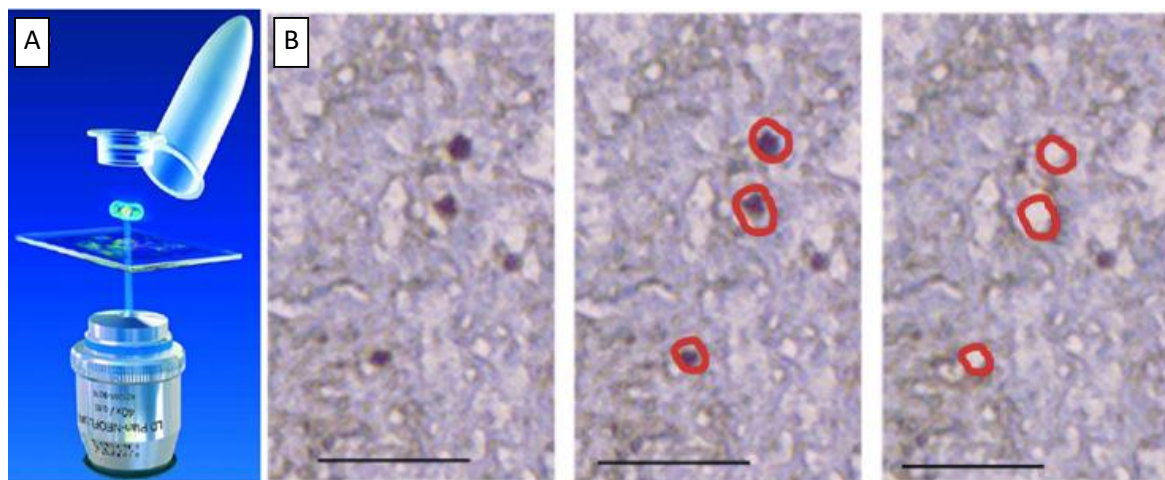
2. Microdissection laser et extraction d'ADN

Les 20 échantillons tumoraux ont fait l'objet d'une microdissection laser avant extraction d'ADN pour analyse pan-génomique. Le procédé permet l'enrichissement des échantillons en cellules tumorales. La sélection des cellules tumorales se fait sous contrôle microscopique [86]. Nous avons utilisé un système de type LMPC (Laser Microdissection

and Pressure Catapulting, Zeiss MicroImaging, Munich, Allemagne), qui est constitué d'un microscope inversé associé à l'utilisation d'un laser ultraviolet (UV-A pulsé, $\lambda=355$ nm).

Le principe technique est le suivant : après avoir réalisé des coupes de $10\mu\text{m}$ d'épaisseur et délimité les zones de cellules tumorales, nous utilisons des lames histologiques spéciales (Membrane Slides®), avec une membrane synthétique non adhérente à la lame, pour optimiser le recueil des zones tissulaires micro-disséquées. Un laser permet le découpage de la zone sélectionnée. En augmentant l'énergie et en dé-focalisant du plan d'action du faisceau laser, la zone découpée est catapultée vers le capuchon d'un micro-tube contenant $20\ \mu\text{L}$ de tampon ATL (tampon approprié pour l'extraction d'ADN) (Figure 4).

Figure 4 : Principe de la microdissection laser. A: le système LMPC. B: les cellules tumorales sélectionnées puis découpées avec précision (adapté de [87]).



L'ADN des cellules tumorales récupérées est extrait en utilisant le kit QIAGEN© QIAamp® DNA mini Kit (Qiagen, France). La première étape étant de détruire les membranes cellulaires et les protéines du milieu en utilisant un tampon ATL (dissipe les bicouches lipidiques des membranes cellulaires) associé à la protéinase K (digestion des protéines et en particulier celles qui sont associées à l'ADN dans la chromatine). Suite à

cette digestion enzymatique, le mélange est déposé sur une colonne de silice fournie avec le kit qui va fixer les acides nucléiques après centrifugation. Deux lavages suivis de centrifugations sont ensuite appliqués (AW1 et AW2) afin d'éliminer les protéines et les sels. Après une élution et centrifugation en utilisant l'eau sans nucléases, nous avons récupéré l'ADN. Puis nous qualifions et quantifions l'ADN extrait en mesurant l'absorbance à 230, 260 et 280 nm. La pureté de l'ADN obtenu est définie par l'analyse des rapports d'absorbances $260/280$ et $260/230$ selon les normes dans le tableau 5.

Tableau 5 : Pureté d'un échantillon d'ADN.

Ratio	Valeur	Indication de pureté
	1,8	ADN pur
260/280	< 1,8	Présence de protéines, phénol et autres contaminants
	> 1,8	Contamination ARN
260/230	1,8 – 2,2	ADN pur
	< 1,8	Contaminants co-purifiés (solvants, sel, contaminants organiques)

3. La technologie OncoScan™ (Affymetrix©)

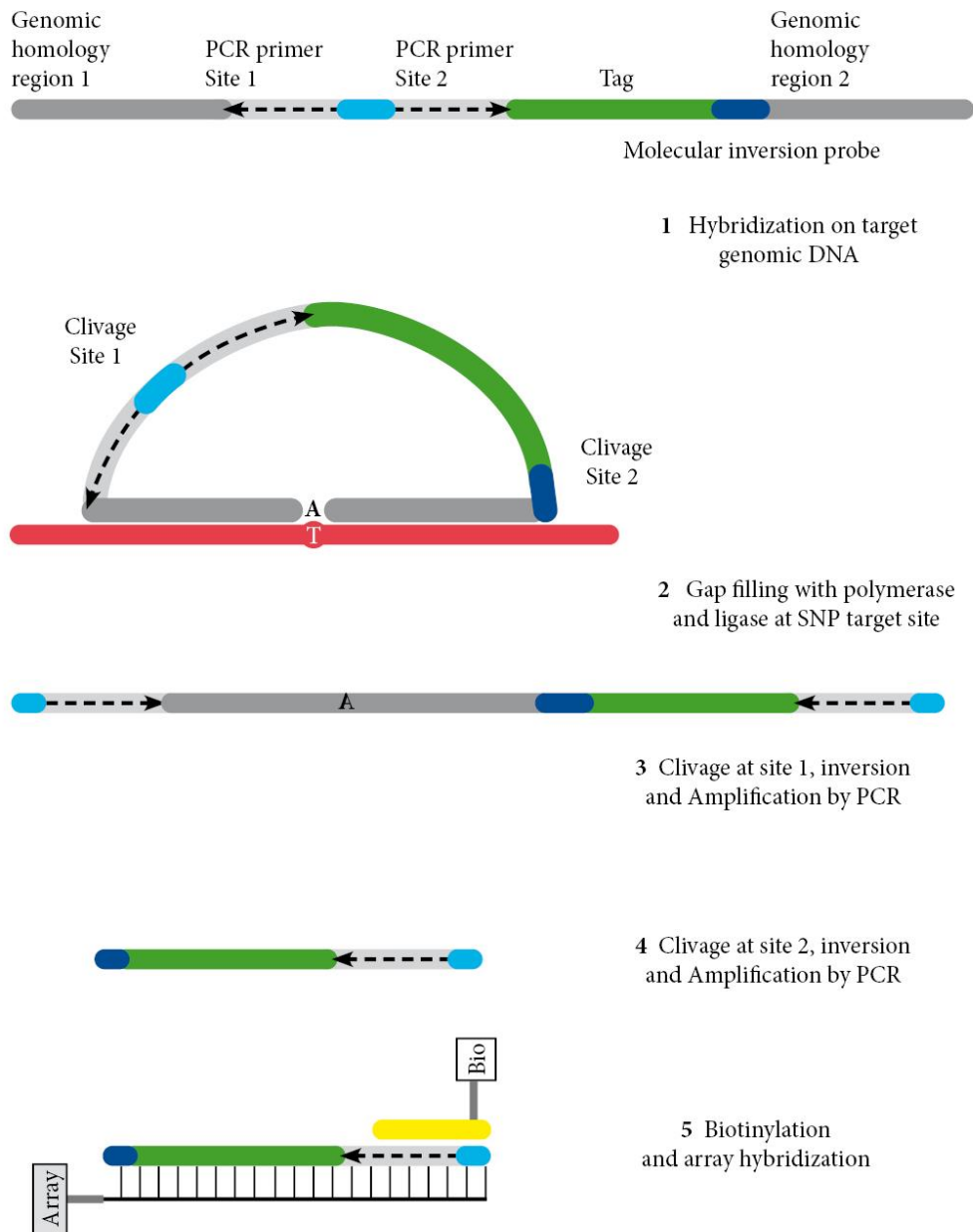
Dans la mesure où nous disposons pour l'essentiel d'échantillons de cancers fixés en formol et inclus en paraffine, notre choix de type d'analyse génomique à haut débit s'est porté sur la technologie OncoScan™ (OncoScan CNV Plus Assay, ThermoFisher Corp. Waltham, MA. USA) spécifiquement conçue pour les tissus fixés en formol.

En effet, la fragmentation de l'ADN extrait des échantillons fixés en formol et inclus en paraffine ne permet pas d'utiliser avec suffisamment de fiabilité certaines techniques d'analyses génomiques qui nécessitent des fragments d'ADN d'au moins 1000 paires de base [88, 89].

Le principe de la technologie OncoScan™ est le suivant (Figure 5). Elle utilise des sondes avec une région de 20 paires de bases de chaque côté complémentaire à l'ADN génomique

d'intérêt et une région centrale qui consiste en un marqueur unique à chaque sonde et 2 sites de primers universels dans toutes les sondes ainsi que 2 sites de coupure.

Figure 5 : Principe de la technologie d'OncoScan™ (adapté d'Affymetrix®).



La sonde est faite d'une manière à délimiter après hybridation à l'ADN un gap entre les 2 extrémités qui correspond à une mutation ponctuelle ou un SNP (Single Nucleotide

Polymorphism) d'intérêt. L'ADN polymérase comble le gap avec le nucléotide complémentaire puis une ligase lie les nucléotides pour circulariser la sonde qui devient résistante à l'exonucléase. L'exonucléase dégrade les sondes non circulaires et l'ADN génomique. Puis la sonde est coupée pour libérer les sites des primers universels et amplifier, avec une PCR, la région cible. Ensuite, le marqueur est libéré en coupant au site de coupure n° 2 puis il s'hybride avec des séquences complémentaires sur une puce et il est révélé grâce à la biotine couplée à un fluorophore.

Cette technique peut détecter 74 mutations "hot-spot" fréquentes localisées dans 9 gènes fréquemment impliqués dans les processus carcinogénétiques (*BRAF*, *KRAS*, *EGFR*, *IDH1*, *IDH2*, *PTEN*, *PIK3CA*, *NRAS* et *TP53*). Elle peut également analyser 200 000 SNP, des variations de nombre de copie des gènes ainsi qu'une LOH (Loss Of Heterozygoty) ou « perte d'hétérozygotie » dans tout le génome [90]. Nous avons précédemment montré la fiabilité de cette méthode pour identifier une altération génomique sur des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine [85, 91].

Nous avons donc analysé et comparé les données des 17 échantillons à la recherche d'une anomalie génétique commune aux cancers du sein et de la thyroïde et aux 8 patientes en utilisant le logiciel Nexus-7 (BioDiscovery Inc. El Segundo, CA. USA).

4. Recherche de microsatellites et séquençage Sanger

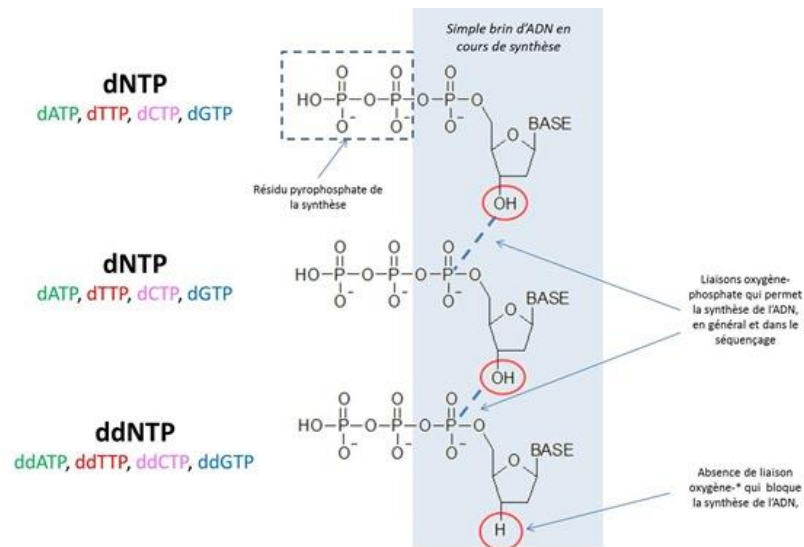
Pour confirmer les résultats obtenus avec la technique OncoScan™ nous avons choisi l'analyse des microsatellites et le séquençage des régions d'intérêt pour confirmer les résultats d'OncoScan™ et analyser les possibles variants génomiques. Les microsatellites sont des séquences non-codantes d'ADN de 1 à 6 nucléotides qui se répètent 10 à 60 fois. Leurs longueur est unique pour chaque personne et elles sont utilisées pour cartographier les gènes [92].

A l'aide de l'outil d'analyse du génome de l'université de Californie – Santa Cruz disponible en ligne, nous avons choisi les marqueurs microsatellites correspondants aux régions trouvés en OncoScan™.

Nous avons commencé par tester les microsatellites sur un ADN de contrôle de la lignée cellulaire BT474 de cancer du sein, puis sur l'ADN normal de lymphocytes périphériques de sujets sains. Puis, on a amplifié le fragment d'ADN en question par PCR puis vérifié les produits de PCR sur un gel d'électrophorèse. Nous avons réalisé une expérience de contrôle avec un microsatellite du gène VHL.

Pour le séquençage, nous avons choisi la méthode Sanger. Le séquençage Sanger reprend les mêmes principes que la PCR mentionnées ci-dessous avec une étape de purification du produit de PCR avec le réactif ExoSap® (ThermoFisher©) qui contient un exonucléase pour cliver les amorces non utilisées, et une phosphatase alcaline pour déphosphoryler les nucléotides non utilisés pendant la phase d'élongation de la PCR. Et il faut rajouter des didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) en plus au mix de la PCR contenant des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), des amorces spécifiques de notre gène d'intérêt et la polymérase thermostable Taq. Les ddNTP étant en moindre quantité que les dNTP, l'incorporation aléatoire des ddNTP dans la chaîne d'ADN naissante arrête son élongation car elles ne possèdent pas de groupement 3'OH dans leur sucre (Figure 6).

Nous obtenons des fragments d'ADN de tailles différents en fonction de nombre de dNTP incorporées avant la mise en place d'un ddNTP. Puis nous avons utilisé un séquenceur pour classer les fragments en fonction de leurs tailles. Chaque type de ddNTP (Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine) est marqué par un traceur fluorescent différent.

Figure 6 : Séquençage de type Sanger.

(<http://www.oezratty.net/wordpress/2012/technologies-sequencage-genome-humain-3/>)

L'analyse de la taille des fragments et la détection de ces traceurs permettent d'obtenir l'ordre des nucléotides dans notre fragment d'intérêt précédemment amplifié par la PCR de marquage et donc la séquence.

5. Analyse génomique par séquençage de nouvelle génération

Nous avons choisi de combiner la méthode d'hybridation génique OncoScanTM, dédiée aux échantillons fixés au formol et inclus dans la paraffine et capable d'identifier de grandes régions de perte d'hétérozygotie (LOH), avec le NGS adapté aux échantillons congelés mais limité dans la détection de grandes régions de perte de matériel. Nous avons analysé les 17 prélèvements.

Le séquençage de nouvelle génération NGS

Pour le NGS, la préparation des bibliothèques, la capture d'exomes, le séquençage et l'analyse des données ont été effectués par IntegraGen® (IntegraGen SA, Evry, France). L'ADN

génomique est capturé à l'aide du système d'enrichissement de l'exome Twist Human Core (Twist Bioscience, IntegraGen Custom) [93].

La capture, l'enrichissement et l'éluion des séquences sont réalisés conformément aux instructions et aux protocoles du fabricant (Twist Bioscience Co. San Francisco, CA, USA) sans modification, à l'exception de la préparation de la librairie réalisée avec le kit NEBNext® Ultra II (New England Biolabs® Inc. Ipswich, MA. USA). Pour la préparation de la librairie, 150 ng d'ADN génomique sont fragmentés par sonication et purifiés pour produire des fragments de 150-200 pair de base. Des oligonucléotides adaptateurs « paired-end » du kit NEB sont ligaturés sur les fragments réparés à queue d'A, puis purifiés et enrichis par 7 cycles de PCR. Cinq cents nano-grammes de ces librairies purifiées sont ensuite hybridées à la librairie de capture d'oligo-sondes Twist (Twist oligo probe capture library) pendant 16 heures dans une réaction en singleplex. Après l'hybridation, le lavage et l'éluion, la fraction éluee est amplifiée par 8 cycles de PCR, purifiée et quantifiée par qPCR afin d'obtenir suffisamment de fragments d'ADN pour les utilisations ultérieures. Chaque échantillon d'ADN enrichi et élué est ensuite séquencé sur un Illumina NovaSeq® en tant que « Paired End » 100 reads. L'analyse d'images et l'appel de bases sont effectués à l'aide d'Illumina Real Time Analysis® avec les paramètres par défaut.

Analyse bioinformatique

L'appel de base est effectué en utilisant le pipeline de séquence du logiciel Real-Time Analysis (2.7.7) avec les paramètres par défaut. Les « reads » de séquence sont alignés en utilisant le génome humain (hg38/GRCh38) à l'aide de l'outil Burrows-Wheeler Aligner (BWA).

Les « reads » en double (par exemple, les « reads » « paired-end » dans lesquelles l'ADN inséré a un début et une fin identiques dans le génome humain) sont supprimées (outils sambamba).

Pour identifier les altérations génétiques, les variations mononucléotidiques (Single Nucleotide Variation, SNV) et les petites insertions/délétions (jusqu'à 20 pb), l'appel de variants est effectué via les outils du « Broad Institute » : GATK Haplotype Caller GVCF (3.7) pour l'ADN constitutionnel, et MuTect (2.0, --max_alt_alleles_in_normal_count=2 ; -max_alt_allele_in_normal_fraction=0.04) pour l'ADN somatique.

Un post-traitement propre à IntegraGen® est appliqué pour identifier les mutations somatiques qui correspondent davantage à des artefacts, et les mutations constitutionnelles. Seules les mutations somatiques considérées comme PASS ou t_lod_fstar avec un score somatique d'au moins 1 sont retenues. Le score somatique est calculé pour chaque mutation, allant de 1 à 30, un score de 30 indique l'indice de confiance le plus élevé. Ce score prend en compte le nombre et la fréquence des allèles mutés dans les différents échantillons afin d'affiner l'identification des variations. Enfin, les mutations ayant un score QSS inférieur à 20 et une fréquence de variant allélique (VAF) dans la tumeur moins de 0,02 sont éliminées.

Le logiciel d'Ensembl VEP (Variant Effect Predictor, version 87) est utilisé pour affiner également l'annotation des variants, déterminer leur effet sur les transcrits et les protéines correspondants, et prédire leurs conséquences fonctionnelles. Il utilise les bases de données suivantes : NCBI-dbSNP (dbSNP147), 1000 Genomes Project (1000G_phase3), Exome Variant Server (ESP6500SI-V2-SSA137), Exome Aggregation Consortium (ExAC r3.0) et la base de données propre à IntegraGen®.

En ce qui concerne les variants missens, deux outils de prédiction bio-informatique de pathogénicité sont utilisés : SIFT (SIFT.2.2) et PolyPhen (2.2.2). Ces 2 outils aident à

déterminer le score de qualité de chaque variant, son statut homozygote/hétérozygote, le nombre de « read » de l'allèle variant et la présence du variant dans la base de données COSMIC (version79).

Pour étudier les aberrations du nombre de copies génomiques (Copy number aberrations, CNA), le logiciel de Bioconductor DNA Copy (DNA copy 1.32.0) est utilisé pour comparer les données d'exome d'un ADN normal à un pool d'échantillons de référence. L'algorithme de segmentation binaire circulaire (circular binary segmetation, CBS) pour segmenter les données de nombre de copies d'ADN est utilisé. Toutes les modifications sont annotées avec le catalogue de la base de données des variants génomiques (database of genomic variants, DGV) afin de fournir un résumé complet de la variation structurelle du génome humain.

Pour étudier la fréquence de l'allèle B (B-allele frequency, BAF), le logiciel de Bioconductor DNA Copy (DNACopy 1.32.0) a été utilisé avec les fréquences des allèles mutés des SNV connus dans le 1000 Genomes Project. L'algorithme de CBS a été mis en œuvre pour segmenter les données BAF.

6. Immunohistochimie de la protéine PRAME

Une méthode automatisée d'immunoperoxydase (Discovery/Roche/Basel/Suisse) utilisant un anticorps humain monoclonal anti-PRAME de lapin (clone QR005, Quartett, Berlin, Allemagne) (C-P003-05) [94-96], et un anticorps anti-PS100 (GA504, agilent, Santa clara, USA) a été réalisée sur des coupes de tissus de 5 µm d'épaisseur des 3 échantillons de cancers du sein de Madame S. L'anticorps anti-PRAME est dirigé contre l' « epitope signature tag ».

Le contrôle négatif était l'absence de marquage par l'anticorps des cellules normales, et le contrôle positif était un échantillon de mélanome positif pour PS100 et PRAME.

Pour toutes les coupes, les cellules exprimant PRAME ont été comptées sur cinq champs différents avec un grossissement de x400. Un microscope ProvisAX70 (Olympus, Tokyo) avec un oculaire à grand champ numéro 26,5 a été utilisé, fournissant une taille de champ de 0,344 mm² au grossissement x400. Seules les cellules tumorales avec un cytoplasme coloré ont été considérées comme positives. Pour chaque champ, 100 cellules tumorales ont été analysées. Le pourcentage de cellules exprimant PRAME correspondait au nombre de cellules positives parmi ces 100 cellules tumorales. Les résultats ont été exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard de la moyenne (standard error of the mean, SEM). Un minimum de 5 blocs de chacun des cancers du sein et de la thyroïde de Madame S ont été testés.

7. Quantification de l'expression de PRAME par RT-ddPCR

Après une microdissection laser à l'aide du kit RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, France) des cellules tumorales des cancers du sein de Madame S et des cellules de mélanome de contrôle, l'ARN total a été extrait de ces cellules. Ensuite, il a été quantifié en utilisant RT-ddPCR (reverse transcription digital droplet polymerase chain reaction) et qualifié sur l'automate d'électrophorèse Bio-RadExperionTM (BioRad, France).

La transcription inverse et l'amplification ont été faites à l'aide du kit One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (BioRad, France). Les réactions RT-ddPCR ont été réalisées à l'aide du système de flux de travail QX100 Droplet Digital PCR (BioRad, France). Un échantillon vierge sans ARN a été inclus, et les expériences ont été réalisées en triplicate pour le gène *PRAME* et les 2 gènes de ménage *TBP* et *GAPDH*.

Le mix contenait 20 ng d'ARN provenant de cellules microdisséquées, 10 μ L de super mix RT-ddPCR 2xOne-Step (Bio Rad), 1 μ L de sondes PRAM1 [Hs00738098_m1 FAM] (Life Technologies, Foster City, États-Unis) et 1 μ L des gènes de référence TBP et GAPDH [Hs99999910_m1 Hex] (Life Technologies, Foster City, États-Unis) en multiplex dans

chaque puits. Le volume final de la réaction était de 20 μL . Les gouttelettes ont été générées par un générateur de gouttelettes QX200, et les données ont été collectées par le lecteur de gouttelettes QX 100 (BioRad, France).

III. RESULTATS

Un prélèvement fixé en formol des cancers du sein et de la thyroïde pour chacune des 8 patientes a été obtenu. Pour la patiente Madame S, un prélèvement fixé en formol de la tumeur du rein, 3 prélèvements congelés des différents cancers du sein ainsi que de l'ADN constitutionnel des cellules mononuclés du sang ont été ajoutés pour analyse.

1. Données d'OncoScan™ et identification d'événements génétiques

La technique d'OncoScan™ donne un score de probabilité pour chacune des mutations testées. Selon les recommandations, la probabilité d'une mutation est élevée lorsque le score est >9. Nous avons donc retenu les scores répondant à ce critère.

Dans un premier temps, chez nos 8 patientes, je n'ai retrouvé aucune mutation commune à l'ensemble des 17 échantillons fixés en formol. En particulier, aucune mutation du gène *PTEN* n'a été retrouvée dans aucun des échantillons, confirmant l'absence de syndrome de Cowden pour nos patientes.

Dans un second temps, plusieurs mutations "hot-spot" ont été identifiées :

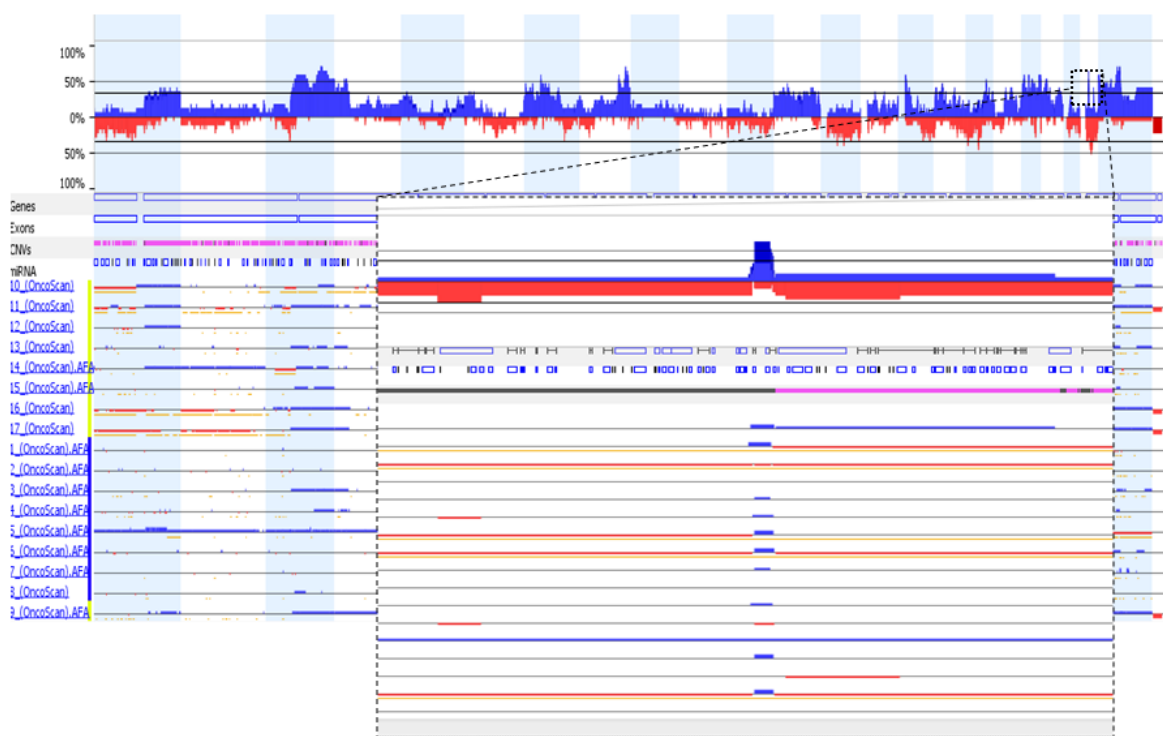
- p.V600E c.1799T>A du gène *BRAF* dans 2 échantillons de cancer de la thyroïde (soit 20% des échantillons ce qui correspond à la fréquence à laquelle cette mutation est retrouvée dans les cancers de la thyroïde)
- p.H179R c.536A>G du gène *TP53* dans un échantillon de cancer de la thyroïde
- p.H1047R c.3140A>G du gène *PIK3CA* dans un échantillon de cancer du sein

Ces mutations ont été déjà décrites dans les cancers de la thyroïde et du sein [97, 98]. Ainsi, la présence de ces mutations pourrait être considérée comme un contrôle interne de la technique OncoScan™.

Concernant les variations de nombre de copies, et en analysant toujours les données des 17 échantillons des 8 patientes, j'ai retrouvé 2 régions communes à plusieurs échantillons et sièges d'une anomalie du nombre de copies. La première correspond à un gain du nombre

de copies du gène *GSTT1* (glutathion S-transférase thêta 1) sur le chromosome 22 dans 10 des 17 prélèvements (Figure 7). Le gène *GSTT1* code pour une enzyme de détoxification qui protège contre le dommage oxydatif. Sa délétion augmente la probabilité de survenue de cancers, lui conférant un rôle du gène suppresseur de tumeur [99-103].

Figure 7 : Gain de nombre de copie du gène *GSTT1* avec la technologie OncoScan™ dans 10 prélèvements sur 17 des cancers du sein et de la thyroïde.



La deuxième correspond à un gain du nombre de copie du gène *CSMD3* (CUB and Sushi Multiple Domaine 3) sur le chromosome 8 dans 6 couples de cancers sein-thyroïde (Figure 8). Le gène *CSMD3* aurait également une fonction de suppresseur de tumeur après analyse de la littérature [104-106].

Ainsi, le gain de matériel génétique de ces deux gènes n'expliquant pas la carcinogénèse de nos cancers du sein et de la thyroïde, nous avons préféré ne pas continuer dans ces voies.

De plus, j'ai identifié que 2 différents régions du chromosome X quasiment identiques chez 5 patientes parmi les 8, ont subi essentiellement des pertes de matériel (Tableau 6).

Figure 8 : Gain de nombre de copie du gène *CSMD3* avec la technologie OncoScan™ dans 10 prélèvements dans 6 couples de 8 des cancers du sein et de la thyroïde.

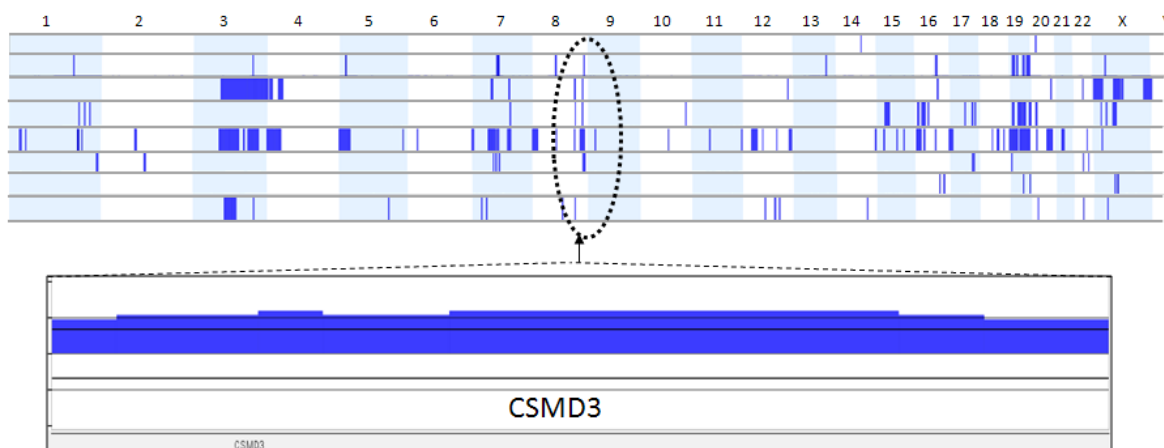


Tableau 6 : Les 2 régions du chromosome X affectées par une perte ou un gain du matérielles chez 5 des 8 patientes.

Chromosome	Région	Cytobande	Gènes	Cancer de la thyroïde	Cancer du Sein
X (5 Pts/8)	177 942 – xxx	p22.33	16	3 LOH - 1 perte NC 3 gains NC	3 LOH 3 gains NC
X (5 Pts/8)	61 732 394 – xxx	q11.1	11	5 LOH 1 gain NC	5 LOH

Pts: patientes, LOH: loss of heterozygosity, NC: nombre de copie

Dans un troisième temps, nous avons analysé les tissus de la patiente Madame S, qui a eu de multiples cancers sur une période de 30 ans sans syndrome connu de prédisposition aux cancers ; nous avons analysé avec OncoScan™ ses trois échantillons fixés au formol (un cancer du sein, de la thyroïde et l'oncocytome du rein). En utilisant un seuil de 9 pour le score de probabilité de mutation, je n'ai pas trouvé de mutation hotspot dans le panel de gènes testés. Des altérations du nombre de copies ont été retrouvées et sont dans l'annexe 2. Parmi ses altérations, j'ai identifié deux régions de perte d'hétérozygotie (LOH) communes aux trois échantillons de tumeurs et peuvent donc être considérées comme des anomalies constitutionnelles : 4p21.3 - q22.1, et 22q11.1 - q11.23 (Figure 9 et Tableau 7).

Figure 9 : Les deux régions de LOH des chromosomes 4 et 22 dans les échantillons de tumeurs du sein, de la thyroïde et de l'oncocytome de Madame S en utilisant OncoScan™, avec les gènes correspondants et leur classification fonctionnelle (Représentation selon [107]).

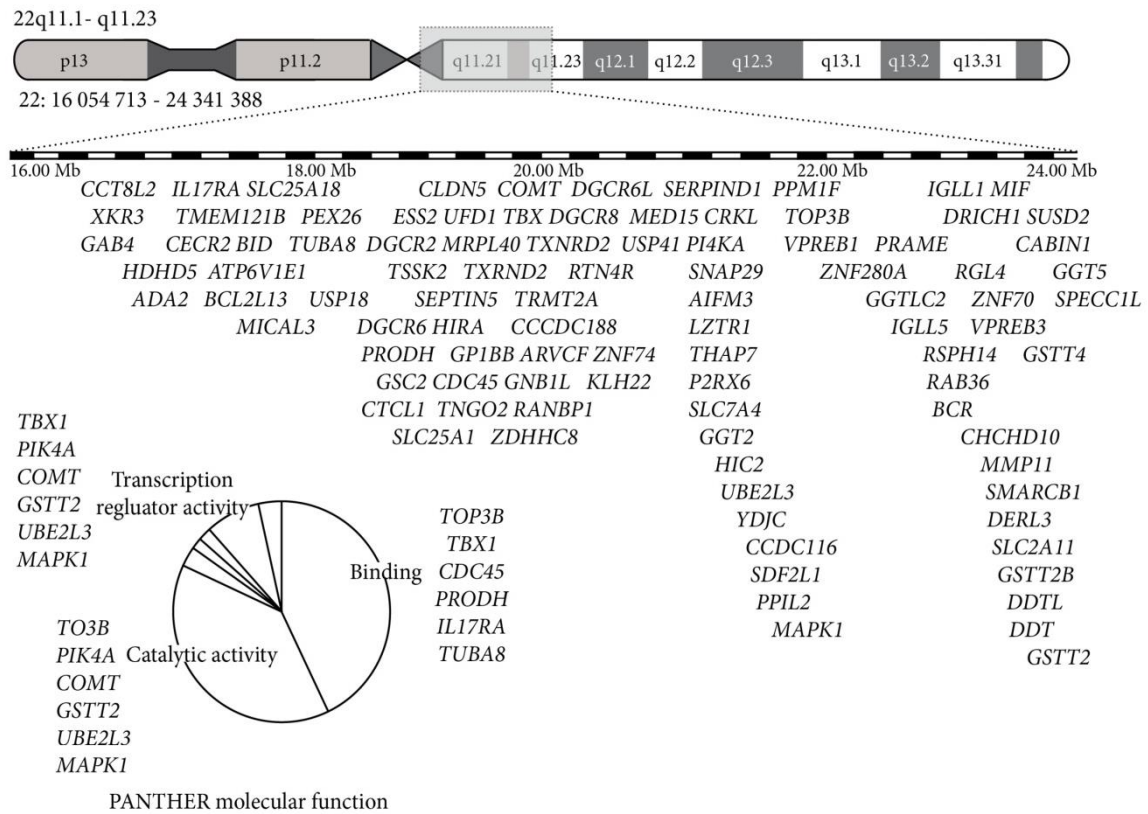
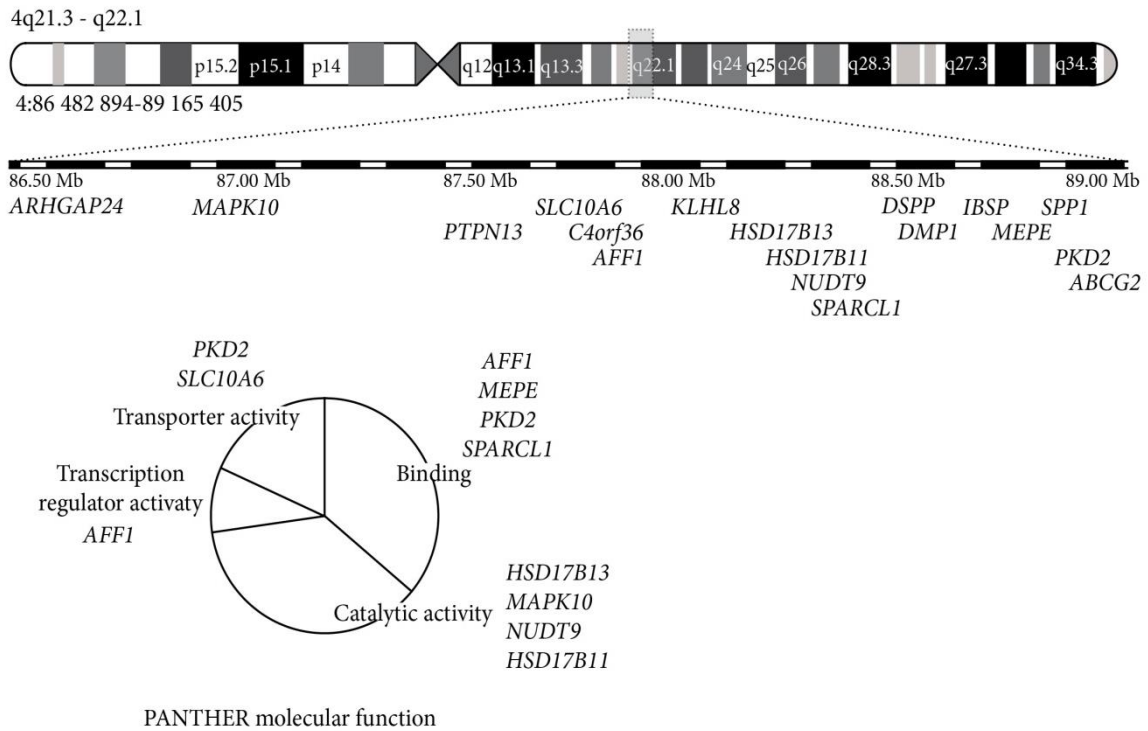


Tableau 7 : Régions de LOH trouvées dans 3 échantillons fixés au formol de tumeurs du sein, de la thyroïde et du rein de la patiente à multiple antécédents de cancers (Madame S) analysés par OncoScan™.

Chromosome	Région	Gènes	Cytobands
4	86 482 894- 89 165 405	60	4p21.3 – q22.1
22	16 054 713 - 24 341 388	416	22q11.1 – q11.23

La LOH du chromosome 22 correspond à la région impliquée dans le syndrome de délétion 22q11.2, qui comprend 416 gènes dont plusieurs gènes à potentiel cancérigène :

BID, PRAME, CRKL, P2RXL1, MAPK1, BCR, RGL4, SMARCB1, HIRA, CDC45L, SEPT5, RANBP1, CRKL et *AIFM3*.

Bien que notre patiente ait une LOH importante de 8,3 Mb comprenant la délétion typique de 22q11.2, elle ne présentait aucun symptôme clinique typique de la délétion 22q11.2/syndrome de Di-Georges.

2. Les microsatellites et le séquençage Sanger

Ensuite, j'ai voulu confirmer la LOH du chromosome X trouvé avec d'OncoScan™ en utilisant les marqueurs microsatellites, mais je n'ai pas eu le signal attendu. Le séquençage Sanger s'est avéré aussi difficile à réaliser à cause de la position pseudo-autosomale de cette LOH, région qui subit une forte recombinaison [108, 109].

Malgré ces premières difficultés, les résultats de cette partie du travail semblent montrer que la faible probabilité d'avoir une région génomique instable commune aux différentes patientes sans syndrome connu de prédisposition au cancer permet de mettre l'hypothèse qu'il s'agirait plutôt d'une anomalie constitutionnelle impliquée dans la carcinogénèse commune des cancers du sein et de la thyroïde de nos patientes.

Je compte continuer de travailler sur cette région, et contourner les difficultés liées à son analyse génétique.

3. Le séquençage de nouvelle génération

A ce stade, j'ai néanmoins décidé de me concentrer sur l'analyse des 3 échantillons des différents cancers du sein et de l'ADN constitutionnel de Madame S qui a une histoire personnelle de multiples cancers sans syndrome connu de prédisposition aux cancers.

Les données de séquençage de nouvelle génération ont été analysées à l'aide des outils en ligne SiriusTM et MercuryTM d'IntegraGen®.

Nous avons d'abord analysé l'ADN constitutionnel et trouvé cinq régions de pertes de nombre de copies (nombre de copies calculé < 2) sur le chromosome 22 dont la longueur additive de plus de 8 Mb (15 528 649 - 21 213 133) correspondait plus ou moins à la LOH (16 054 713 - 24 341 388) identifiée à l'aide d'OncoScanTM (Figure 10 et Tableau 8).

Il y a plus que 400 gènes dans cette région de 8Mb, certain sont très impliqués dans la carcinogénèse comme *MAPK1*, *BID*, *BCR*.

Figure 10 : Régions de pertes du nombre de copies sur le chromosome 22 de l'ADN constitutionnel (15 528 649 - 21 213 133) identifiées à l'aide du NGS qui correspondent plus ou moins au LOH (16 054 713 - 24 341 388) identifié à l'aide d'OncoScanTM (Représentation selon [107]).

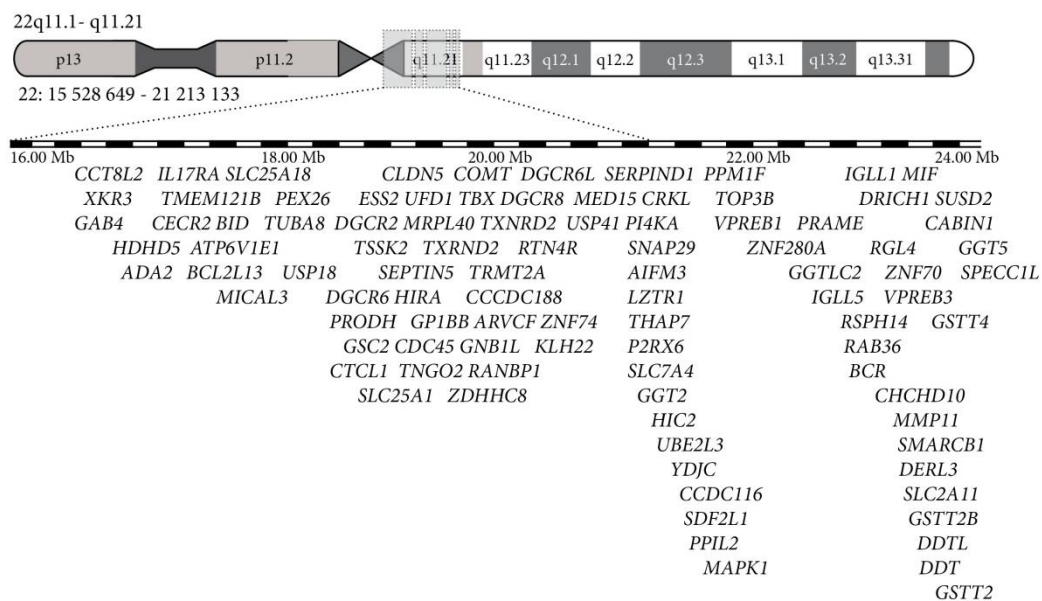


Tableau 8 : Régions de perte de nombre de copie sur le chromosome 22 de l'ADN constitutionnel dans les échantillons de tissus congelés analysés par NGS.













Début	fin	Cytobande	Nombre de copies
15528649	18176794		1.92
18528128	18530357		1.06
18608974	21208211	q11.1 – q11.21	1.98
21208646	21208840		0.73
21209062	21213133		1.8

L'analyse de cette région n'a pas montré de mutation dans les gènes impliqués dans les syndromes connus de prédisposition au cancer.

Ensuite, j'ai analysé les profils des variants constitutionnels et somatiques (Tableaux 9, 10, 11 et 12, et Figure 11) en utilisant trois bases de données (1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar) avec un seuil de fréquence inférieur ou égal à 0,1 % pour éliminer les polymorphismes.

J'ai ensuite identifié deux mutations génétiques constitutionnelles potentielles avec une fréquence $\leq 0,5\%$ dans la population : c.1450-22T>G de MICAL3 (Microtubule Associated Monooxygenase, Calponin And LIM domain Containing 3) et c.70C>G de PRAME (PReferentially expressed Antigen in MELanoma) (Tableau 13). Comme le variant de MICAL3 était intronique, nous avons choisi de nous concentrer sur PRAME.

Tableau 9 : Les variants constitutionnels à fort impact et une fréquence $\leq 0,1$ % chez la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Gènes	Chr	Type de variant	Variant	Génotype	Mutation Tester
<i>SULT6B1</i>	2		NM_001032377.1:c.288+1del -	AC/A	
<i>TTN</i>	2		NM_001267550.2:c.15346C>T p.Arg5116Ter	G/A	*
<i>ALDH1L1</i>	3		NM_012190.3:c.2082+1G>T -	C/A	
<i>GYG1</i>	3		NM_001184720.1:c.487del p.Asp163ThrfsTer5	TG/T	
<i>WDR41</i>	5		NM_018268.3:c.219_220del p.Glu75LysfsTer25	CCT/C	
<i>DNAH8</i>	6		NM_001206927.1:c.1336G>T p.Glu446Ter	G/T	*
<i>RPS6KB2</i>	11		NM_003952.2:c.240+1G>C -	G/C	
<i>FAM71C</i>	12		NM_153364.3:c.342_343del p.Leu115ArgfsTer45	ATC/A	
<i>CCDC168</i>	13		NM_001146197.2:c.16123dup p.Ile5375AsnfsTer40	A/AT	
<i>PARP4</i>	13		NM_006437.3:c.3388C>T p.Arg1130Ter	G/A	*
<i>AOC2</i>	17		NM_001158.4:c.1884del p.Phe629LeufsTer11 NM_009590.3:c.1965del p.Phe656LeufsTer11	AC/A	
<i>ZNF761</i>	19		NM_001008401.3:c.1308del p.Asn436LysfsTer128	AT/A	














 Frameshift,  Région d'épissage (accepteur et donneur),  Gain de stop. Mutation Tester: * Disease causing automatic.

Tableau 10 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans le cancer du sein gauche de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Gène	Chr	Type de variant	Variant de protéine	Génotype	VAF	BAF	Mutation Tester
<i>KIAA1614</i>	1	■	NM_020950.1:c.2957C>A p.Ser986Ter	C/A	35.48	40.53	§
<i>YTHDF2</i>	1	■	NM_001172828.1:c.1567del -	AG/A	40.63	40.53	
<i>RETSAT</i>	2	■	NM_017750.3:c.1685_1688del p.Tyr562Ter	CAGAT/C	2.48	40.71	
<i>ABHD10</i>	3	■	NM_001272069.1:c.118C>T p.Gln40Ter	C/T	43.94	42.43	*
<i>ITPR1</i>	3	■	NM_001099952.2:c.6985_6988de p.Leu2329Ter	TCTAA/T	20.37	45.11	
<i>HELQ</i>	4	■	NM_133636.3:c.1315G>T p.Glu439Ter	C/A	18.25	40.57	*
<i>ZNF518B</i>	4	■	NM_053042.2:c.2188del p.Asp730MetfsTer42	TC/T	23.08	40.57	
<i>ADGRV1</i>	5	■	NM_032119.3:c.7669C>T p.Gln2557Ter	C/T	15.98	40	*
<i>FAM174A</i>	5	■	NM_198507.2:c.3G>A p.Met1?	G/A	17.59	40	§
<i>CRYBG1</i>	6	■	NM_001624.3:c.4915-1G>A -	G/A	17.98	41.19	
<i>NKAPL</i>	6	■	NM_001007531.2:c.58C>T p.Arg20Ter	C/T	28.24	46.35	§
<i>PKHD1</i>	6	■	NM_138694.3:c.11074C>T p.Arg3692Ter	G/A	31.05	41.19	*
<i>LAMB4</i>	7	■	NM_001318047.1:c.58C>T p.Gln20Ter	G/A	18.85	40.36	§
<i>RNF170</i>	8	■	NM_001160223.1:c.124T>G p.Tyr42Asp	A/C	5.79	-	*
<i>MRC1</i>	10	■	NM_002438.3:c.61+1G>A -	G/A	19.23	40.2	
<i>WAC</i>	10	■	NM_016628.4:c.1903G>T p.Glu635Ter	G/T	15.07	40.2	§
<i>RIN1</i>	11	■	NM_004292.2:c.1150C>T p.Gln384Ter	G/A	39.41	40.69	*
<i>MMP17</i>	12	■	NM_016155.6:c.706+1G>A -	G/A	9.86	45.47	
<i>TMCC3</i>	12	■	NM_001301036.1:c.1009C>T p.Gln337Ter	G/A	34.12	44.36	§
<i>DYNC1H1</i>	14	■	NM_001376.4:c.9693_9694ins p.Lys3232AspfsTer16	G/G..27b..A	6.93	46.48	
<i>IL25</i>	14	■	NM_022789.3:c.15dup p.Arg6GlnfsTer4	A/AC	51.82	26.33	
<i>TJP1</i>	15	■	NM_001301025.2:c.2308C>T p.Arg770Ter	G/A	33.08	40.95	*
<i>CDH1</i>	16	■	NM_001317186.1:c.-500+1G>T -	G/T	49.12	27.52	

<i>MFSD12</i>	19		NM_001287529.1:c.811-7_811del ?-271,	ACCTGTGGG/A	17.71	40.15	
			NM_174983.4:c.838-7_838del ?-280				
<i>ZNF121</i>	19		NM_001008727.3:c.913del p.Ile305SerfsTer27	AT/A	16.58	40.15	
<i>MACROD2</i>	20		NM_001351661.1:c.47-1G>A -	G/A	40.43	45.86	
<i>PHACTR3</i>	20		NM_001199505.1:c.1376-1G>A -	G/A	25	45.86	
<i>RFPL2</i>	22		NM_001098527.2:c.228G>A p.Trp76Ter	C/T	18.06	40.82	*
<i>ARMCX3</i>	X		NM_177948.2:c.712C>T p.Gln238Ter	C/T	19.42	-	§
<i>BRWD3</i>	X		NM_153252.4:c.275del p.Pro92LeufsTer7	AG/A	38.01	-	
<i>FAM47A</i>	X		NM_203408.3:c.784C>T p.Arg262Ter	G/A	1.87	-	§
<i>ZNF75D</i>	X		NM_001185063.2:c.94C>T p.Gln32Ter	G/A	42.29	-	*






 Gain de stop,  Frameshift,  Région d'épissage (accepteur et donneur),  Perte de start,  Variant intronique. MutationTester: * Disease causing automatic, § Disease causing.





















Tableau 11 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans le cancer du sein droit de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Gène	Chr	Type de variant	Variant de protéine	Génotype	VAF	BAF	Mutation Tester
<i>ARID1A</i>	1	■	NM_006015.5:c.2404C>T p.Gln802Ter	C/T	6.12	29.23	*
<i>FAP</i>	2	■	NM_004460.4:c.1451-1G>A	C/T	18.1	40.84	
<i>NIT2</i>	3	■	NM_020202.4:c.7+2dup	G/GT	4.31	45.59	
<i>PDHB</i>	3	■ ■	NM_000925.3:c.377C>G p.Ser126Ter, NM_001315536.1:c.323C>G p.Ser108Ter	G/C	8.2	33.32	*
<i>PLXND1</i>	3	■	NM_015103.2:c.3117_3118dup p.Ala1040GlyfsTer92	G/GCC	5.84	45.59	
<i>SORBS2</i>	4	■ ■	NM_001145674.1:c.2140del p.Arg714AlafsTer37, NM_001270771.1:c.2728del p.Arg910AlafsTer37, NM_021069.4:c.2428del p.Arg810AlafsTer37	CG/C	37.1	45.67	
<i>COPG2</i>	7	■	NM_001290033.1:c.568_569dup p.Met191LeufsTer26	A/AAT	6.25	40.09	
<i>RNF170</i>	8	■	NM_001160224.1:c.126T>G p.Tyr42Ter	A/C	2.26	45.33	*
<i>DCAF12</i>	9	■	NM_015397.3:c.1325C>A p.Ser442Ter	G/T	9.16	45.93	§
<i>CUBN</i>	10	■	NM_001081.3:c.9335del p.Phe3112SerfsTer10	GA/G	16.44	42.66	
<i>C2CD3</i>	11	■	NM_001286577.1:c.6142C>T p.Gln2048Ter	G/A	2.55	32.43	*
<i>SLC6A15</i>	12	■ ■	NM_001146335.2:c.935del p.Pro312LeufsTer14, NM_182767.5:c.1256del p.Pro419LeufsTer14	AG/A	22.38	45.62	
<i>SERPINA10</i>	14	■	NM_001100607.2:c.1123A>T p.Arg375Ter	T/A	5.23	41.68	§
<i>AKAP13</i>	15	■	NM_006738.5:c.3181C>T p.Gln1061Ter	C/T	34.06	32.03	*
<i>ZNF416</i>	19	■	NM_017879.2:c.186_199del p.Leu63GlyfsTer9	A..13b..T/A	26.38	45.6	
<i>SYCP2</i>	20	■	NM_014258.3:c.1405-1G>A	C/T	9.09	42.39	
<i>PISD</i>	22	□ □	NM_001326420.1:c.665-9_700del ?-234, NM_001326419.1:c.743-9_778del ?-260	T..44b..G/T	4.97	42.24	

■ Gain de stop, ■ Frameshift, ■ Région d'épissage (accepteur et donneur), □ Variant intronique.

MutationTester: * Disease causing automatic, § Disease causing.

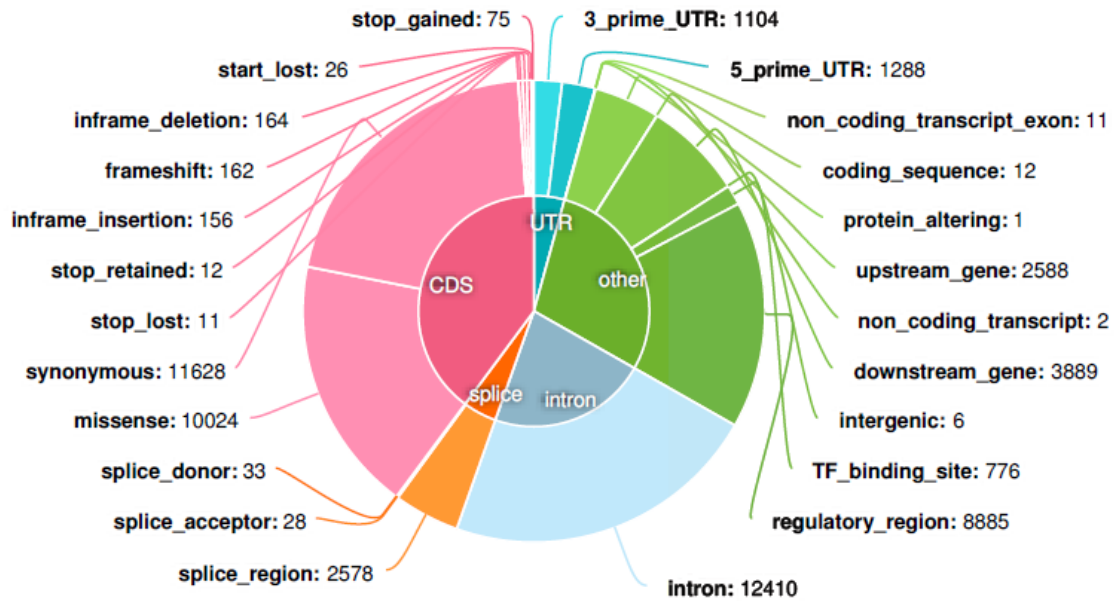
Tableau 12 : Les variants somatiques à fort impact identifiés dans la rechute du cancer du sein gauche de la patiente Madame S en utilisant les bases de données 1000 Genomes, GenomeAD et Kaviar.

Gène	Chr	Type de variant	Variant de protéine	Génotype	VAF	BAF	Mutation Tester
<i>ARHGEF10L</i>	1		NM_001319837.1:c.1982_1983ins p.Glu661AspfsTer38,	G/GAT	69.33	14.86	
			NM_001319838.1:c.1223_1224ins p.Glu408AspfsTer38,				
			NM_001328124.1:c.1448_1449ins p.Glu483AspfsTer38,				
			NM_001011722.2:c.1997_1998ins p.Glu666AspfsTer38,				
			NM_018125.3:c.2114_2115ins p.Glu705AspfsTer38				
<i>TARS</i>	5		NM_001258437.1:c.1326_1335del p.Arg442SerfsTer32,	AGGAACG AGCT/A	26.95	44.57	
			NM_001258438.1:c.1425_1434del p.Arg475SerfsTer32				
<i>FOXP4</i>	6		NM_138457.2:c.1457_1461dup p.Phe488GlyfsTer53,	A/AGGATG	28.05	45.63	
			NM_001012426.1:c.1496_1500dup p.Phe501GlyfsTer53,				
			NM_001012427.1:c.1490_1494dup p.Phe499GlyfsTer53				
<i>CWF19L1</i>	10		NM_018294.5:c.244C>T p.Gln82Ter	G/A	5.19	45.75	*
<i>ADCY4</i>	14		NM_001198592.1:c.2633C>G p.Ser878Ter	G/C	10.75	13.82	*
<i>ATG14</i>	14		NM_014924.4:c.583C>T p.Arg195Ter	G/A	39.88	46.02	*
<i>HHIPL1</i>	14		NM_001329411.1:c.1603C>T p.Gln535Ter,	C/T	43.82	46.02	‡
			NM_032425.5:c.1798C>T p.Gln600Ter				
<i>HEXA</i>	15		NM_000520.5:c.887del p.Asn296IlefsTer6,	AT/A	42.86	46.16	
			NM_001318825.1:c.920del p.Asn307IlefsTer6				
<i>UNC13C</i>	15		NM_001080534.2:c.59del p.Gly20GluufsTer44	AG/A	41.32	45.68	
<i>ELMO3</i>	16		NM_024712.3:c.313C>T p.Gln105Ter	C/T	26.18	42.54	*
<i>NPIP11</i>	16		NM_001310137.1:c.1655C>A p.Ser552Ter	G/T	38.19	42.54	§

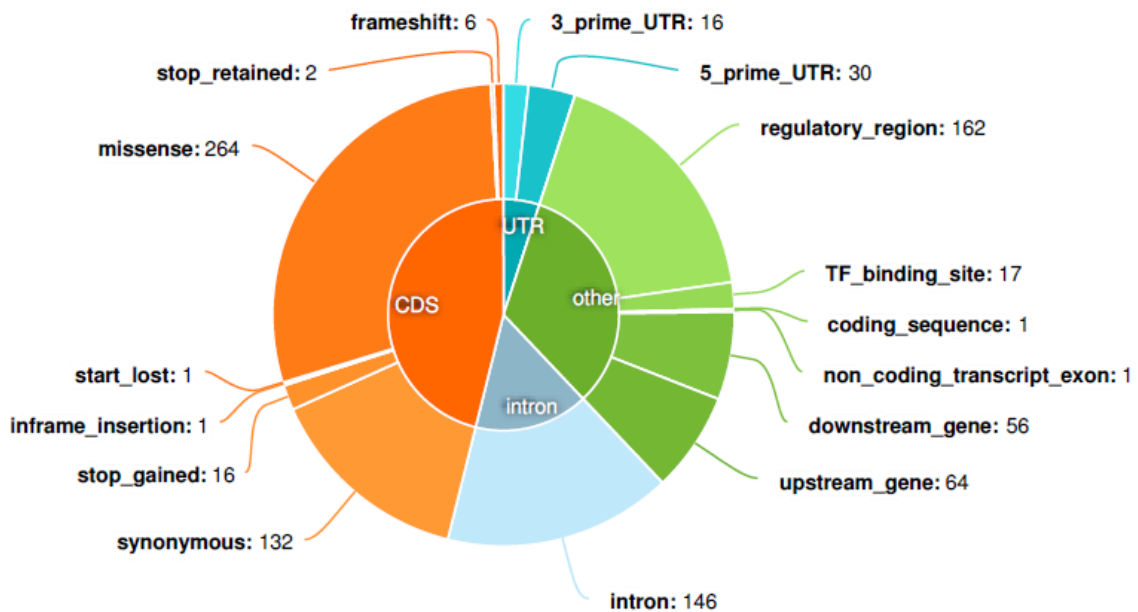
<i>CHEK2</i>	22	■	NM_001005735.1:c.28C>T p.Gln10Ter	G/A	55.74	12.69	*
<i>USP9X</i>	X	■	NM_001039590.2:c.4189G>T p.Glu1397Ter	G/T	33.7	-	*
		■	NM_001039590.2:c.5364dup p.Leu1789IlefsTer13	T/TA			

■ Gain de stop, ■ Frameshift. MutationTester: * Disease causing automatic, ‡ Polymorphism, § Disease causing.

Figure 11 : Analyse de variants constitutionnels et somatiques et les profils des différents échantillons de Madame S.

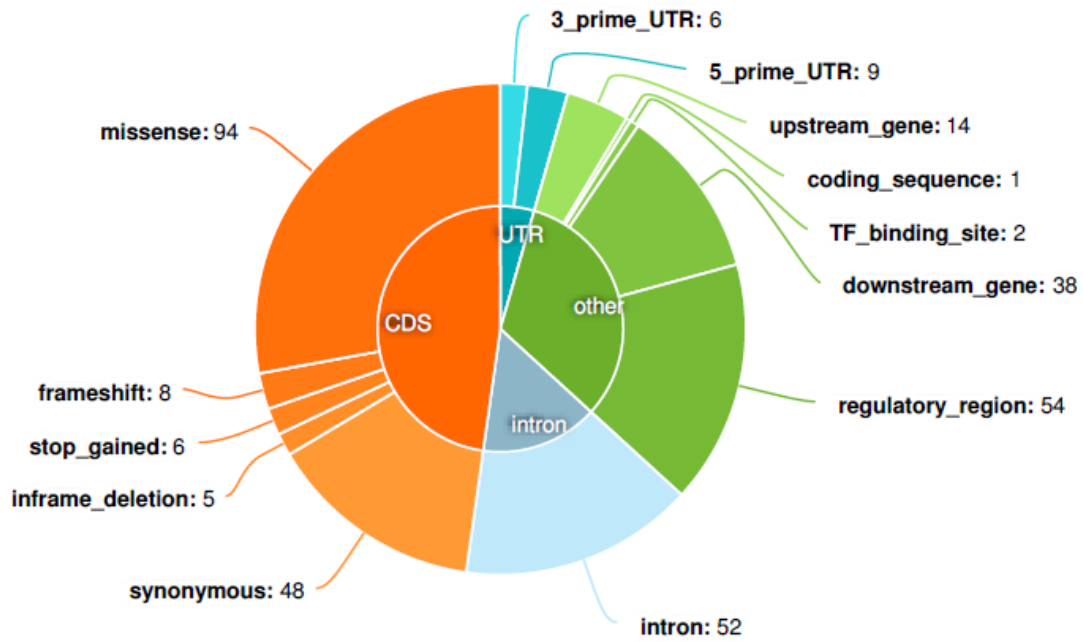


Profil de variants constitutionnels

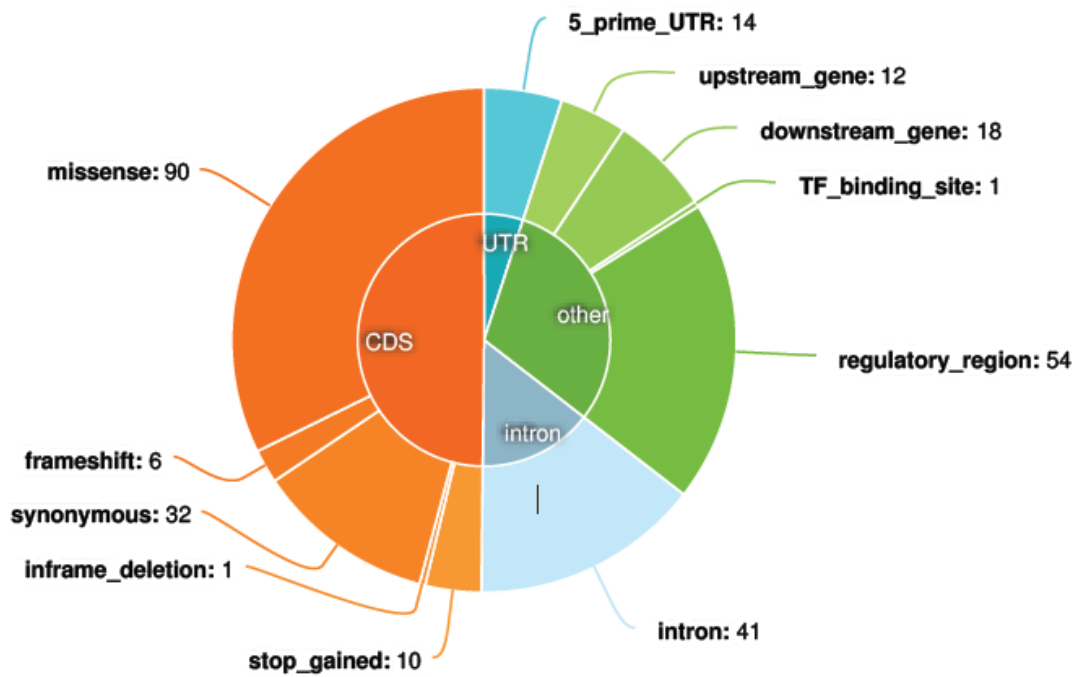


Profil de variants somatique du cancer du sein gauche

Figure 121 (suite) : Analyse de variants constitutionnels et somatiques et les profils des différents échantillons de Madame S.



Profil de variants somatique du cancer du sein droit



Profil de variants somatique de la rechute du cancer du sein gauche

Tableau 13 : Analyse de variants constitutionnels des gènes de la LOH du chromosome 22 en utilisant 3 bases de données (1000 Génomes, GenomeAD et Kaviar) avec un seuil de fréquence $\leq 0,5$ % pour éliminer les polymorphismes.

Gène	HGVSc	VAF	BAF	Position	Impact	Conséquences Génotype		
<i>MICAL3</i>	NM_001122731.2:	c.1450-22T>G	46.15	45.26	17893926	inconnu	Variant intronique	A/C
	NM_001136004.3:							
	NM_015241.2:							
<i>PRAME</i>	NM_006115.4:	c.70C>G p.Arg24Gly	46.15	45.26	22551041	Intermédiaire	Missense	G/C
	NM_001291716.1:							
	NM_206953.2:							
	NM_206954.2:							
	NM_206955.2:							
	NM_206956.2:							
NM_001291715.1:								
NM_001318127.1:								
	NM_001291717.1:	c.22C>G p.Arg8Gly						
	NM_001291719.1:							
	NM_001318126.1:							

Les 3 échantillons de cancer du sein ont une faible charge mutationnelle tumorale de 2,13 mutations par méga base [110]. J'ai ensuite comparé les 3 profils mutationnels des cancers du sein avec le profil mutationnel constitutionnel à la recherche des gènes dans au moins 2 prélèvements sur 4, avec une fréquence de $< 0,5\%$ des bases de 1000 Génomes, GenomeAD et Kaviar. J'ai identifié dans chacun des trois échantillons des cancers du sein une mutation différente de *PIK3CA* (Tableau 14)[111].

En considérant une faible charge mutationnelle tumorale d'un côté et un variant constitutionnel unique de *PRAME* situé dans la LOH 22q11 de l'autre, nous avons émis l'hypothèse que ce variant de *PRAME* pouvait être pathogène avec un potentiel carcinogénétique.

Tableau 14 : Gènes ayant subi des mutations constitutionnelles ou somatiques dans ≥ 2 échantillons de la patiente Madame S, avec un avec un seuil de fréquence $\leq 0,5$ % dans les 3 bases de données (1000 Génomes, GenomeAD et Kaviar).

Gene	ADN constitutionnel	ADN Tumoral		
		Sein gauche	Sein droit	Rechute sein gauche
<i>ACSL3</i>			■	■
<i>ADGRV1</i>		■	■	
<i>ADCY7</i>	■			■
<i>ARFGEF3</i>	■	■		
<i>CCDC168</i>	■	■		
<i>CDH1</i>	■	■		
<i>COL27A1</i>	■			■
<i>CTNNA2</i>		■	■	
<i>CYYR1</i>			■	■
<i>DCHS2</i>	■		■	
<i>DENND2A</i>			■	■
<i>DUSP27</i>	■		■	
<i>FAT2</i>	■			■
<i>FPGT-TNNI3K</i>	■	■		
<i>GOLM1</i>	■		■	
<i>KMT2A</i>		■		■
<i>KMT2C</i>			■	■
<i>MROH7</i>			■	■
<i>NCAN</i>		■	■	
<i>NEK4</i>		■	■	
<i>PIK3CA</i>		■	■	■
<i>PKD1</i>			■	■
<i>PLA2G4A</i>		■	■	
<i>POM121</i>		■	■	
<i>PRAMEF11</i>		■	■	
<i>RIF1</i>	■		■	
<i>RNF170</i>		■	■	
<i>SLC4A2</i>		■	■	
<i>TLN2</i>	■			■
<i>TMPRSS2</i>	■	■		
<i>TNNI3K</i>	■	■		
<i>TOM1</i>		■	■	
<i>TRIOBP</i>	■		■	
<i>TTN</i>	■	■	■	
<i>UNC13C</i>		■		■
<i>VSIG10L</i>	■		■	
<i>ZCCHC2</i>	■		■	
<i>ZNF205</i>		■		■
<i>ZNF568</i>	■	■	■	
<i>ZNF615</i>		■	■	■

■ Missense, ■ Gain de stop, ■ Frameshift, ■ Région d'épissage (accepteur et donneur), ■ Synonyme, □ Variant intronique. MutationTester: * Disease causing automatic, § Disease causing.

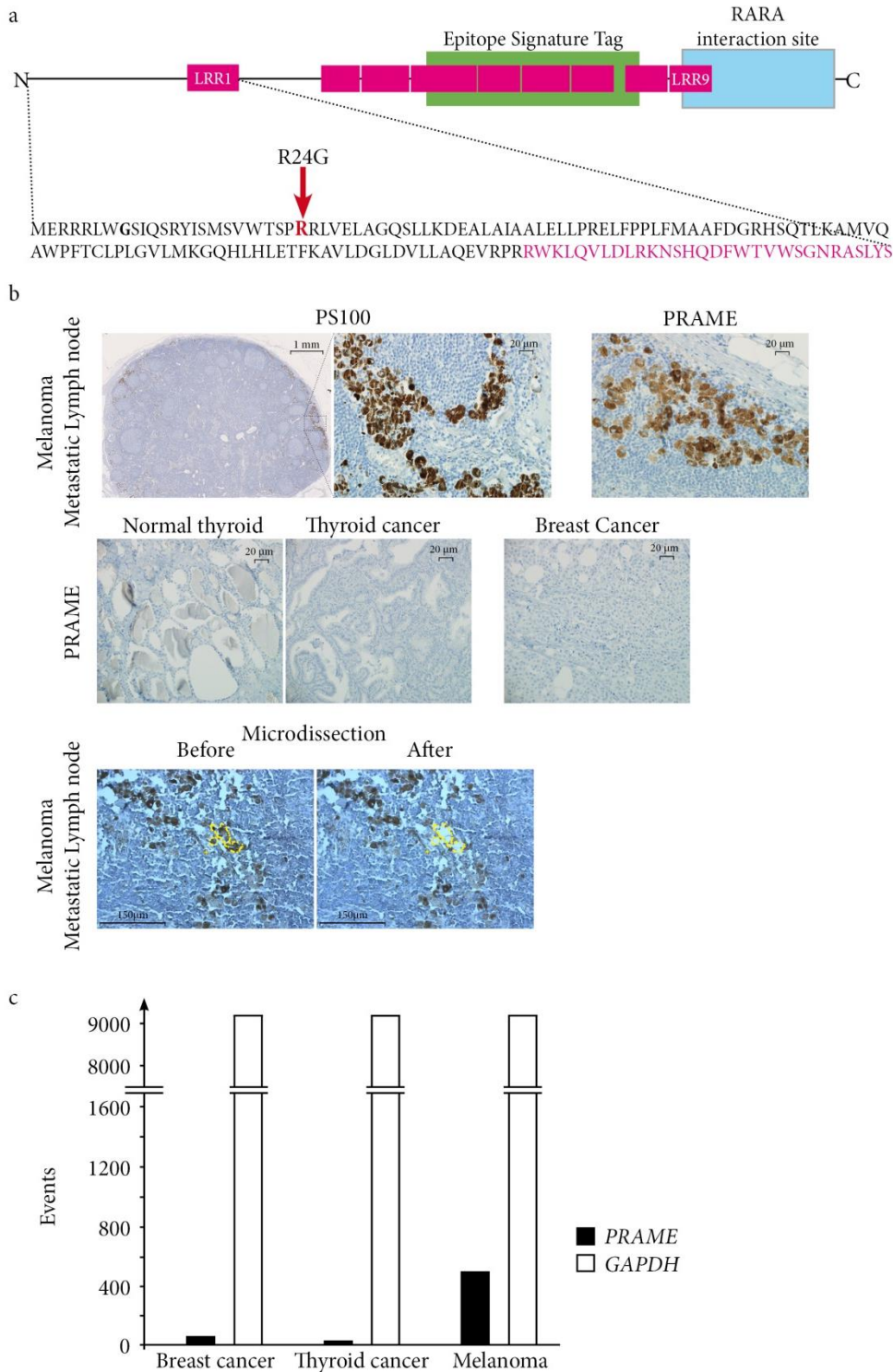
4. Faible expression du PRAME dans les échantillons tumoraux

Donc, chez Madame S, le 1^{er} allèle du *PRAME* a été perdu avec la LOH 22q11. Et le 2^{ème} allèle contient un variant c.70C>G p.Arg24Gly de signification fonctionnelle inconnue. Il est situé du côté N-terminal en dehors de l' « epitope signature tag » (Figure 12a).

Par immuno-marquage, nous avons d'abord évalué le niveau d'expression de PRAME dans deux échantillons de cancer, un des cancers du sein et le cancer de la thyroïde de Madame S. L'anticorps anti-PRAME utilisé est capable reconnaître la forme mutée de PRAME. Une métastase ganglionnaire d'un mélanome a été utilisée comme contrôle positif [112]. Nous n'avons pas trouvé d'expression de la protéine PRAME dans les 2 types de cancers (Figure 12b). Puis, après une micro dissection laser des cellules tumorales du cancer du sein, de la thyroïde et du mélanome, nous avons montré avec la ddPCR une très faible expression de l'ARNm de PRAME dans les cellules des cancers du sein et de la thyroïde par rapport aux cellules du mélanome (Figure 12c).

Sur la base de ces résultats, nous avons conclu que le variant c.70C>G p.Arg24Gly pourrait être une mutation perte de fonction s'accompagnant d'une protéine indétectable.

Figure 132: a) Structure de la protéine PRAME, avec la flèche montrant la modification de la protéine correspondant à la mutation du gène *PRAME* trouvée (c.70 C>G p.Arg24Gly). b) Immunomarquage de PRAME et de PS100 dans les tumeurs du sein et de la thyroïde de Madame S et dans une métastase ganglionnaire de mélanome comme contrôle positif. c) ddRTqPCR sur des cellules microdisséquées au laser pour analyser le niveau d'expression de l'ARNm de *PRAME* dans les cellules des cancers du sein et de la thyroïde de Madame S par rapport aux cellules d'un mélanome.



IV. Discussion

Ce travail s'inscrit dans la suite des travaux de notre laboratoire sur la génomique constitutionnelle de moyenne à faible pénétrance du cancer qui reste encore mal connue. Avec une approche individuelle différente des études des familles et de population habituellement utilisées, il est possible d'identifier des événements constitutionnels potentiellement impliqués dans la carcinogenèse.

Ici, j'ai pu identifier avec 2 différentes analyses 2 régions probablement impliquées dans la carcinogénèse commune de cancers du sein et de la thyroïde. La première dans le chromosome X chez 5 patientes avec des cancers concomitants du sein et de la thyroïde sans aucun syndrome de prédisposition au cancer connu. La deuxième dans le chromosome 22 chez une patiente avec de multiple cancer et également sans aucun syndrome de prédisposition impliquant des gènes de forte pénétrance.

Devant les LOH retrouvées, devant une hypothèse d'un gène suppresseur de tumeur dans ses régions, les 2 allèles devant donc être inactivés. Le premier perdu avec la LOH constitutionnelle, le deuxième inactivé par une mutation secondairement acquise. En revanche, s'il s'agit d'un oncogène, le deuxième allèle aurait une mutation activatrice.

Le séquençage Sanger de la région du chromosome X s'est avéré très difficile à cause de la position pseudo-autosomale de cette LOH.

Par contre, le NGS de la région du chromosome 22 a permis d'identifier une mutation du gène *PRAME*.

Cette mutation c.70C>G p.Arg24Gly de *PRAME* que nous avons identifiée correspond à la portion N-terminal de la protéine. Elle conduit au remplacement d'une arginine en position 24 par une glycine (Figure 12a). Le premier est un acide aminé plutôt polaire et hydrophile (mais aussi amphipathique) fréquent dans les sites actifs ou les sites de liaison à la surface, alors que la glycine est le plus petit acide aminé, apolaire, hydrophobe, souvent à

l'intérieur, et se distingue par sa capacité à lier les phosphates de l'ATP [113]. De plus, les changements de glycine en arginine, en particulier dans les régions transmembranaires des protéines liées à la membrane, peuvent modifier le repliement des protéines et être associés à des maladies [114].

Comme la carcinogenèse peut être attribuée à un événement dans un gène de forte pénétrance comme l'*HER2* et les cancers du sein, ou peut être le résultat de la dérégulation d'une voie de signalisation comme la voie d'EGFR. La première question est le rôle exact de *PRAME* dans la carcinogenèse. Et, la deuxième question est de trouver une voie possible impliquée dans une carcinogenèse multifactorielle et qui inclut *PRAME*.

Ainsi, en utilisant la base de données de réseau d'interaction de « String Database » (v.11) pour établir les liens entre des différentes protéines correspondant à des gènes qui ont été touchés par un variant dans deux échantillons ou plus, nous avons trouvé 10 protéines interconnectées qui peuvent être liées à *PRAME* par la cadhérine-1 (CDH1) (Figure 13). La question de l'interaction avec la protéine CDH1 mérite d'être étudiée.

***PRAME* un cible important mais de faible pénétrance**

Donc, notre approche individuelle nous a permis d'identifier le gène *PRAME* comme cible ; c'est un gène qui prend de plus en plus de l'importance.

Le gène *PRAME* fait partie de l'une des familles de gènes les plus amplifiées chez les mammifères, et constitue la troisième plus grande famille de gènes dans le génome de la souris [115]. Il a été proposé qu'il soit impliqué dans la gamétogenèse, la folliculogenèse et l'embryogenèse précoce chez la souris [116].

Le gène *PRAME* code pour un antigène spécifique du cancer, membre de la famille des antigènes du testicule et du cancer (cancer testis-antigen). L'antigène est reconnu par HLA-A24. Le gène *PRAME* est situé dans le locus du gène de l'immunoglobuline lambda

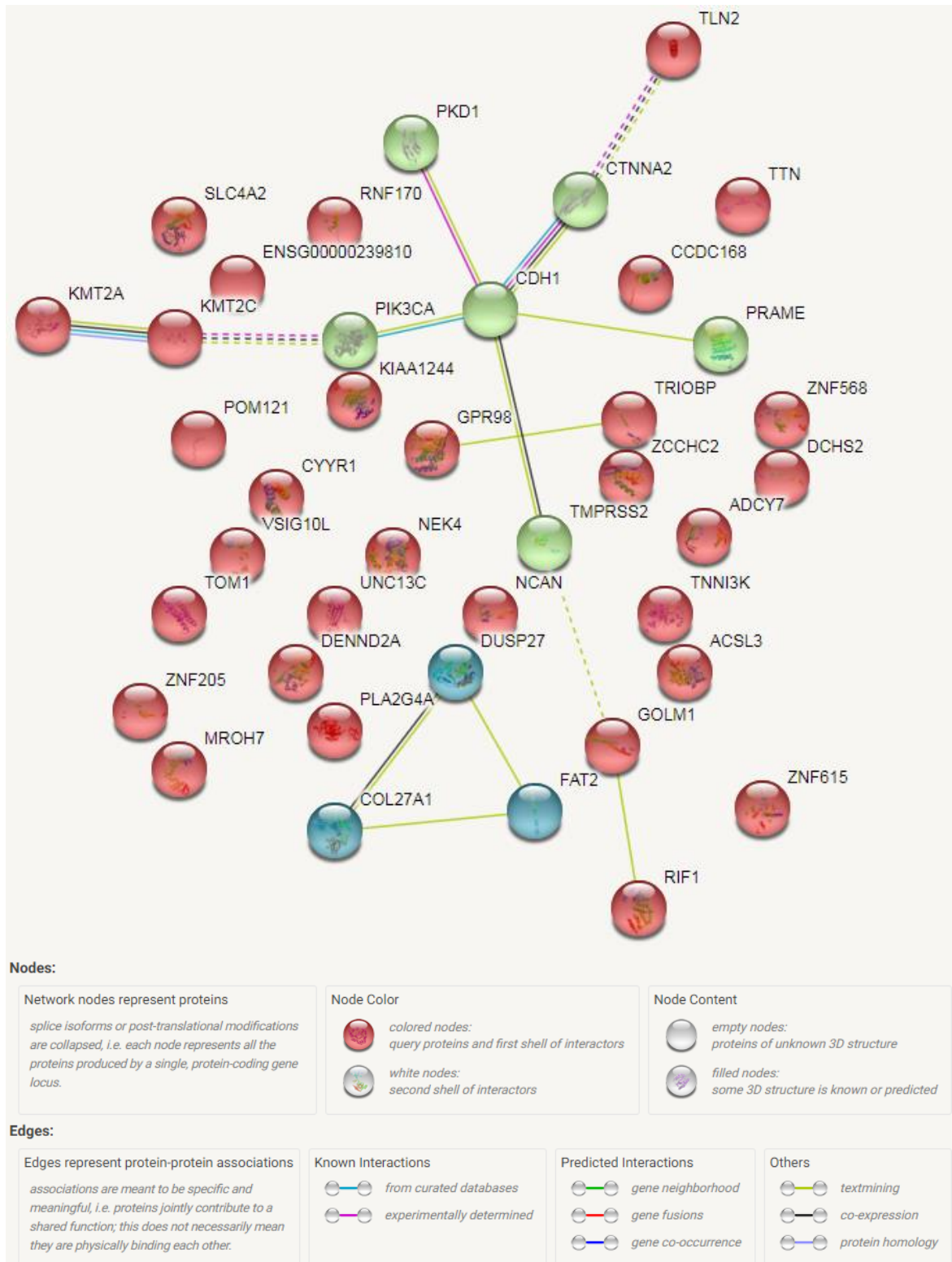
sur le brin inverse du chromosome 22 (22q11.22) sur 12 kilo bases près du pseudogène *BCR4*, une des régions de points de cassure (breakpoint cluster) impliqués dans les réarrangements du chromosome 22 [117-120].

Dans les tissus adultes sains et normaux, l'expression du gène *PRAME* n'est généralement pas détectée, sauf dans les testicules, les ovaires, les surrénales, le placenta et l'endomètre, où il est faiblement exprimé [94, 121]. Il est régulé épigénétiquement par la méthylation de l'ADN dans des régions spécifiques riches en dinucléotide de cytosine/guanine dans le promoteur de *PRAME* [122-124], et/ou par des ARN interférents spécifiques (comme miR421 ou miR211) [125-127].

Lorsque la protéine *PRAME* est exprimée, elle a été décrite comme nucléaire et cytoplasmique, mais aussi comme une protéine liée à la membrane avec la région d'acides aminés 310-331 en extracellulaire. L'expression membranaire de *PRAME* est indépendante de la phase du cycle cellulaire [128-130].

La protéine *PRAME* fait partie de la famille des protéines LRR (leucine rich repeat) [131] (Figure 12a). *PRAME* réprime le gène *RARβ2*, se lie au récepteur de l'acide rétinoïque (*RARα*) sur l'extrémité C-terminale avec la participation de *EZH2*, l'une des protéines du complexe polycomb, pour former un complexe hétérotrimérique qui réprime la transcription des gènes cibles de *RAR* [121, 132, 133].

Figure 143 : Réseau d'interaction selon la base de données « String Database » (v.11) pour établir une connexion entre les différentes protéines correspondantes aux gènes mutés dans deux échantillons ou plus de Madame S. Dix protéines interconnectées ont été identifiées et peuvent être liées à PRAME par la cadhérine-1 (CDH1).



En l'absence de PRAME, la voie de signalisation du récepteur de l'acide rétinoïque maintient le cycle cellulaire arrêté, favorise la différenciation et l'apoptose [132-135]. La diminution de l'expression de PRAME diminue le taux de prolifération et peut induire une mort (apoptose) indépendante de la caspase dans les cellules leucémiques *in vitro* et *in vivo* par ses interactions avec S100A4/p53, Bcl-2 et p21 [136-139]. L'augmentation de l'expression de PRAME est corrélée à la diminution de l'expression des gènes pro-apoptotiques [140].

Le rôle de la protéine PRAME dans la carcinogénèse reste controversé. L'association entre son niveau d'expression et son rôle dans la carcinogénèse est controversée, certains articles l'ayant décrit comme un oncogène tandis que d'autres comme un gène suppresseur de tumeur en fonction du type de cancer [141-144]. De plus, certains papiers ont décrit une fonction différente de PRAME dans le même type de cancer probablement en fonction de stade [141, 145-151].

L'expression du gène *PRAME* augmente dans plusieurs types des cancers comme le mélanome [112, 152-155], le carcinome épidermoïde pulmonaire [156, 157], le cancer du sein [158], le carcinome rénal [159], le cancer ovarien [160-162], le neuroblastome [163], le sarcome [164, 165], le myélome multiple [166], la leucémie aiguë [167-169], la leucémie myéloïde chronique [170, 171], et le lymphome de Hodgkin [172-175].

Cependant, l'expression du gène *PRAME* n'est pas toujours augmentée aux stades précoces de la carcinogénèse, ce qui suggère qu'il pourrait agir comme un gène conducteur « driver » ou passager en fonction du stade de la carcinogénèse [121].

En effet, l'augmentation de l'expression de *PRAME* est généralement corrélée à un stade avancé et à un mauvais pronostic des tumeurs solides comme les mélanomes [176-178], les cancers de la tête et du cou [179, 180], les sarcomes [181-185], les cancers du sein [141, 145, 158, 186, 187], les neuroblastomes [163], les carcinomes hépatocellulaires [136]

et les cancers des ovaires [188, 189]. Mais la surexpression de *PRAME* permet de prédire aussi un bon pronostic dans les leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques chez les enfants sans interférence avec la signalisation du RA [140, 168, 190-195]. De l'autre côté, *PRAME* est hypométhylé pendant la crise blastique de la LMC et la LAM, et il prend un rôle oncogène et prédit un mauvais pronostic [123, 124, 134, 170].

PRAME a aussi un rôle dans la réponse immunitaire. Il peut stimuler les lymphocytes T cytotoxiques contre les cellules de mélanome [137, 196, 197]. Une réponse immunitaire médiée par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques au *PRAME* est décrite aussi dans la leucémie aiguë/chronique [198]. De même, il existe une réponse immunitaire humorale et cellulaire thérapeutique spécifique au *PRAME* dans le mélanome [199], le cancer du poumon non à petites cellules [200, 201], le sarcome [202], le médulloblastome [117], le carcinome de la prostate et le carcinome rénal à cellules claires [203]. Une autre étude a démontré une corrélation négative entre *PRAME* et les gènes impliqués dans la présentation d'antigène, et le statut PDL1 dans le léiomyosarcome [164].

La *PRAME* est donc un candidat intéressant pour l'immunothérapie médiée par les lymphocytes T, comme il a été démontré que les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de *PRAME* sont capables d'attaquer les cellules cancéreuses qui l'expriment [174, 204-207].

Il a été montré que la surexpression de *PRAME* est fortement associée, et un facteur prédictif indépendant de la récurrence hématogène (*via* la transition épithélio-mésenchymateuse, TEM), probablement par des interactions avec les gènes de la TEM comme *EGFR*, *ITGB1* et *TCF3* [118, 208-211]. *PRAME* joue un rôle dans la promotion de la transition épithéliale-mésenchymateuse et favorise la migration et l'invasion des cellules triple négatives de cancer du sein par des changements l'expression de la E-cadhérine, la N-cadhérine, la vimentine et de *ZEB1* [118, 124]. Dans des travaux *in vivo*, il a été trouvé

que le knockdown de *PRAME* dans les cellules de cancer du sein diminue l'expression de l'annexin-V et la E-cadhérine, et favorise la prolifération, la migration et l'invasion [141, 150].

L'hypothèse est que l'inactivation complète de *PRAME* est un facteur favorisant le début de la carcinogénèse. Ensuite, en raison d'un mécanisme inconnu, *PRAME* est réactivé, probablement en relation avec l'environnement inflammatoire associé aux processus de la carcinogénèse. Et cela peut être l'un des facteurs qui transforme la tumeur indolente en une tumeur agressive, et qui provoque des métastases.

V. Perspectives et conclusion

Pour compléter ce travail, nous travaillons actuellement sur un modèle *in vitro* d'épithélium mammaire normal dans un premier temps, puis des cellules de cancer du sein dans un deuxième temps, pour inactiver *PRAME* et étudier les effets sur le comportement des cellules. Puis, nous envisageons d'étudier l'agressivité *in vivo* dans un modèle de souris de cellules invalidées « knock-out » de *PRAME*.

Dans un deuxième temps, le rôle de la LOH du chromosome X reste à déterminer.

Nous avons confirmé dans ce travail la pertinence de l'approche individuelle pour identifier un potentiel événement génétique de pénétrance faible à modérée chez une patiente ayant des antécédents de cancers multiples non agressifs.

D'un côté, nous avons identifié une mutation peu fréquente dans un gène qui gagne progressivement de l'importance car il semble impliqué dans la carcinogénèse, le diagnostic, la surveillance et potentiellement dans le traitement de différents types de tumeurs solides et hémopathies malignes. Son rôle exact reste à élucider.

De l'autre côté, l'étude de la génétique constitutionnelle devient de plus en plus compliquée avec un très grand nombre de cibles à étudier pour identifier les cibles pertinents avec la difficulté de préciser leur valeur fonctionnelle qui nécessite une enquête quasi policière très complexe. Ceci va nous conduire à la limite des études biologique. Donc, c'est le moment de commencer à réfléchir comment intégrer l'intelligence artificielle dans l'étude de la génétique constitutionnelle.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R *et al*: **Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality.** *JAMA* 2010, **304**(9):967-975.
2. Anisimov VN: **Biology of aging and cancer.** *Cancer Control* 2007, **14**(1):23-31.
3. Knudson AG: **Chasing the cancer demon.** *Annu Rev Genet* 2000, **34**:1-19.
4. Bateson W: **Mendel's Principles of Heredity: Cambridge University Press. März 1909; 2nd Impr 1909, 3**:1913.
5. Bateson P: **William Bateson: a biologist ahead of his time.** *J Genet* 2002, **81**(2):49-58.
6. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH: **Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands.** *J Natl Cancer Inst* 1994, **86**(21):1600-1608.
7. Demenais F, Martinez M, Lathrop M: **Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles.** In: *Annales de l'Institut Pasteur/Actualites: 1996*; Elsevier; 1996: 3-12.
8. Feingold J: **Maladies multifactorielles: un cauchemar pour le généticien.** *médecine/sciences* 2005, **21**(11):927-933.
9. Mann C: **Cohort, cross sectional and case-control studies: research design II.** *Emerg Med J* 2003, **20**:54-60.
10. Griffiths JF, Griffiths AJ, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT, Miller JH: **An introduction to genetic analysis:** Macmillan; 2005.
11. Easton D, Peto J: **The contribution of inherited predisposition to cancer incidence.** *Cancer Surv* 1990, **9**(3):395-416.
12. Rousset-Jablonski C, Gompel A: **Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer.** *Maturitas* 2017, **105**:69-77.
13. Litton JK, Burstein HJ, Turner NC: **Molecular Testing in Breast Cancer.** *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2019, **39**:e1-e7.
14. Ostrander E, Friedrichsen D: **Genetic factors: finding cancer susceptibility genes.** *Clinical Oncology, 3rd edn Elsevier Science, Philadelphia, PA* 2004:253-267.
15. Karyadi DM, Geybels MS, Karlins E, Decker B, McIntosh L, Hutchinson A, Kolb S, McDonnell SK, Hicks B, Middha S *et al*: **Whole exome sequencing in 75 high-risk families with validation and replication in independent case-control studies identifies TANGO2, OR5H14, and CHAD as new prostate cancer susceptibility genes.** *Oncotarget* 2017, **8**(1):1495-1507.
16. Nagy R, Sweet K, Eng C: **Highly penetrant hereditary cancer syndromes.** *Oncogene* 2004, **23**(38):6445-6470.
17. Strong L, Amos C: **Inherited susceptibility.** *Cancer epidemiology and prevention* 1996:559-582.
18. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC: **Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features.** *J Urol* 1993, **150**(3):797-802.
19. Brandao A, Paulo P, Teixeira MR: **Hereditary Predisposition to Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Implications.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(14).
20. Ostrander EA, Stanford JL: **Genetics of prostate cancer: too many loci, too few genes.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**(6):1367-1375.
21. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1999, **91**(11):943-949.
22. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC: **Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.** *Science* 1990, **250**(4988):1684-1689.

23. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D *et al*: **Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.** *Science* 1994, **265**(5181):2088-2090.
24. Jarvik GP, Stanford JL, Goode EL, McIndoe R, Kolb S, Gibbs M, Hood L, Ostrander EA: **Confirmation of prostate cancer susceptibility genes using high-risk families.** *J Natl Cancer Inst Monogr* 1999(26):81-87.
25. Hamdan D, Nguyen TT, Leboeuf C, Meles S, Janin A, Bousquet G: **Genomics applied to the treatment of breast cancer.** *Oncotarget* 2019, **10**(46):4786-4801.
26. Moisio AL, Sistonen P, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomaki P: **Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer.** *Am J Hum Genet* 1996, **59**(6):1243-1251.
27. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavgigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE: **A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes.** *Nat Genet* 1996, **13**(1):117-119.
28. Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC: **The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals.** *Nat Genet* 1995, **11**(2):198-200.
29. Neuhausen S, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, Swensen J, Hampel H, Borgen P, Brown K, Skolnick M *et al*: **Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer.** *Nat Genet* 1996, **13**(1):126-128.
30. **Genetic/familial high-risk assessment for: breast and ovarian (Version 2.2019)**
[https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf]
31. Morgan TH: **Random Segregation Versus Coupling in Mendelian Inheritance.** *Science* 1911, **34**(873):384.
32. Vasseur F: **Les maladies génétiques" complexes.** *Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale* 2010, **2011**.
33. **Quels gènes analyser face à un risque de cancer héréditaire du sein et de l'ovaire ?**
[<http://www.unicancer.fr/actualites/groupe/quels-genes-analyser-face-risque-cancer-hereditaire-du-sein-et-ovaire>]
34. Petrucelli N, Daly MB, Pal T: **BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer.** In: *GeneReviews*((R)). edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
35. **MIM Number: *113705 : 08/17/2018.** [<https://www.omim.org/entry/113705>]
36. **MIM Number: * 600185: 11/28/2017.** [<https://www.omim.org/entry/600185>]
37. Viassolo V, Ayme A, Chappuis PO: **Cancer du sein : risque génétique.** *Imagerie de la Femme* 2016, **26**(2):95-104.
38. **MIM Number: *610355: 02/04/2016.** [<https://www.omim.org/entry/610355>]
39. Schneider K, Zelle K, Nichols KE, Garber J: **Li-Fraumeni Syndrome.** In: *GeneReviews*((R)). edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
40. **MIM Number: *191170 : 11/07/2018 .** [<https://www.omim.org/entry/191170>]
41. Kaurah P, Huntsman DG: **Hereditary Diffuse Gastric Cancer.** In: *GeneReviews*((R)). edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
42. **MIM Number: *192090: 10/18/2018.** [<https://www.omim.org/entry/192090>]
43. Eng C: **PTEN Hamartoma Tumor Syndrome.** In: *GeneReviews*((R)). edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
44. **MIM Number: 601728: 06/28/2018.** [<https://www.omim.org/entry/601728>]
45. Mehta PA, Tolar J: **Fanconi Anemia.** In: *GeneReviews*((R)). edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
46. **MIM Number: *602774: 12/04/2013.** [<https://www.omim.org/entry/602774>]

47. Sopik V, Akbari MR, Narod SA: **Genetic testing for RAD51C mutations: in the clinic and community.** *Clin Genet* 2015, **88**(4):303-312.
48. Thompson ER, Boyle SE, Johnson J, Ryland GL, Sawyer S, Choong DY, kConFab, Chenevix-Trench G, Trainer AH, Lindeman GJ *et al*: **Analysis of RAD51C germline mutations in high-risk breast and ovarian cancer families and ovarian cancer patients.** *Hum Mutat* 2012, **33**(1):95-99.
49. Pelttari LM, Kiiski JI, Ranta S, Vilske S, Blomqvist C, Aittomaki K, Nevanlinna H: **RAD51, XRCC3, and XRCC2 mutation screening in Finnish breast cancer families.** *Springerplus* 2015, **4**:92.
50. Kleibl Z, Kristensen VN: **Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management.** *Breast* 2016, **28**:136-144.
51. **MIM Number: *602954: 12/04/2013.** [<https://www.omim.org/entry/602954>]
52. Kohlmann W, Gruber SB: **Lynch Syndrome.** In: *GeneReviews((R))*. edn. Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
53. **MIM Number: *120436 : 04/20/2018.** [<https://www.omim.org/entry/120436>]
54. **MIM Number: *609309 : 10/05/2016.** [<https://www.omim.org/entry/609309>]
55. **MIM Number: *600678: 01/24/2018.** [<https://www.omim.org/entry/600678>]
56. **MIM Number: *600259: 12/27/2016.** [<https://www.omim.org/entry/600259>]
57. **MIM Number: *185535: 12/18/2017.** [<https://www.omim.org/entry/185535>]
58. **Recommandations de prévention ou dépistage des personnes porteuses d'une mutation d'un des gènes analysés**
- dans le panel GGC-UNICANCER** [http://www.unicancer.fr/sites/default/files/Tableau-1-genes-inclus-dans-panel-sein-ovaire_CP-UNICANCER-09.11.17.pdf]
59. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, Sanjad S *et al*: **Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(45):19096-19101.
60. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, Nadeau JH: **Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(6):446-450.
61. O'Donovan MC, Kirov G, Owen MJ: **Phenotypic variations on the theme of CNVs.** *Nat Genet* 2008, **40**(12):1392-1393.
62. Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, Thorleifsson G, Sulem P, Besenbacher S, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Kristinsson KT, Jonasdottir A *et al*: **Parental origin of sequence variants associated with complex diseases.** *Nature* 2009, **462**(7275):868-874.
63. Kong A, Thorleifsson G, Stefansson H, Masson G, Helgason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Sverrisson S, Thorlacius T *et al*: **Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate.** *Science* 2008, **319**(5868):1398-1401.
64. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekstrom TJ, Harris TB *et al*: **Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering.** *JAMA* 2008, **299**(24):2877-2883.
65. Biemont C: **From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us?** *Heredity (Edinb)* 2010, **105**(1):1-3.
66. Gertz J, Varley KE, Reddy TE, Bowling KM, Pauli F, Parker SL, Kucera KS, Willard HF, Myers RM: **Analysis of DNA methylation in a three-generation family reveals widespread genetic influence on epigenetic regulation.** *PLoS Genet* 2011, **7**(8):e1002228.
67. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: **Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors.** *Genes Chromosomes Cancer* 1994, **10**(4):231-243.
68. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D: **Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.** *Science* 1992, **258**(5083):818-821.

69. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC *et al*: **Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(16):9212-9217.
70. Barry D: **Differential recall bias and spurious associations in case/control studies.** *Stat Med* 1996, **15**(23):2603-2616.
71. Maciag PC, Schlecht NF, Souza PS, Franco EL, Villa LL, Petzl-Erler ML: **Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000, **9**(11):1183-1191.
72. Greenland S: **Response and follow-up bias in cohort studies.** *Am J Epidemiol* 1977, **106**(3):184-187.
73. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA: **Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism.** *Cancer Res* 1996, **56**(18):4108-4110.
74. Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK, Henderson BE, Kolonel LN, Crocitto L, Wang W, Haile RW: **Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans.** *Cancer Res* 1998, **58**(8):1620-1623.
75. Pritchard JK: **Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(1):124-137.
76. Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff AS, Remontet L, French network of cancer r: **Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors.** *Rev Epidemiol Sante Publique* 2014, **62**(2):95-108.
77. Stratton MR, Rahman N: **The emerging landscape of breast cancer susceptibility.** *Nat Genet* 2008, **40**(1):17-22.
78. Reeves GK, Travis RC, Green J, Bull D, Tipper S, Baker K, Beral V, Peto R, Bell J, Zelenika D *et al*: **Incidence of breast cancer and its subtypes in relation to individual and multiple low-penetrance genetic susceptibility loci.** *JAMA* 2010, **304**(4):426-434.
79. Hsieh YC, Tu SH, Su CT, Cho EC, Wu CH, Hsieh MC, Lin SY, Liu YR, Hung CS, Chiou HY: **A polygenic risk score for breast cancer risk in a Taiwanese population.** *Breast Cancer Res Treat* 2017, **163**(1):131-138.
80. Landa I, Robledo M: **Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track?** *J Mol Endocrinol* 2011, **47**(1):R43-58.
81. Nielsen SM, White MG, Hong S, Aschebrook-Kilfoy B, Kaplan EL, Angelos P, Kulkarni SA, Olopade OI, Grogan RH: **The Breast-Thyroid Cancer Link: A Systematic Review and Meta-analysis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016, **25**(2):231-238.
82. Hall LC, Salazar EP, Kane SR, Liu N: **Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **109**(1-2):57-66.
83. Arer IM, Yabanoglu H, Kus M, Akdur A, Avci T: **Retrospective Analysis of Patients with Synchronous Primary Breast and Thyroid Carcinoma.** *Eur J Breast Health* 2018, **14**(2):80-84.
84. Nio Y, Iguchi C, Itakura M, Toga T, Hashimoto K, Koike M, Omori H, Sato Y, Endo S: **High incidence of synchronous or metachronous breast cancer in patients with malignant and benign thyroid tumor or tumor-like disorders.** *Anticancer Res* 2009, **29**(5):1607-1610.
85. El Bouchtaoui M, Do Cruzeiro M, Leboeuf C, Loisel-Ferreira I, Fedronie C, Ferreira C, Ait El Far R, Ziou M, Espie M, Falgarone G *et al*: **A Constitutional Activating MET Mutation Makes the Genetic Link between Malignancies and Chronic Inflammatory Diseases.** *Clin Cancer Res* 2019, **25**(14):4504-4515.
86. Legres LG, Janin A, Masselon C, Bertheau P: **Beyond laser microdissection technology: follow the yellow brick road for cancer research.** *Am J Cancer Res* 2014, **4**(1):1-28.
87. Bousquet G, El Bouchtaoui M, Leboeuf C, Battistella M, Varna M, Ferreira I, Plassa LF, Hamdan D, Bertheau P, Feugeas JP *et al*: **Tracking sub-clonal TP53 mutated tumor cells in human metastatic renal cell carcinoma.** *Oncotarget* 2015, **6**(22):19279-19289.
88. Andrieux J: **[Array-CGH for routine diagnosis of cryptic chromosomal imbalances].** *Pathol Biol (Paris)* 2008, **56**(6):368-374.

89. Tuefferd M, De Bondt A, Van Den Wyngaert I, Talloen W, Verbeke T, Carvalho B, Clevert DA, Alifano M, Raghavan N, Amaratunga D *et al*: **Genome-wide copy number alterations detection in fresh frozen and matched FFPE samples using SNP 6.0 arrays.** *Genes Chromosomes Cancer* 2008, **47**(11):957-964.
90. Wang Y, Cottman M, Schiffman JD: **Molecular inversion probes: a novel microarray technology and its application in cancer research.** *Cancer Genet* 2012, **205**(7-8):341-355.
91. Verneuil L, Varna M, Ratajczak P, Leboeuf C, Plassa LF, Elbouchtaoui M, Schneider P, Sandid W, Lebbe C, Peraldi MN *et al*: **Human skin carcinoma arising from kidney transplant-derived tumor cells.** *J Clin Invest* 2013, **123**(9):3797-3801.
92. Flores-Renteria L, Krohn A: **Scoring microsatellite loci.** *Methods Mol Biol* 2013, **1006**:319-336.
93. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C *et al*: **Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing.** *Nat Biotechnol* 2009, **27**(2):182-189.
94. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T *et al*: **Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor.** *Immunity* 1997, **6**(2):199-208.
95. Nettersheim D, Arndt I, Sharma R, Riesenbergs S, Jostes S, Schneider S, Holzel M, Kristiansen G, Schorle H: **The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas.** *Br J Cancer* 2016, **115**(4):454-464.
96. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ: **PRAME Expression in Melanocytic Tumors.** *Am J Surg Pathol* 2018, **42**(11):1456-1465.
97. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S: **Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**(9):4393-4397.
98. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, Tao Y, Hoog J, Snider J, Davies S, DeSchryver K, Evans DB, Steinseifer J *et al*: **Phosphatidyl-inositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **119**(2):379-390.
99. Mertens AC, Mitby PA, Radloff G, Jones IM, Perentesis J, Kiffmeyer WR, Neglia JP, Meadows A, Potter JD, Friedman D *et al*: **XRCC1 and glutathione-S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to radiotherapy-related malignancies in survivors of Hodgkin disease.** *Cancer* 2004, **101**(6):1463-1472.
100. Zheng T, Holford TR, Zahm SH, Owens PH, Boyle P, Zhang Y, Zhang B, Wise JP, Sr., Stephenson LP, Ali-Osman F: **Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, alcohol consumption and breast cancer risk.** *Br J Cancer* 2003, **88**(1):58-62.
101. Song Z, Shao C, Feng C, Lu Y, Gao Y, Dong C: **Association of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis.** *Ther Clin Risk Manag* 2016, **12**:763-769.
102. Bansal VK, Rajan K, Sharma A, Paliwal P, Chaubal G, Jindal V, Misra MC, Kucheria K: **Prospective Case-Control Study to Evaluate the Role of Glutathione S Transferases (GSTT1 and GSTM1) Gene Deletion in Breast Carcinoma and Its Prognostic Significance.** *Indian J Surg* 2015, **77**(Suppl 3):1067-1072.
103. Yuan P, Yuan L, Xu BL, Wang CZ, Yang HZ, Li Y: **Predictive potential role of glutathione S-transferases polymorphisms in response to chemotherapy and breast cancer prognosis.** *Genet Mol Res* 2015, **14**(4):16675-16681.
104. Liu P, Morrison C, Wang L, Xiong D, Vedell P, Cui P, Hua X, Ding F, Lu Y, James M *et al*: **Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing.** *Carcinogenesis* 2012, **33**(7):1270-1276.

105. Khan FH, Pandian V, Ramraj S, Natarajan M, Aravindan S, Herman TS, Aravindan N: **Acquired genetic alterations in tumor cells dictate the development of high-risk neuroblastoma and clinical outcomes.** *BMC Cancer* 2015, **15**:514.
106. Zhang R, Song C: **Loss of CSMD1 or 2 may contribute to the poor prognosis of colorectal cancer patients.** *Tumour Biol* 2014, **35**(5):4419-4423.
107. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP: **DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources.** *Am J Hum Genet* 2009, **84**(4):524-533.
108. Raudsepp T, Chowdhary BP: **The Eutherian Pseudoautosomal Region.** *Cytogenet Genome Res* 2015, **147**(2-3):81-94.
109. Weng S, Stoner SA, Zhang DE: **Sex chromosome loss and the pseudoautosomal region genes in hematological malignancies.** *Oncotarget* 2016, **7**(44):72356-72372.
110. Melendez B, Van Campenhout C, Rorive S, Remmelink M, Salmon I, D'Haene N: **Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue.** *Transl Lung Cancer Res* 2018, **7**(6):661-667.
111. Ellis H, Ma CX: **PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy.** *Curr Oncol Rep* 2019, **21**(12):110.
112. Field MG, Decatur CL, Kurtenbach S, Gezgin G, van der Velden PA, Jager MJ, Kozak KN, Harbour JW: **PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**(5):1234-1242.
113. Barnes MR: **Bioinformatics for geneticists : a bioinformatics primer for the analysis of genetic data**, 2nd edn. Chichester, England ; Hoboken, NJ: Wiley; 2007.
114. Molnar J, Szakacs G, Tusnady GE: **Characterization of Disease-Associated Mutations in Human Transmembrane Proteins.** *PLoS One* 2016, **11**(3):e0151760.
115. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M *et al*: **Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse.** *PLoS Biol* 2009, **7**(5):e1000112.
116. Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE, Singh P, Eppig JJ, Solter D, Knowles BB: **Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo.** *Genes Dev* 2006, **20**(19):2713-2727.
117. Orlando D, Miele E, De Angelis B, Guercio M, Boffa I, Sinibaldi M, Po A, Caruana I, Abballe L, Carai A *et al*: **Adoptive Immunotherapy Using PRAME-Specific T Cells in Medulloblastoma.** *Cancer Res* 2018, **78**(12):3337-3349.
118. Al-Khadairi G, Decock J: **Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME?** *Cancers (Basel)* 2019, **11**(7).
119. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits JL, Wang J, Shimizu N: **One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus.** *Genome Res* 1997, **7**(3):250-261.
120. Croce CM, Huebner K, Isobe M, Fainstain E, Lifshitz B, Shtivelman E, Canaani E: **Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(20):7174-7178.
121. Wadelin F, Fulton J, McEwan PA, Spriggs KA, Emsley J, Heery DM: **Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia.** *Mol Cancer* 2010, **9**:226.
122. Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP: **Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies.** *Genes Chromosomes Cancer* 2007, **46**(9):796-804.
123. Ortmann CA, Eisele L, Nuckel H, Klein-Hitpass L, Fuhrer A, Duhrsen U, Zeschnigk M: **Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia.** *Ann Hematol* 2008, **87**(10):809-818.

124. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES, Garate L, Cordeu L, Cervantes F, Prosper F *et al*: **Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia**. *Leuk Res* 2007, **31**(11):1521-1528.
125. Meng D, Yang S, Wan X, Zhang Y, Huang W, Zhao P, Li T, Wang L, Huang Y, Li T *et al*: **A transcriptional target of androgen receptor, miR-421 regulates proliferation and metabolism of prostate cancer cells**. *Int J Biochem Cell Biol* 2016, **73**:30-40.
126. Lee YK, Park UH, Kim EJ, Hwang JT, Jeong JC, Um SJ: **Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells**. *Cancer Lett* 2017, **403**:144-151.
127. Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K *et al*: **Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells**. *Int J Oncol* 2011, **39**(3):665-672.
128. Proto-Siqueira R, Figueiredo-Pontes LL, Panepucci RA, Garcia AB, Rizzatti EG, Nascimento FM, Ishikawa HC, Larson RE, Falcao RP, Simpson AJ *et al*: **PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma**. *Leuk Res* 2006, **30**(11):1333-1339.
129. Pankov D, Sjostrom L, Kalidindi T, Lee SG, Sjostrom K, Gardner R, McDevitt MR, O'Reilly R, Thorek DLJ, Larson SM *et al*: **In vivo immuno-targeting of an extracellular epitope of membrane bound preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)**. *Oncotarget* 2017, **8**(39):65917-65931.
130. Figueiredo DL, Mamede RC, Proto-Siqueira R, Neder L, Silva WA, Jr., Zago MA: **Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas**. *Head Neck* 2006, **28**(7):614-619.
131. Kajava AV: **Structural diversity of leucine-rich repeat proteins**. *J Mol Biol* 1998, **277**(3):519-527.
132. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R: **The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling**. *Cell* 2005, **122**(6):835-847.
133. Epping MT, Wang L, Plumb JA, Lieb M, Gronemeyer H, Brown R, Bernards R: **A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(45):17777-17782.
134. Oehler VG, Guthrie KA, Cummings CL, Sabo K, Wood BL, Gooley T, Yang T, Epping MT, Shou Y, Pogosova-Agadjanyan E *et al*: **The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells**. *Blood* 2009, **114**(15):3299-3308.
135. Yong AS, Keyvanfar K, Eniafe R, Savani BN, Rezvani K, Sloand EM, Goldman JM, Barrett AJ: **Hematopoietic stem cells and progenitors of chronic myeloid leukemia express leukemia-associated antigens: implications for the graft-versus-leukemia effect and peptide vaccine-based immunotherapy**. *Leukemia* 2008, **22**(9):1721-1727.
136. Zhu H, Wang J, Yin J, Lu B, Yang Q, Wan Y, Jia C: **Downregulation of PRAME Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Through the Activation of P53 Mediated Pathway**. *Cell Physiol Biochem* 2018, **45**(3):1121-1135.
137. Tajeddine N, Gala JL, Louis M, Van Schoor M, Tombal B, Gailly P: **Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo**. *Cancer Res* 2005, **65**(16):7348-7355.
138. Xu Y, Rong LJ, Meng SL, Hou FL, Zhang JH, Pan G: **PRAME promotes in vitro leukemia cells death by regulating S100A4/p53 signaling**. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016, **20**(6):1057-1063.
139. Xu Y, Yue Q, Wei H, Pan G: **PRAME induces apoptosis and inhibits proliferation of leukemic cells in vitro and in vivo**. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, **8**(11):14549-14555.

140. Goellner S, Steinbach D, Schenk T, Gruhn B, Zintl F, Ramsay E, Saluz HP: **Childhood acute myelogenous leukaemia: association between PRAME, apoptosis- and MDR-related gene expression.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(16):2807-2814.
141. Sun Z, Wu Z, Zhang F, Guo Q, Li L, Li K, Chen H, Zhao J, Song D, Huang Q *et al*: **PRAME is critical for breast cancer growth and metastasis.** *Gene* 2016, **594**(1):160-164.
142. Tajeddine N, Louis M, Vermeylen C, Gala JL, Tombal B, Gailly P: **Tumor associated antigen PRAME is a marker of favorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia patients and modifies the expression of S100A4, Hsp 27, p21, IL-8 and IGFBP-2 in vitro and in vivo.** *Leuk Lymphoma* 2008, **49**(6):1123-1131.
143. Dyrskjot L, Zieger K, Kissow Lildal T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, Borre M, Orntoft TF: **Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma.** *Br J Cancer* 2012, **107**(1):116-122.
144. Xu Y, Zou R, Wang J, Wang ZW, Zhu X: **The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer.** *Cell Prolif* 2020, **53**(3):e12770.
145. Sun Y, Urquidí V, Goodison S: **Derivation of molecular signatures for breast cancer recurrence prediction using a two-way validation approach.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **119**(3):593-599.
146. Yang L, Wang YZ, Zhu HH, Chang Y, Li LD, Chen WM, Long LY, Zhang YH, Liu YR, Lu J *et al*: **PRAME Gene Copy Number Variation Is Related to Its Expression in Multiple Myeloma.** *DNA Cell Biol* 2017, **36**(12):1099-1107.
147. Mitsuhashi K, Masuda A, Wang YH, Shiseki M, Motoji T: **Prognostic significance of PRAME expression based on immunohistochemistry for diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP therapy.** *Int J Hematol* 2014, **100**(1):88-95.
148. Luetkens T, Schafhausen P, Uhlich F, Stasche T, Akbulak R, Bartels BM, Hildebrandt Y, Gontarewicz A, Kobold S, Meyer S *et al*: **Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia.** *Leuk Res* 2010, **34**(12):1647-1655.
149. Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, Kawakami Y: **Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia.** *Br J Haematol* 2001, **112**(4):916-926.
150. Huang Q, Wei H, Wu Z, Li L, Yao L, Sun Z, Li L, Lin Z, Xu W, Han S *et al*: **Preferentially Expressed Antigen of Melanoma Prevents Lung Cancer Metastasis.** *PLoS One* 2016, **11**(7):e0149640.
151. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Claesson I, Sundfeldt K, Horvath G: **External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas.** *BMC Cancer* 2009, **9**:336.
152. Gezgin G, Luk SJ, Cao J, Dogrusoz M, van der Steen DM, Hagedoorn RS, Krijgsman D, van der Velden PA, Field MG, Luyten GPM *et al*: **PRAME as a Potential Target for Immunotherapy in Metastatic Uveal Melanoma.** *JAMA Ophthalmol* 2017, **135**(6):541-549.
153. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, Federman S, Miller JR, 3rd, Allen RE, Singer MI *et al*: **The gene expression signatures of melanoma progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(17):6092-6097.
154. Epping MT, Bernards R: **A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**(22):10639-10642.
155. Beard RE, Abate-Daga D, Rosati SF, Zheng Z, Wunderlich JR, Rosenberg SA, Morgan RA: **Gene expression profiling using nanostring digital RNA counting to identify potential target antigens for melanoma immunotherapy.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(18):4941-4950.
156. Bankovic J, Stojsic J, Jovanovic D, Andjelkovic T, Milinkovic V, Ruzdijic S, Tanic N: **Identification of genes associated with non-small-cell lung cancer promotion and progression.** *Lung Cancer* 2010, **67**(2):151-159.
157. Pan SH, Su KY, Spiessens B, Kusuma N, Delahaye NF, Gruselle O, Myo A, de Creus A, Louahed J, Chang GC *et al*: **Gene expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens and EGFR**

- mutational status in Taiwanese non-small cell lung cancer patients. *Asia Pac J Clin Oncol* 2017, **13**(5):e212-e223.**
158. Doolan P, Clynes M, Kennedy S, Mehta JP, Crown J, O'Driscoll L: **Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **109**(2):359-365.
159. Neumann E, Engelsberg A, Decker J, Storkel S, Jaeger E, Huber C, Seliger B: **Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies?** *Cancer Res* 1998, **58**(18):4090-4095.
160. Adib TR, Henderson S, Perrett C, Hewitt D, Bourmpoulia D, Ledermann J, Boshoff C: **Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays.** *Br J Cancer* 2004, **90**(3):686-692.
161. Zhang W, Barger CJ, Eng KH, Klinkebiel D, Link PA, Omilian A, Bshara W, Odunsi K, Karpf AR: **PRAME expression and promoter hypomethylation in epithelial ovarian cancer.** *Oncotarget* 2016, **7**(29):45352-45369.
162. Kreuzinger C, von der Decken I, Wolf A, Gamperl M, Koller J, Karacs J, Pfaffinger S, Bartl T, Reinthaller A, Grimm C *et al*: **Patient-derived cell line models revealed therapeutic targets and molecular mechanisms underlying disease progression of high grade serous ovarian cancer.** *Cancer Lett* 2019, **459**:1-12.
163. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M: **The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(13):4307-4313.
164. Roszik J, Wang WL, Livingston JA, Roland CL, Ravi V, Yee C, Hwu P, Futreal A, Lazar AJ, Patel SR *et al*: **Overexpressed PRAME is a potential immunotherapy target in sarcoma subtypes.** *Clin Sarcoma Res* 2017, **7**:11.
165. Luk SJ, van der Steen DM, Hagedoorn RS, Jordanova ES, Schilham MW, Bovee JV, Cleven AH, Falkenburg JF, Szuhai K, Heemskerk MH: **PRAME and HLA Class I expression patterns make synovial sarcoma a suitable target for PRAME specific T-cell receptor gene therapy.** *Oncoimmunology* 2018, **7**(12):e1507600.
166. Pellat-Deceunynck C, Mellerin MP, Labarriere N, Jegou G, Moreau-Aubry A, Harousseau JL, Jotereau F, Bataille R: **The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells.** *Eur J Immunol* 2000, **30**(3):803-809.
167. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, Dohner H, Schmitt M: **mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies.** *Int J Cancer* 2004, **108**(5):704-711.
168. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, Dohner H, Schlenk RF, Pollack JR, Dohner H *et al*: **Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches.** *Blood* 2006, **108**(13):4109-4117.
169. Ding K, Wang XM, Fu R, Ruan EB, Liu H, Shao ZH: **PRAME Gene Expression in Acute Leukemia and Its Clinical Significance.** *Cancer Biol Med* 2012, **9**(1):73-76.
170. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL *et al*: **Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(8):2794-2799.
171. De Carvalho DD, Binato R, Pereira WO, Leroy JM, Colassanti MD, Proto-Siqueira R, Bueno-Da-Silva AE, Zago MA, Zanichelli MA, Abdelhay E *et al*: **BCR-ABL-mediated upregulation of PRAME is responsible for knocking down TRAIL in CML patients.** *Oncogene* 2011, **30**(2):223-233.
172. Willenbrock K, Kuppers R, Renne C, Brune V, Eckerle S, Weidmann E, Brauninger A, Hansmann ML: **Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma.** *Haematologica* 2006, **91**(5):596-604.

173. Kawano R, Karube K, Kikuchi M, Takeshita M, Tamura K, Uike N, Eto T, Ohshima K, Suzumiya J: **Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *J Clin Exp Hematop* 2009, **49**(1):1-7.
174. Staeger MS, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Korholz C, Foll J, Korholz D: **Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs.** *Exp Hematol* 2008, **36**(7):886-896.
175. Ercolak V, Paydas S, Bagir E, Ergin M, Seydaoglu G, Celik H, Yavu B, Tanriverdi K, Gunaldi M, Afsar CU *et al*: **PRAME Expression and Its Clinical Relevance in Hodgkin's Lymphoma.** *Acta Haematol* 2015, **134**(4):199-207.
176. Scheffler AC, Koca E, Bernicker EH, Correa ZM: **Relationship between clinical features, GEP class, and PRAME expression in uveal melanoma.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2019, **257**(7):1541-1545.
177. Field MG, Durante MA, Decatur CL, Tarlan B, Oelschlager KM, Stone JF, Kuznetsov J, Bowcock AM, Kurtenbach S, Harbour JW: **Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas.** *Oncotarget* 2016, **7**(37):59209-59219.
178. Cai L, Paez-Escamilla M, Walter SD, Tarlan B, Decatur CL, Perez BM, Harbour JW: **Gene Expression Profiling and PRAME Status Versus Tumor-Node-Metastasis Staging for Prognostication in Uveal Melanoma.** *Am J Ophthalmol* 2018, **195**:154-160.
179. Szczepanski MJ, DeLeo AB, Luczak M, Molinska-Glura M, Misiak J, Szarzynska B, Dworacki G, Zagor M, Rozwadowska N, Kurpisz M *et al*: **PRAME expression in head and neck cancer correlates with markers of poor prognosis and might help in selecting candidates for retinoid chemoprevention in pre-malignant lesions.** *Oral Oncol* 2013, **49**(2):144-151.
180. Szczepanski MJ, Whiteside TL: **Elevated PRAME expression: what does this mean for treatment of head and neck squamous cell carcinoma?** *Biomark Med* 2013, **7**(4):575-578.
181. Iura K, Kohashi K, Hotokebuchi Y, Ishii T, Maekawa A, Yamada Y, Yamamoto H, Iwamoto Y, Oda Y: **Cancer-testis antigens PRAME and NY-ESO-1 correlate with tumour grade and poor prognosis in myxoid liposarcoma.** *J Pathol Clin Res* 2015, **1**(3):144-159.
182. Hemminger JA, Toland AE, Scharschmidt TJ, Mayerson JL, Guttridge DC, Iwenofu OH: **Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma.** *Mod Pathol* 2014, **27**(9):1238-1245.
183. Tian W, Li Y, Zhang J, Li J, Gao J: **Combined analysis of DNA methylation and gene expression profiles of osteosarcoma identified several prognosis signatures.** *Gene* 2018, **650**:7-14.
184. Tan P, Zou C, Yong B, Han J, Zhang L, Su Q, Yin J, Wang J, Huang G, Peng T *et al*: **Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **419**(4):801-808.
185. Zou C, Shen J, Tang Q, Yang Z, Yin J, Li Z, Xie X, Huang G, Lev D, Wang J: **Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis.** *Cancer* 2012, **118**(7):1845-1855.
186. Epping MT, Hart AA, Glas AM, Krijgsman O, Bernards R: **PRAME expression and clinical outcome of breast cancer.** *Br J Cancer* 2008, **99**(3):398-403.
187. Sun Y, Goodison S, Li J, Liu L, Farmerie W: **Improved breast cancer prognosis through the combination of clinical and genetic markers.** *Bioinformatics* 2007, **23**(1):30-37.
188. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Claesson I, Fallenius G, Sundfeldt K, Horvath G: **Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas.** *Int J Cancer* 2008, **123**(9):2130-2137.
189. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Horvath G: **Expression analysis of stage III serous ovarian adenocarcinoma distinguishes a sub-group of survivors.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(16):2846-2854.

190. Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B: **Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia.** *Cancer Genet Cytogenet* 2002, **133**(2):118-123.
191. Steinbach D, Pfaffendorf N, Wittig S, Gruhn B: **PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia.** *Cancer Genet Cytogenet* 2007, **177**(1):51-54.
192. Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Ramos F, Bernal T, Queizan JA, Penarrubia MJ *et al*: **The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia.** *Haematologica* 2008, **93**(12):1797-1805.
193. Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Perez C, Caballero MD, Ramos F, de Coca AG, Alonso JM, Giraldo P, Bernal T *et al*: **Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *Blood* 2009, **114**(1):148-152.
194. Abdelmalak CA, Yahya RS, Elghannam DM, El-Khadragy AE, Abd El Messih HM: **PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact on prognosis.** *Clin Lab* 2014, **60**(1):55-61.
195. Zhang YH, Lu AD, Yang L, Li LD, Chen WM, Long LY, Zhang LP, Qin YZ: **PRAME overexpression predicted good outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia patients receiving chemotherapy.** *Leuk Res* 2017, **52**:43-49.
196. Chang AY, Dao T, Gejman RS, Jarvis CA, Scott A, Dubrovsky L, Mathias MD, Korontsvit T, Zakhaleva V, Curcio M *et al*: **A therapeutic T cell receptor mimic antibody targets tumor-associated PRAME peptide/HLA-I antigens.** *J Clin Invest* 2017, **127**(7):2705-2718.
197. Mathias MD, Sockolosky JT, Chang AY, Tan KS, Liu C, Garcia KC, Scheinberg DA: **CD47 blockade enhances therapeutic activity of TCR mimic antibodies to ultra-low density cancer epitopes.** *Leukemia* 2017, **31**(10):2254-2257.
198. Rezvani K, Yong AS, Tawab A, Jafarpour B, Eniafe R, Mielke S, Savani BN, Keyvanfar K, Li Y, Kurlander R *et al*: **Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia.** *Blood* 2009, **113**(10):2245-2255.
199. Gutzmer R, Rivoltini L, Levchenko E, Testori A, Utikal J, Ascierto PA, Demidov L, Grob JJ, Ridolfi R, Schadendorf D *et al*: **Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study.** *ESMO Open* 2016, **1**(4):e000068.
200. Pujol JL, De Pas T, Rittmeyer A, Vallieres E, Kubisa B, Levchenko E, Wiesemann S, Masters GA, Shen R, Tjulandin SA *et al*: **Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapeutic in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study.** *J Thorac Oncol* 2016, **11**(12):2208-2217.
201. De Pas T, Giovannini M, Rescigno M, Catania C, Toffalorio F, Spitaleri G, Delmonte A, Barberis M, Spaggiari L, Solli P *et al*: **Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2012, **83**(3):432-443.
202. Pollack SM, Li Y, Blaisdell MJ, Farrar EA, Chou J, Hoch BL, Loggers ET, Rodler E, Eary JF, Conrad EU, 3rd *et al*: **NYESO-1/LAGE-1s and PRAME are targets for antigen specific T cells in chondrosarcoma following treatment with 5-Aza-2-deoxycytidine.** *PLoS One* 2012, **7**(2):e32165.
203. Weber JS, Vogelzang NJ, Ernstoff MS, Goodman OB, Cranmer LD, Marshall JL, Miles S, Rosario D, Diamond DC, Qiu Z *et al*: **A phase 1 study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors.** *J Immunother* 2011, **34**(7):556-567.
204. Quintarelli C, Dotti G, Hasan ST, De Angelis B, Hoyos V, Errichiello S, Mims M, Luciano L, Shafer J, Leen AM *et al*: **High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells.** *Blood* 2011, **117**(12):3353-3362.

205. Kawahara M, Hori T, Matsubara Y, Okawa K, Uchiyama T: **Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis.** *Exp Hematol* 2006, **34**(11):1496-1504.
206. Li L, Reinhardt P, Schmitt A, Barth TF, Greiner J, Ringhoffer M, Dohner H, Wiesneth M, Schmitt M: **Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens.** *Cancer Immunol Immunother* 2005, **54**(7):685-693.
207. Xu B, Jungbluth AA, Frosina D, Alzumaili B, Aleynick N, Slodkowska E, Higgins K, Ho A, Morris L, Ghossein R *et al*: **The immune microenvironment and expression of PD-L1, PD-1, PRAME and MHC I in salivary duct carcinoma.** *Histopathology* 2019, **75**(5):672-682.
208. Baba H, Kanda M, Sawaki K, Shimizu D, Umeda S, Koike M, Kodera Y, Fujii T: **PRAME Expression as a Potential Biomarker for Hematogenous Recurrence of Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** *Anticancer Res* 2019, **39**(11):5943-5951.
209. Togashi Y, Masago K, Kubo T, Sakamori Y, Kim YH, Hatachi Y, Fukuhara A, Mio T, Togashi K, Mishima M: **Association of diffuse, random pulmonary metastases, including miliary metastases, with epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma.** *Cancer* 2011, **117**(4):819-825.
210. Zhang L, Zhang T, Deng Z, Sun L: **MicroRNA3653 inhibits the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting ITGB1.** *Oncol Rep* 2019, **41**(3):1669-1677.
211. Li C, Cai S, Wang X, Jiang Z: **Hypomethylation-associated up-regulation of TCF3 expression and recurrence in stage II and III colorectal cancer.** *PLoS One* 2014, **9**(11):e112005.

VII. ANNEXES**Annexe 1 : Les échantillons des 8 patientes.**

Patientes	1	2	3	4	5	6	7	8
Cancer des seins	F	F/C	F	F	F	F	F	F
Cancer de la thyroïde	F	F	F	F	F	F	F	F
Tumeur du rein		F						
ADN constitutionnel		C						

PBMC: peripheral blood mononuclear cells, F: fixé en formol, C : congelé

Annexe 2 : Les évènements d'altérations du nombre de copies identifiées dans les cancers du sein, de la thyroïde et du rein du Madame S utilisant OncoScan™.

Chr	Cytobande	Tumor de la thyroïd		Left breast tumor events		Kidney tumor events	
		Positions	Type	Positions	Type	Positions	Type
1	p36.33 - p11.2			754 192-121 350 934	LOH	754 192-121 350 934	LOH
	p25.3			21 494-90 245 035	LOH	21 494-18 098 857	CN Loss
2	p25.3			21 494-96 675 166	CN Loss		
	q11.1			95 429 197-204 545 178	LOH	95 429 197-221 705 657	LOH
3	p26.3			63 411-10 080 722	LOH	63 411-55 760 165	LOH
	p16.3			69 404-45 646 269	CN Gain	69 404-42 499 224	CN Gain
4	q21.23 - q22.1	86 482 894-89 165 405	LOH	84 496 344-90 776 165	LOH	86 482 894-91 362 047	LOH
	q11.1			61 886 393-111 907 146	LOH	61 886 393-152 313 718	LOH
6	q27			156 871 821- 170 913 051	LOH	155 774 958- 170 913 051	LOH
	q27					169 051 020- 170 913 051	CN Loss
7	q31.1 - q36.3			109 240 787-159 118 443	LOH	109 317 908-159 118 443	LOH
8	p23.1			8 094 763-43 751 375	LOH	8 094 763-17 407 403	LOH
	p15.3			126 070-39 146 676	LOH	126 070-4 460 049	LOH
10	q11.21			42 413 322-50 217 438	LOH	42 413 322-54 526 206	LOH
	p15.5			192 764-51 575 951	LOH	192 764-25 119 007	CN Loss
11	q11 - q25			54 795 357-134 938 847	LOH	54 795 357-134 938 847	LOH
	q11			19 084 823-28 978 448	CN Loss	19 084 823-75 586 993	CN Loss
13	q11 - q34			19 084 823-115 103 150	LOH	19 084 823-115 103 150	LOH

Diaddin HAMDAN - Thèse de doctorat - 2021

14	q11.2	20 219 083-58 389 230	CN Loss	20 219 083-23 200 951	LOH
	q11.2	20 219 083-58 389 230	LOH	20 219 083-23 459 156	CN Loss
15	q11.1	20 161 372-26 187 841	CN Gain	20 161 372-38 323 263	CN Gain
17	p13.3 - p11.1	400 959-22 217 883	LOH	400 959-22 217 883	LOH
	q11.1 - q25.3	25 326 941-80 263 427	LOH	25 326 941-44 958 022	LOH
	p11.32 - p11.21	12 842-15 377 471	LOH	12 842-15 377 471	LOH
18	p11.32 - q12.1	12 842-29 364 889	CN Loss	12 842-29 736 017	CN Loss
	q11.1 - q12.1	18 554 307-30 225 065	LOH	18 554 307-30 856 949	LOH
20	p13 - p12.1	69 094-14 627 662	CN Gain	69 094-14 030 903	CN Gain
	q11.1	16 054 713-41 574 383	LOH	16 054 713-24 341 388	CN Loss
22	q11.1 - q13.33	16 054 713-51 213 826	LOH	16 054 713-51 213 826	LOH
	q11.23	24 346 428-24 396 598	High Copy Gain	24 346 428-24 398 768	High Copy Gain
X	q28	154 979 673-155 219 364	CN Gain	154 979 673-155 219 364	CN Gain

LOH: loss of heterozygosity, CN: copy number

VIII. Publication

1. Hamdan D, Janin A, Bousquet G. Commentary: A systemic digestive allergic reaction imputable to docetaxel in a breast cancer patient. *Journal of cancer treatment and diagnosis*, 2017
2. Hamdan D, Janin A, Bousquet G. A novel way to manage trastuzumab cardiotoxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2018 – IF: 2,737
3. Hamdan D, Nguyen TT, Dao VT, El Bouchtaoui M, Janin A, Bousquet G. Génomique du cancer du sein appliquée aux traitements. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2018
4. Hamdan D, Nunes T, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Thi Thuy Nguyen TT, Meles S, Angeli E, Ratajczak P, Lu H, Di Benedetto M, Bousquet G, Janin A. Targeting cancer stem cells to overcome chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019 – IF: 3,687
5. Hamdan D, Leboeuf C, Le Foll C, Bousquet G, Janin A. Re-exploring immune-related side effects of docetaxel in an observational study: blood hypereosinophilia. *Cancer Medicine*, 2019 – IF: 3,202
6. Hamdan D, Nguyen TT, Leboeuf C, Meles S, Janin A, Bousquet G. Genomics applied to the treatment of breast cancers. *Oncotarget*, 2019 – IF: 6,627
7. Dao T, Gapihan G, Leboeuf C, Hamdan D, Feugeas J-P, Tran T, Monnot C, Germain S, Janin A, Bousquet G. Expression of Angiopoietin-like 4 Fibrinogen-Like Domain (cANGPTL4) increases risk of brain metastases in women with breast cancer. *Oncotarget*, 2020 – IF: 6,627
8. Hamdan D, Gapihan G, El Bouchtaoui M, Li W, Janin A, Bousquet G, Leboeuf C. Unicellular selection of living cells in liquid medium using laser microdissection and pressure catapulting system. En cours de soumission, *Journal of Visualized Experiments* – IF: 1,232
9. Hamdan D, Pamoukdjian F, Bertheau B, Bousquet G. Socioeconomic inequalities and success rate in a MOOC. En cours de soumission, *Medical Education* – IF: 4,619