

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2016

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

Béregère PONROY
Née le 30 Août 1984 à Châteauroux

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} juillet 2016

Intérêt de la recherche des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes: étude multicentrique de 116 chondrosarcomes et de 88 autres tumeurs primitives osseuses.

JURY

Président de Jury : Monsieur le Professeur Serge Guyétant

Membres du Jury : Monsieur le Professeur Gonzague de Pinieux

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Pagès

Monsieur le Professeur Philippe Rosset

Madame le Docteur Flore Tabareau-Delalande

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZE - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004
Professeur Dominique PERROTIN – 2004-2014

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Catherine BARTHELEMY
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Philippe BOUGNOUX
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Yvon LEBRANCHU
Professeur Elisabeth LECA
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Gérard LORETTE
Professeur Michel ROBERT
Professeur Alain ROBIER

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER
– P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B.
CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – G. GINIES – B.
GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J.
LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MAURAGE
– C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P.
RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE –
J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
	DUCLUZEAU Pierre-Henri	Médecine interne, nutrition
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	EHRMANN Stephan	Réanimation d'urgence
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
	HANKARD Régis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale

Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, gériatrie
MM.	HUTEN Noël.....	Chirurgie générale
	LABARTHE François.....	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
	LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
	LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
	LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie
	MACHET Laurent	Dermato-vénéréologie
	MAILLOT François	Médecine interne, gériatrie
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri.....	Gynécologie-obstétrique
Mme	MARUANI Annabel.....	Dermatologie-vénéréologie
MM.	MEREGHETTI Laurent.....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
Mme	MOUSSATA Driffa.....	Gastro-entérologie
MM.	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
	PAGES Jean-Christophe.....	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric.....	Biophysique et médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique.....	Réanimation médical, médecine d'urgence
	PERROTIN Franck.....	Gynécologie-obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
	ROINGEARD Philippe.....	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria.....	Biophysique et médecine nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre.....	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick.....	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc.....	Dermato-vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
	WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M. LEBEAU Jean-Pierre
Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.....MALLET Donatien Soins palliatifs

POTIER Alain Médecine Générale
ROBERT Jean..... Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ANGOULVANT Théodora Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
M. BAKHOS David Physiologie
Mme BERNARD-BRUNET Anne Cardiologie
M. BERTRAND Philippe..... Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
Mmes BLANCHARD Emmanuelle Biologie cellulaire
BLASCO Hélène Biochimie et biologie moléculaire
M. BOISSINOT Éric..... Physiologie
Mme CAILLE Agnès..... Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
M. DESOUBEUX Guillaume Parasitologie et mycologie
Mmes DOMELIER Anne-Sophie..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane..... Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie . Anatomie et cytologie pathologiques
M. GATAULT Philippe Néphrologie
Mmes GAUDY-GRAFFIN Catherine Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUILLEUX Valérie..... Immunologie
GUILLON-GRAMMATICO Leslie Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MM. HOARAU Cyrille Immunologie
HOURIOUX Christophe..... Biologie cellulaire
Mmes LARTIGUE Marie-Frédérique Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
LE GUELLEC Chantal..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine..... Anatomie et cytologie pathologiques
MM. PIVER Eric..... Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme Biophysique et médecine nucléaire
PLANTIER Laurent..... Physiologie
Mme SAINT-MARTIN Pauline..... Médecine légale et droit de la santé
MM. SAMIMI Mahtab..... Dermatologie-vénérologie
TERNANT David Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes AGUILLON-HERNANDEZ Nadia Neurosciences
ESNARD Annick Biologie cellulaire
M. LEMOINE Maël Philosophie
Mme MONJAUZE Cécile..... Sciences du langage - orthophonie
M. PATIENT Romuald..... Biologie cellulaire
Mme RENOUX-JACQUET Cécile Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. IVANES Fabrice Cardiologie

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M. BOUAKAZ Ayache Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes BRUNEAU Nicole Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
CHALON Sylvie Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM. CHARBONNEAU Michel Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
COURTY Yves Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
GAUDRAY Patrick Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
GILOT Philippe Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GUILLEUX Fabrice Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes GOMOT Marie Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
GRANDIN Nathalie Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
HEUZE-VOURCH Nathalie Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM. KORKMAZ Brice Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
LE PAPE Alain Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme MARTINEAU Joëlle Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM. MAZURIER Frédéric Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
MEUNIER Jean-Christophe Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
RAOUL William Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme RIO Pascale Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M. SI TAHAR Mustapha Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme DELORE Claire Orthophoniste
MM. GOUIN Jean-Marie Praticien Hospitalier
MONDON Karl Praticien Hospitalier
Mme PERRIER Danièle Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme LALA Emmanuelle Praticien Hospitalier
M. MAJZOUB Samuel Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme BIRMELE Béatrice Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE



En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

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

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

A Monsieur le Professeur de Pinieux, merci de m'avoir proposé ce travail et d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci de l'aide que vous m'avez apportée dans son élaboration. J'ai apprécié découvrir l'univers complexe de la pathologie osseuse et des tissus mous à vos côtés, toujours dans le calme et la bonne humeur. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Guyétant, vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail. Merci pour votre accueil dans cette belle spécialité qu'est l'anatomie et cytologie pathologiques et merci pour le soutien que vous m'avez apporté. Veuillez trouver ici l'expression de mon sincère respect.

A Monsieur le Professeur Pagès, merci d'avoir accepté de juger mon travail. Merci de m'avoir accueillie dans votre service afin que je puisse apprendre les bases de la biologie moléculaire.

A Monsieur le Professeur Rosset, merci d'avoir accepté de juger mon travail et d'apporter ainsi votre expertise chirurgicale concernant la prise en charge des tumeurs osseuses.

A Madame le Docteur Tabareau-Delalande, merci d'avoir accepté de juger mon travail. Merci Flore des connaissances que tu m'as transmises. Ton enthousiasme pour l'anapath a été décisif dans mon choix de vous rejoindre.

A Madame le Docteur Collin, merci beaucoup de ton aide, du temps que tu as consacré à m'apprendre les bases de la biologie moléculaire, de ta participation active et déterminante dans la réalisation de ce travail. J'aurais aimé que tu fasses partie de ce jury.

A Mesdames les Docteurs Fromont, Arbion, Bergemer-Fouquet, Rousselot-Denis, Rogez, Machet, Orain, Dujardin, de Muret, je vous remercie sincèrement de tout ce que vous m'avez appris au cours de mon internat.

A Madame le Docteur Barbey, merci beaucoup Cendra, non seulement pour le temps passé à me former, mais aussi pour ta gentillesse et ton écoute.

A Monsieur le Docteur Dée, merci de m'avoir initiée à l'anapath. Merci pour votre disponibilité et votre bienveillance. Ce premier stage passé à vos côtés m'a convaincue dans le choix de cette spécialité.

A Monsieur le Docteur Kerdraon, merci Rémy du temps que tu as consacré à ma formation, de ta bonne humeur et de ta gentillesse.

A tous les membres des équipes des laboratoires d'anapath de Trousseau et de Bretonneau, merci à toutes et à tous pour votre agréable compagnie, que ce soit en « macro » ou au café! Certaines d'entre vous ont été également mises à contribution sur le plan personnel, je vous remercie profondément du soutien que vous m'avez apporté.

Aux technicien(ne)s de biologie moléculaire, merci beaucoup pour votre contribution indispensable dans la réalisation de ce travail.

A mes co-internes d'anapath ou d'autres spécialités, ainsi qu'à celles devenues jeunes chefs aujourd'hui, je garderai un très bon souvenir des moments passés avec chacun de vous. Un grand merci tout particulier à l'écoute que certaines m'ont apportée.

A mes amis, que ce soit ceux restés à Tours ou dans le Berry, ceux partis explorés d'autres horizons plus ou moins loin, ce que je partage avec chacun de vous est précieux et est un moteur pour avancer dans la vie.

A mes parents, ma sœur, mes frères, mes neveux et ma grand-mère, merci pour votre soutien constant, votre amour infaillible. Sans vous, je n'en serai pas là.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	13
Résumé	14
Abstract	16
I. Introduction	18
I.1. Chondrosarcomes-Généralités.....	18
I.1.1. Chondrosarcomes conventionnels centraux.....	18
I.1.2. Chondrosarcomes centraux dédifférenciés.....	21
I.1.3. Chondrosarcomes de surface.....	21
I.1.4. Prise en charge thérapeutique des chondrosarcomes.....	22
I.2. Diagnostics différentiels-Problématique.....	22
I.2.1. Chondrosarcomes dédifférenciés versus sarcomes indifférenciés primitifs osseux.....	22
I.2.2. Chondrosarcomes dédifférenciés versus ostéosarcomes centraux de haut grade.....	23
I.2.3. Chondrosarcomes centraux de haut grade versus ostéosarcomes chondroblastiques.....	23
I.2.4. Chondrosarcomes centraux versus chordomes.....	26
I.2.5. Chondrosarcomes périostés versus ostéosarcomes périostés.....	26
I.2.6. Chondrosarcomes versus tumeurs bénignes et pseudo-tumeurs osseuses.....	26
I.3. Biologie moléculaire des chondrosarcomes: les mutations des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	27
I.3.1. Histoire de la découverte de la mutation des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> dans les chondrosarcomes.....	27
I.3.2. Physiopathologie des gènes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	28
a) Fonctions normales des enzymes <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	28
b) Fonctions des mutants <i>IDH1/2</i> et oncogenèse.....	28
I.3.3. Types de mutations d' <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	30
I.3.4. Diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade versus ostéosarcomes chondroblastiques par les mutations d' <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	30
I.4. Objectifs.....	30
II. Méthodes moléculaires de recherche des mutations des gènes <i>IDH1/2</i> utilisées dans notre étude	32
II.1. Pyroséquençage.....	35
II.2. Séquençage direct.....	37
III. Article	37
1- Introduction.....	37
2- Matériels et méthodes.....	38
2.1- Sélection des patients et caractéristiques.....	38
2.2- Analyse moléculaire.....	38
2.2.1- Extraction de l'ADN.....	38
2.2.2- Pyroséquençage.....	41
2.2.3- Amplification par PCR et séquençage direct.....	41

2.2.4- Analyse statistique.....	42
3- Résultats.....	42
3.1- Données clinico-pathologiques.....	42
3.1.1- Patients atteints de chondrosarcomes.....	42
3.1.2- Patients atteints d'autres tumeurs osseuses.....	43
3.2- Analyse mutationnelle.....	43
3.2.1- Patients atteints de chondrosarcomes.....	43
3.2.2- Patients atteints d'autres tumeurs osseuses.....	46
4- Discussion.....	51
IV. Conclusion.....	55
V. Références.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Chondrosarcome dédifférencié.....	20
Figure 2. Composante dédifférenciée d'un chondrosarcome et sarcome indifférencié primitif osseux de haut grade.....	24
Figure 3. Chondrosarcome conventionnel central de haut grade et ostéosarcome chondroblastique.....	25
Figure 4. Effets cellulaires et moléculaires des mutants <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	29
Figure 5. Principes du pyroséquençage.....	31
Figure 6. Pyrogrammes <i>IDH1</i>	32
Figure 7. Pyrogrammes <i>IDH2</i>	33
Figure 8. Principes du séquençage direct Sanger.....	34
Figure 9. Electrophorégrammes <i>IDH1</i>	35
Figure 10. Chondrosarcome secondaire à un enchondrome.....	38
Figure 11. Electrophorégramme avec hétérogénéité mutationnelle d' <i>IDH1</i> R132C + R132L.....	46
Figure 12. Chondrosarcome dédifférencié présentant une hétérogénéité morphologique et mutationnelle.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Chondrosarcomes: incidences et grade de O'Neal et Ackerman.....	19
Tableau 2. Classification de O'Neal et Ackerman.....	20
Tableau 3. Chondrosarcomes: survie et traitement.....	21
Tableau 4. Amorces de PCR spécifiques d'allèles utilisées pour la détection des mutations d' <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	40
Tableau 5. Données clinico-pathologiques et statuts mutationnels <i>IDH1/2</i> chez les patients atteints de chondrosarcomes.....	43
Tableau 6. Comparaison des données cliniques chez les patients atteints de chondrosarcomes selon le statut mutationnel pour <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> (parmi les chondrosarcomes centraux de bas et haut grades, dédifférenciés et périostés).....	49

Abréviations

ADN : acide désoxiribonucléique
 α CG : alpha-céto-glutarate
D-2HG : delta-2-hydroxyglutarate
dNTP : désoxyribonucléotide
ddNTP : didésoxyribonucléotide
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
EGLN : egg-laying defective nine
HIF1 α : hypoxia-inducible factor (1 α)
HPS : hématoxyline phloxine safran
IDH : isocitrate déshydrogénase
JHDM : jumanji domain-containing histone demethylase
LAM : leucémie aiguë myéloblastique
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : forme réduite du NADP
PCR : polymerase chain reaction
TET2 : ten-eleven translocation

Intérêt de la recherche des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes: étude multicentrique de 116 chondrosarcomes et de 88 autres tumeurs primitives osseuses.

Résumé

Introduction. Les chondrosarcomes centraux représentent environ 20% des tumeurs primitives osseuses malignes. Ils posent différents problèmes diagnostiques au pathologiste en fonction de leur grade histologique (classification de O'Neal et Ackerman). Les chondrosarcomes de grade 1 peuvent être difficiles à différencier d'un enchondrome, les chondrosarcomes de grades 2 et 3 d'un ostéosarcome chondroblastique. Le diagnostic différentiel entre la composante dédifférenciée d'un chondrosarcome et un sarcome indifférencié primitif osseux ou un ostéosarcome de haut grade peut également s'avérer difficile, surtout s'agissant de micro-biopsies. Il est important de distinguer ces différentes entités puisque leur pronostic et leur traitement diffèrent.

Des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* ont récemment été décrites dans les tumeurs cartilagineuses conventionnelles centro-médullaires et périostées. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt de rechercher ces mutations dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes.

Matériels et méthodes. Cette étude a consisté en la recherche des mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* dans 116 chondrosarcomes et 88 autres tumeurs primitives osseuses, vus au sein du réseau d'expertise des sarcomes osseux GFPO/RESOS entre 2005 et 2015.

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons tumoraux fixés et inclus en paraffine ou cryopréservés, puis analysé par pyroséquençage après amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). Des échantillons tumoraux mutés ont été également analysés par séquençage Sanger, technique de référence. La recherche de mutations par substitution portait sur l'exon 4 du gène *IDH1* codon R132 et sur l'exon 4 du gène *IDH2* codon R172.

Résultats. La quantité et/ou qualité de l'ADN extrait a permis l'étude de 90 (78%) des chondrosarcomes : 11 chondrosarcomes centraux de grade 1, 29 chondrosarcomes centraux de haut grade (grades 2 et 3), 34 chondrosarcomes dédifférenciés, 4 chondrosarcomes périostés, 2 chondrosarcomes conventionnels périphériques et 10 chondrosarcomes de variantes rares, ainsi que de 83 (94%) autres tumeurs primitive osseuses : 16 sarcomes indifférenciés primitifs osseux, 39 ostéosarcomes (dont 13 ostéosarcomes chondroblastiques), un chordome et 27 tumeurs osseuses bénignes (dont 13 chondromes). 43 % (17/40) des chondrosarcomes conventionnels centraux étaient mutés, avec 100% de mutations sur *IDH1* et une prédominance de R132G (n=7) et R132C (n=6). 47% (16/34) des chondrosarcomes dédifférenciés étaient mutés, avec 41% de mutations sur *IDH2*. Un chondrosarcome périosté sur les 4 testés était muté. Les autres sous-types de chondrosarcomes n'étaient pas mutés. Aucun autre sarcome primitif osseux n'était muté, en particulier aucun ostéosarcome chondroblastique, ni aucun sarcome indifférencié. Parmi les tumeurs bénignes, seuls les chondromes étaient mutés (7/13, 54%).

Conclusion. Parmi les tumeurs primitives osseuses malignes, les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* semblent constituer des marqueurs spécifiques mais de faible sensibilité des chondrosarcomes. En pratique, la recherche de ces mutations peut constituer une aide dans le diagnostic différentiel entre les chondrosarcomes centraux conventionnels et dédifférenciés et les autres sarcomes osseux, ostéosarcomes chondroblastiques et sarcomes indifférenciés en particulier.

Mots clés :

- mutations d'IDH1 et IDH2
- chondrosarcome
- ostéosarcome chondroblastique
- sarcome indifférencié primitif osseux
- hétérogénéité mutationnelle

Interest of the evaluation of *IDH1* and *IDH2* genes mutation status in the differential diagnosis of chondrosarcomas: multicenter study of 116 chondrosarcomas and 88 others primary bone tumors.

Abstract

Introduction. Central chondrosarcoma accounts for about 20% of malignant bone tumours. The differential diagnosis between a high-grade central chondrosarcoma (grade 2-3, O'Neal & Ackerman grading) and a chondroblastic osteosarcoma or between the dedifferentiated component of a chondrosarcoma and an undifferentiated primitive bone sarcoma or a high-grade osteosarcoma, may be difficult, especially on fine needle biopsies. It is important to distinguish these different entities since their prognosis and treatment differ. *IDH1* and *IDH2* genes mutations have recently been shown to be involved in the tumorigenesis of intramedullary and periosteal conventional cartilaginous tumors. The aim of this study was to evaluate the value of investigating these mutations in the differential diagnosis of chondrosarcomas.

Materials and methods. This multicenter study consisted in the search of *IDH1* and *IDH2* mutations in 116 chondrosarcomas and 88 others primary bone tumors, registered in the GFPO/RESOS database between 2005 and 2015. Genomic DNA was extracted from formaldehyde fixed paraffin embedded or cryopreserved tumor samples. The DNA was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) and then analyzed by pyrosequencing. Some mutated tumor samples were also analyzed by Sanger sequencing, reference technique. The research focused on substitution mutations of *IDH1* exon 4 codon R132 and of *IDH2* exon 4 codon R172.

Results. The quantity and/or quality of DNA extracted allowed the study of 90 (78%) chondrosarcomas: 11 grade 1 central chondrosarcomas, 29 high-grade central chondrosarcomas (grade 2-3), 34 dedifferentiated chondrosarcomas, 4 periosteal chondrosarcomas, 2 peripheral chondrosarcomas and 10 rare variants of chondrosarcoma, and of 83 (94%) others primitive bone tumors: 16 undifferentiated primitive bone sarcomas, 39 osteosarcomas (13 chondroblastic osteosarcomas), one chordoma and 27 benign bone tumors (including 13 chondromas). 43% (17/40) of the conventional central chondrosarcomas were mutated, with 100% of mutations found in *IDH1* and a predominance of R132G (n = 7) and R132C (n = 6). 47% (16/34) of dedifferentiated chondrosarcomas were mutated, with 40% mutations concerning *IDH2*. One periosteal chondrosarcoma on 4 tested was mutated. All the other subtypes of chondrosarcomas were not mutated. No other primitive bone sarcoma was mutated, especially no chondroblastic osteosarcoma nor any undifferentiated sarcoma. Among benign tumors, only chondromas were mutated (7/13, 54%).

Conclusion. Among malignant primary bone tumors, mutations of *IDH1* and *IDH2* genes appear to be specific markers but of low sensitivity of chondrosarcomas. In practice, *IDH1* and *IDH2* genes mutations could be a helpful tool to distinguish central conventional and dedifferentiated chondrosarcomas from others primary bone sarcomas, chondroblastic high-grade osteosarcoma and undifferentiated bone primitive sarcoma particularly.

Key words :

- IDH1 and IDH2 mutations
- chondrosarcoma
- chondroblastic osteosarcoma
- undifferentiated bone primitive sarcoma
- mutational heterogeneity

I. Introduction

I.1. Chondrosarcomes-Généralités

Les chondrosarcomes ont été définis en 1943 par Lichtenstein et Jaffe.¹ Ce sont les 2^{èmes} tumeurs primitives osseuses malignes (15 à 20%) les plus fréquentes après les ostéosarcomes (hors myélome).² Ce sont surtout des tumeurs de l'adulte. Environ 50% des chondrosarcomes sont localisés au niveau du pelvis et du fémur proximal.^{3, 4, 5} Ils peuvent se développer sur os sain ou survenir sur une lésion osseuse préexistante (chondromes ou ostéochondromes, rarement sur maladie de Paget ou après radiothérapie). Ils peuvent être endo-médullaires ou se développer à la surface de l'os. Ils peuvent survenir dans le cadre des enchondromatoses (maladie d'Ollier et syndrome de Maffucci), où le risque de transformation maligne des enchondromes est augmenté (respectivement 40% et 53%).⁶ Il en existe différents sous-types histologiques (*Tableau 1*). Les chondrosarcomes sont classés en fonction de leur grade histologique (classification de O'Neal et Ackerman, *Tableau 2*).^{7, 8} Leur traitement est essentiellement chirurgical. Leur pronostic dépend surtout du grade et de la qualité de l'exérèse chirurgicale.

I.1.1. Chondrosarcomes conventionnels centraux

Ils représentent 85% des chondrosarcomes.⁹ Ils atteignent le plus souvent des adultes (surtout entre 50 ans et 70 ans) avec une préférence masculine et sont rares avant 20 ans (4%).^{3, 6, 10} Leurs principales localisations sont le pelvis, puis le fémur proximal, l'humérus proximal, le fémur distal et les côtes; mais tout os dérivant d'une ossification enchondrale peut être touché.⁹ Le squelette axial (massif cranio-facial, rachis et sacrum) est rarement atteint, de même que les petits os des mains et des pieds.⁹ Les fractures pathologiques sont rares (3%), elles surviennent surtout en cas de tumeur de haut grade.⁴

Histologiquement, les chondrosarcomes sont organisés en nappes ou en lobules de grande taille, de forme irrégulière. La matrice cartilagineuse héberge des chondrocytes tumoraux, dont la densité, souvent plus importante en périphérie des lobules, le nombre de binucléations et l'importance des atypies augmentent avec le grade de la tumeur. L'englobement au sein de la matrice cartilagineuse tumorale de fragments d'os lamellaire, témoignant de la résorption de l'os préexistant, constitue un argument fort de malignité. Il en est de même de la présence de remaniements myxoïdes étendus de la matrice tumorale.⁹

Le grade de O'Neal et Ackerman (*Tableau 2*) est le facteur pronostic principal.⁷ Il est prédictif de récidives locales, de métastases (surtout pulmonaires) et est corrélé à la survie (*Tableau 3*). Les chondrosarcomes de grade 1 ont une malignité locale. L'appellation « tumeur cartilagineuse atypique » a été introduite dans la classification OMS de 2013 pour les chondrosarcomes de grade 1 des os longs, qui peuvent bénéficier d'un traitement conservateur par curetage.⁹ La fréquence des métastases des chondrosarcomes de haut grade (grades 2 et 3) est de 20% à 33%.^{4, 5, 9, 11}

Tableau 1. *Chondrosarcomes: incidence et grade de O'Neal et Ackerman.*

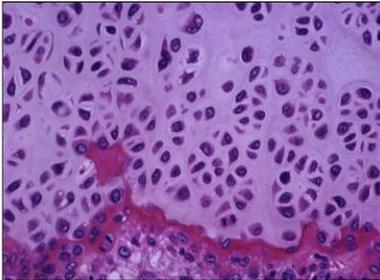
Type	Incidence (% de l'ensemble des chondrosarcomes)	Grade (O'Neal et Ackerman)
Chondrosarcomes conventionnels	85 %	Grade 1 à 3
Central (I ou II) (mutations <i>IDH1/2</i>)	85% (CS mains et pieds=3%)	Grade 1 (26 à 50%) Grade 2 (30-60%) Grade 3 (8 à 25%)
Périphérique (II) (mutations <i>EXT1/2</i>)	15%	
Chondrosarcome périosté (mutations <i>IDH1/2</i>)	2%	Grade 1 à 2
Chondrosarcomes (variantes rares)	13%	
Dédifférencié	6-10%	Grade 3
Mésenchymateux	2%	Grade 3
À cellules claires	1%	Grade 1 si pur Grade de la composante conventionnelle si plus élevé

G De Pinieux. Enseignement post-universitaire. Tumeurs cartilagineuses, 2015.

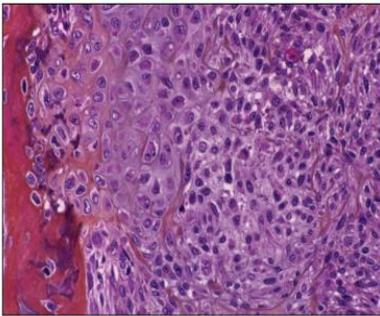
Tableau 2. *Classification de O'Neal et Ackerman.*



Grade 1: Tumeur cartilagineuse très bien différenciée posant le problème du diagnostic différentiel avec un chondrome. Cellularité légèrement accrue par rapport à celle des chondromes. Noyaux des chondrocytes très densifiés. Volumineuses calcifications. Remaniements myxoïdes réduits. Binucléations possibles. Absence d'activité mitotique.

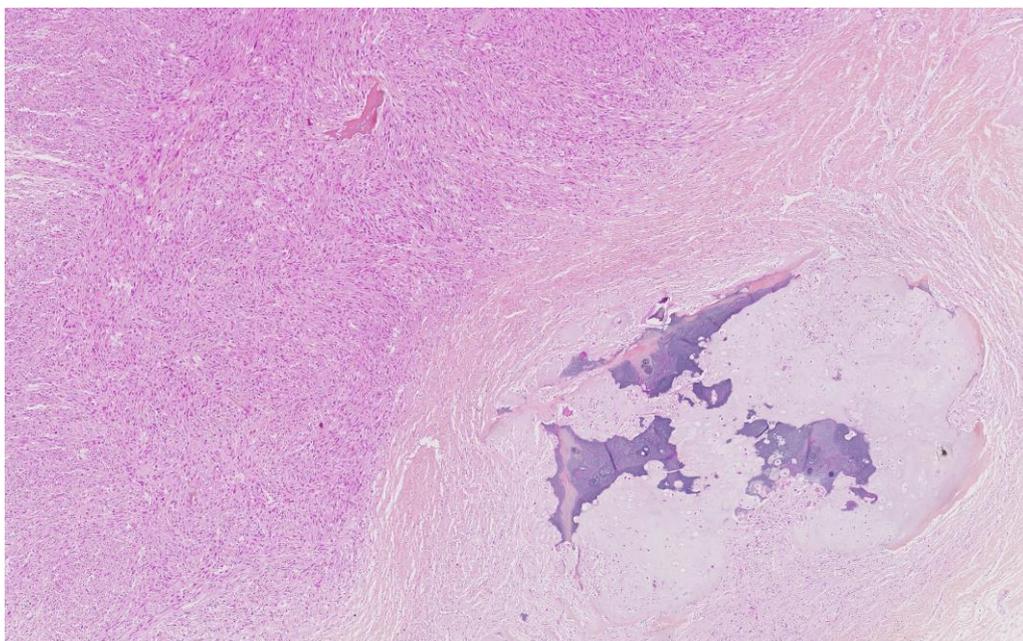


Grade 2: Tumeur manifestement de nature cartilagineuse et manifestement maligne. Densité cellulaire assez importante, en particulier à la périphérie des lobules. Noyaux volumineux et densifiés. Binucléations voire multi-nucléations fréquentes. Activité mitotique éventuellement décelable. Calcifications réduites. Présence de remaniements myxoïdes et nécrotiques.



Grade 3: Tumeur manifestement maligne dont la différenciation cartilagineuse est difficile à établir. Cellularité très importante. Cellules fusiformes parfois présentes. Pléomorphisme cytotologique. Calcifications rares ou absentes. Remaniements myxoïdes et nécrotiques marqués. Les chondrosarcomes dédifférenciés sont assimilés à ce grade.

Figure 1. *Chondrosarcome dédifférencié (HPS, X10)*



Composante cartilagineuse bien différenciée (à droite) et composante dédifférenciée de type sarcomateuse de haut grade (à gauche), accolées de façon abrupte

I.1.2. Chondrosarcomes centraux dédifférenciés

Les chondrosarcomes centraux peuvent au cours de leur évolution se dédifférencier (dans 10-15% des cas).^{2, 12, 13} Cela correspond à une progression de la maladie vers un sarcome de haut grade de malignité.

Les chondrosarcomes dédifférenciés touchent des sujets d'un âge médian de 59 ans.¹⁴ Leur localisation est superposable à celle des chondrosarcomes conventionnels centraux, avec une préférence pour la région pelvienne/partie haute du membre inférieur.⁹ Les fractures pathologiques sont plus fréquentes (13 à 25%) que pour les chondrosarcomes conventionnels.^{12, 15, 16}

L'aspect histologique est bimorphe avec l'association d'une composante cartilagineuse de bas grade et d'un sarcome de haut grade qui peut être indifférencié ou à différenciation hétérologue de haut grade (ostéosarcomateuse le plus souvent).^{2, 16} La transition entre les deux composantes tumorales est abrupte (*Figure 1*). Le pronostic des chondrosarcomes dédifférenciés est très péjoratif (*Tableau 3*). Les métastases sont très fréquentes (pulmonaires surtout mais aussi osseuses ou viscérales).^{12, 14, 17}

Tableau 3. *Chondrosarcomes: survie et traitement.*

	Survie à 5 ans	Traitement
Grade 1	89%	Chirurgie seule
Grade 2	75%	Chirurgie seule
Grade 3	15%	Chirurgie +/- chimiothérapie néoadjuvante (fonction du terrain: patient souvent âgé)

G de Pinieux. Enseignement post-universitaire. Tumeurs et pseudo-tumeurs osseuses, 2015.

I.1.3. Chondrosarcomes de surface

Il existe deux types de chondrosarcomes de surface: les chondrosarcomes périostés et les chondrosarcomes conventionnels périphériques.

Les chondrosarcomes périostés touchent surtout les adultes entre 20 et 40 ans.¹⁸ Ils siègent le plus souvent sur la métaphyse des os longs, en particulier sur le fémur distal et l'humérus.^{2, 9} Les récurrences locales varient de 13 à 28%. Les métastases sont rares.^{19, 20}

Les chondrosarcomes périphériques sont toujours secondaires, développés aux dépens des ostéochondromes (ou exostoses). Le risque de transformation d'un ostéochondrome en chondrosarcome est très faible (de l'ordre de 1% pour une tumeur isolée, de 5% pour les tumeurs multiples).²¹ Ils peuvent toucher tout le squelette, avec une préférence pour le pelvis et la ceinture scapulaire.⁹ Les ostéochondromes comportent une inactivation des gènes *EXT1* et *EXT2*. En revanche, la plupart des chondrosarcomes périphériques sont de phénotype sauvage pour les gènes *EXT*.⁹ De très rares cas de dédifférenciation d'un chondrosarcome périphérique ont été décrits.

I.1.4. Prise en charge thérapeutique des chondrosarcomes

La biopsie est une étape diagnostique préalable indispensable dans la prise en charge des chondrosarcomes. Il est préférable qu'elle soit chirurgicale plutôt qu'à l'aiguille afin d'obtenir une quantité de matériel plus importante et dont l'architecture sera mieux préservée. Le trajet de biopsie doit être réfléchi de manière à pouvoir l'emporter avec la tumeur lors d'une exérèse monobloc.^{22, 23, 24}

Le traitement de tous les types de chondrosarcomes est chirurgical. Les chondrosarcomes de grade 1/tumeurs cartilagineuses atypiques des os longs peuvent être traités par un curetage. Les chondrosarcomes de bas grade (grade 1) touchant le bassin, la ceinture scapulaire et le squelette axial, ainsi que les chondrosarcomes de haut grade (grades 2 et 3) sont traités, dans la mesure du possible, par une chirurgie carcinologique large.^{2, 9} Les techniques chirurgicales sont de plus en plus conservatrices, avec reconstruction (ostéosynthèse, prothèse, auto ou allo greffe osseuse). L'amputation est parfois inévitable (tumeur volumineuse avec envahissement des nerfs et des vaisseaux, récurrence après chirurgies multiples, après radiothérapie ou sur site infecté). L'amputation n'augmente pas la survie par rapport à un traitement conservateur.²² Les métastases pulmonaires, si elles sont peu nombreuses et localisées, peuvent bénéficier d'un traitement chirurgical.

La chimiothérapie est inefficace sur les chondrosarcomes de bas grade. En revanche, une polychimiothérapie néo-adjuvante (semblable à celle utilisée pour les ostéosarcomes) peut être proposée en cas de chondrosarcomes dédifférenciés ou mésoenchymateux, bien que la réponse histologique soit faible⁹ et qu'il n'ait pas été prouvé que cela améliore la survie.^{25, 26}

Les chondrosarcomes sont radio-résistants.

I.2. Diagnostics différentiels-Problématique

Le diagnostic différentiel des chondrosarcomes avec d'autres tumeurs ou pseudo-tumeurs osseuses pose parfois des problèmes aux pathologistes. Une confrontation anatomo-radio-clinique est souvent nécessaire. Ces difficultés diagnostiques sont accentuées par la pratique de plus en plus fréquente de micro-biopsies. Ces prélèvements de taille réduite n'échantillonnent qu'une partie de la tumeur, le plus souvent son extension dans les parties molles, la plus facilement accessible. Si cette composante constitue dans la majorité des cas la composante tumorale la plus agressive, elle ne reflète pas toujours la différenciation initiale de la tumeur. L'architecture tumorale et les rapports entre le tissu tumoral et le tissu osseux préexistant ne sont par ailleurs que très rarement évaluables sur ce type de prélèvement.

Les chondrosarcomes dédifférenciés et les chondrosarcomes centraux de haut grade doivent être distingués des sarcomes indifférenciés primitifs osseux et des ostéosarcomes car ils nécessitent une approche thérapeutique différente.

Il est par conséquent important que les pathologistes puissent développer de nouveaux marqueurs sur lesquels ils puissent s'appuyer pour étayer leur diagnostic. La biologie moléculaire constitue une voie privilégiée à explorer.

I.2.1. Chondrosarcomes dédifférenciés versus sarcomes indifférenciés primitifs osseux

La composante dédifférenciée des chondrosarcomes revêt fréquemment l'aspect d'un sarcome indifférencié. La présence d'une composante cartilagineuse bien différenciée de bas grade accolée à la composante dédifférenciée permet de faire le diagnostic de chondrosarcome dédifférencié (*Figure 2*).^{2, 9} Il faut envisager de renouveler les biopsies si celles-ci n'ont intéressé que la composante dédifférenciée. Sur pièce opératoire, la tumeur doit être bien échantillonnée.

Les sarcomes indifférenciés primitifs osseux ont une étiologie peu claire, cependant certains facteurs de risque ont été identifiés : maladie de Paget, infarctus osseux et radiothérapie, en cause dans 28% des cas.^{7, 27} Ce terrain n'est pas celui des chondrosarcomes dédifférenciés. Les chondrosarcomes dédifférenciés touchent des personnes d'âge, en moyenne, plus élevé.

Les sarcomes indifférenciés primitifs osseux se développent le plus souvent dans les os longs (fémur 30-45%, tibia, humérus), en particulier au niveau des genoux.⁹ La localisation pelvienne, site privilégié des chondrosarcomes dédifférenciés, est peu fréquente.

I.2.2. Chondrosarcomes dédifférenciés versus ostéosarcomes centraux de haut grade

Ce diagnostic différentiel se pose lorsqu'un chondrosarcome dédifférencié présente une différenciation hétérologue ostéosarcomateuse.

Histologiquement, le principal élément à étudier pour distinguer ces deux entités est le cartilage. Un chondrosarcome dédifférencié comporte une composante cartilagineuse bien différenciée, classiquement de bas grade, séparée de façon nette, abrupte, de la composante ostéosarcomateuse de haut grade. A l'inverse, la composante cartilagineuse d'un ostéosarcome chondroblastique est classiquement de haut grade et étroitement intriquée à la composante ostéosarcomateuse, une continuité existant entre ces deux composantes.²

I.2.3. Chondrosarcomes centraux de haut grade versus ostéosarcomes chondroblastiques

Sur le versant clinique, les ostéosarcomes atteignent des patients plus jeunes que les chondrosarcomes centraux de haut grade, avec un pic de fréquence entre 10 et 14 ans. Un second pic de fréquence est observé chez des patients de plus de 40 ans.^{27, 28} Les ostéosarcomes se développent plus souvent sur les os pathologiques (maladie de Paget, post-radiothérapie) que les chondrosarcomes,⁹ surtout chez les patients de plus de 40 ans.²

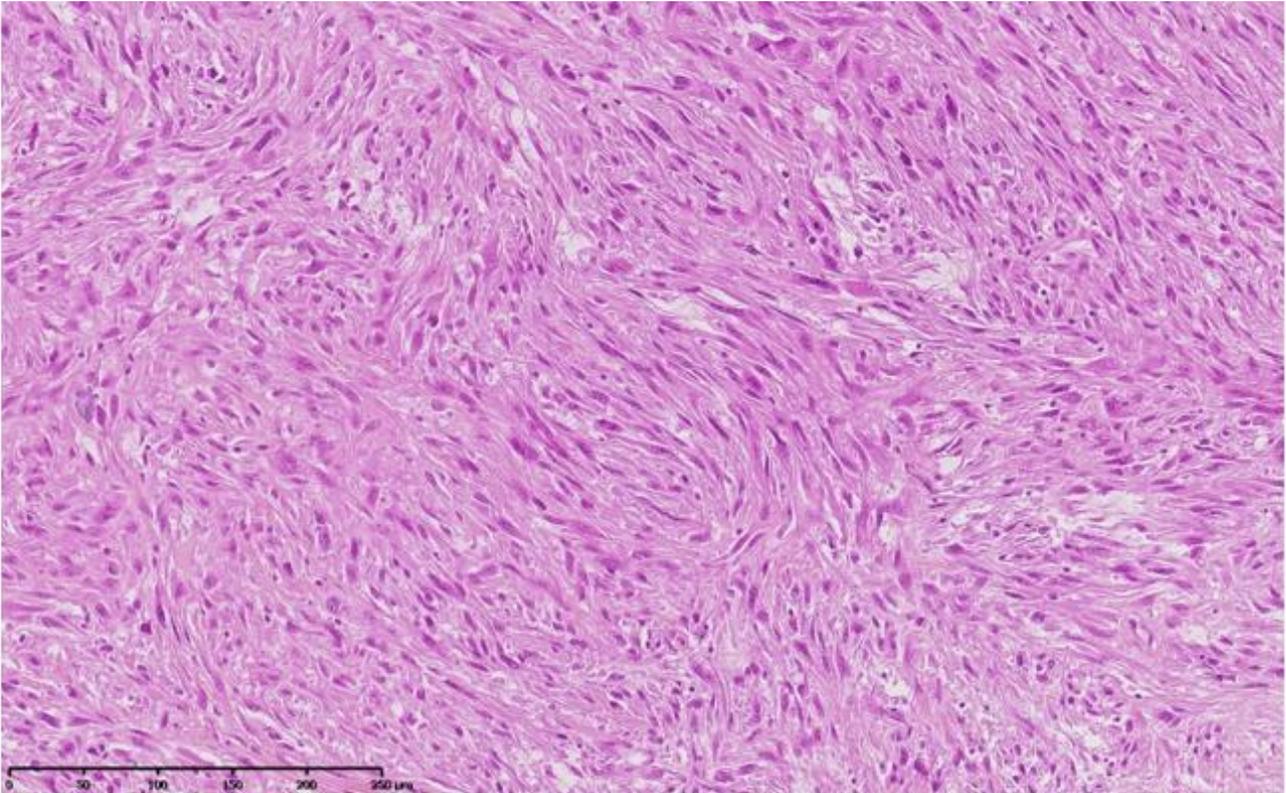
Les ostéosarcomes atteignent majoritairement les os longs (fémur distal 30%, tibia proximal 15%, humérus proximal 15%), au niveau des métaphyses (90%). Contrairement aux chondrosarcomes, ils concernent peu le pelvis. En revanche, dans cette localisation, les sujets atteints sont plus âgés.²⁹ Les ostéosarcomes sont plus fréquemment révélés par une fracture pathologique (5 à 10% des cas) que les chondrosarcomes.⁹

Sur le plan anatomo-pathologique, les ostéosarcomes chondroblastiques ont une composante cartilagineuse prédominante, de haut grade de malignité. L'élément principal permettant de les distinguer des chondrosarcomes centraux de haut grade est la présence d'une ostéogénèse tumorale, même minimale (*Figure 3*). D'autres arguments tels qu'une architecture en nappe du cartilage plutôt que lobulée ou un aspect fusiforme des cellules en périphérie orientent le diagnostic vers l'ostéosarcome chondroblastique.²

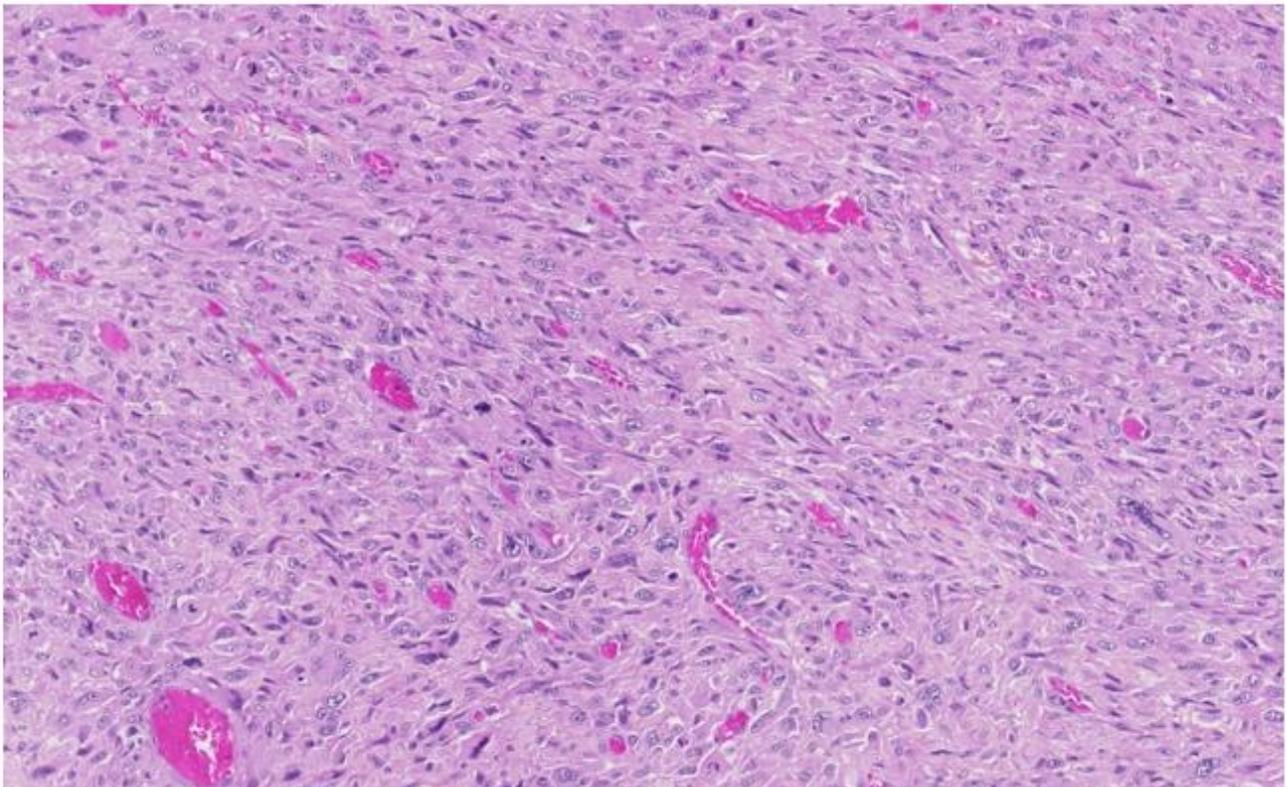
Récemment, des études se sont intéressées à deux marqueurs diagnostiques immunohistochimiques prometteurs dans l'aide au diagnostic différentiel entre ces deux entités : la galectine-1 et l'ezrine. Si, concernant la galectine-1, l'intérêt diagnostique semble établi,^{30, 31} celui de l'ezrine est encore controversé.^{32, 33} Ces deux marqueurs seraient exprimés dans les ostéosarcomes de haut grade et pas ou peu dans les chondrosarcomes conventionnels centraux. En revanche, la composante sarcomateuse de haut grade des chondrosarcomes dédifférenciés exprime également ces deux marqueurs.

Figure 2. Composante dédifférenciée d'un chondrosarcome (A : x20, HPS) et sarcome indifférencié primitif osseux de haut grade (B : x20, HPS).

A



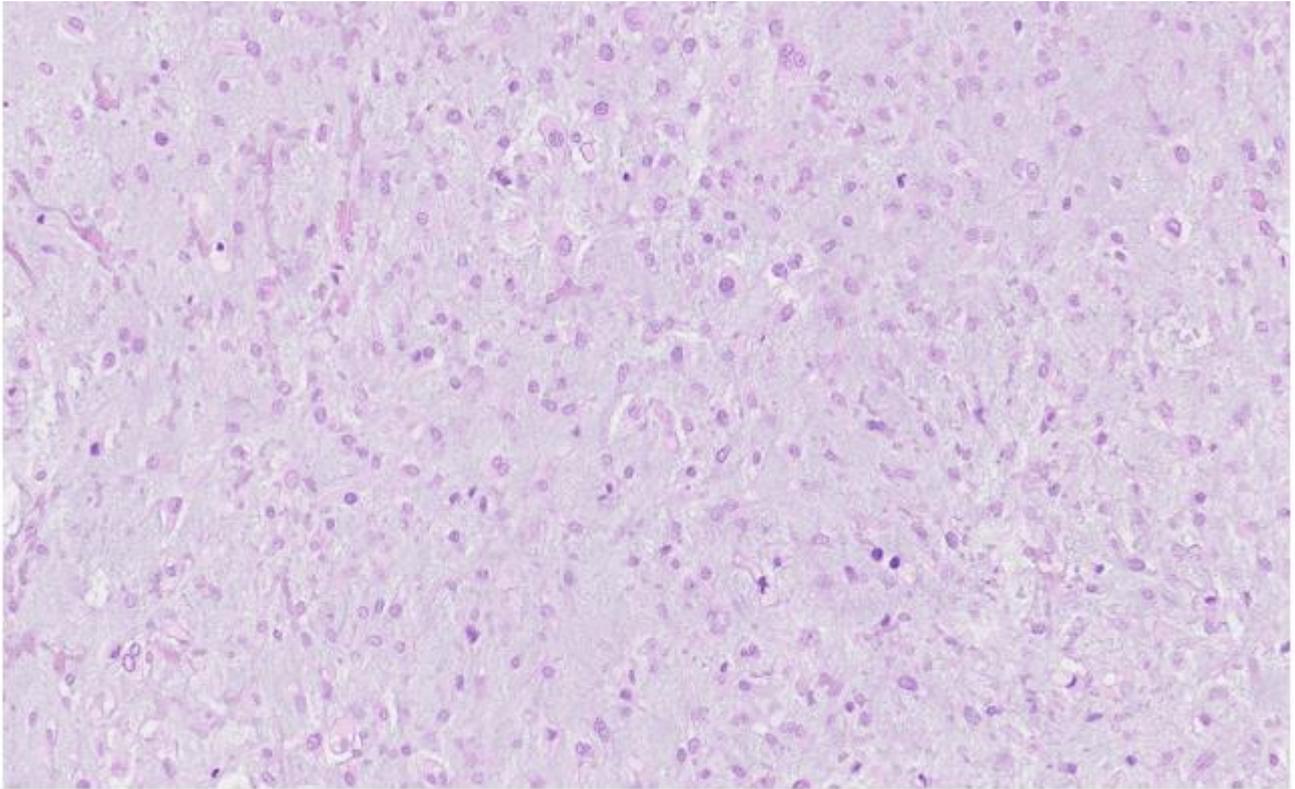
B



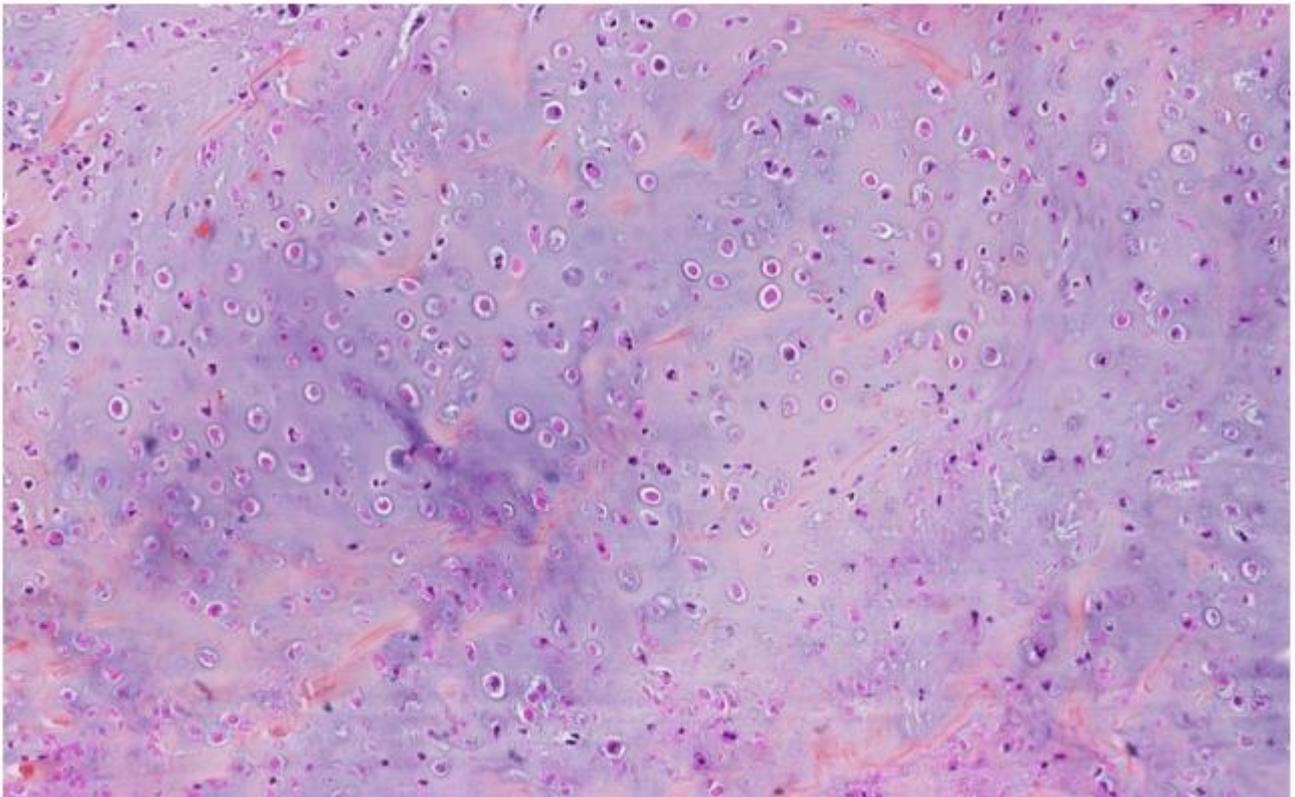
Sans la présence d'une composante cartilagineuse bien différenciée, on ne peut pas distinguer histologiquement un chondrosarcome dédifférencié (A) d'un sarcome indifférencié de haut grade (B).

Figure 3. *Chondrosarcome conventionnel central de haut grade (A : x20, HPS) et ostéosarcome chondroblastique (B : x20, HPS).*

A



B



En l'absence d'ostéogenèse tumorale, on ne peut pas différencier un ostéosarcome chondroblastique (B) d'un chondrosarcome de haut grade (A).

I.2.4. Chondrosarcomes centraux versus chordomes

Les chordomes sont des tumeurs malignes rares atteignant le squelette axial (sacrum: 50%, région sphéno-occipitale: 37%, vertèbres, surtout cervicales: 13%).² Dans ces localisations, le diagnostic différentiel avec un chondrosarcome de bas grade se pose, tout particulièrement au niveau de la base du crâne où les chordomes sont plus souvent chondroïdes et les chondrosarcomes sont plus souvent myxoïdes. Il est important de les distinguer car les chondrosarcomes de grade 1 sont de meilleur pronostic que les chordomes.²

On pourra notamment s'aider de l'immunohistochimie puisque les chordomes expriment la brachyurie de façon très spécifique.³⁴

I.2.5. Chondrosarcomes périostés versus ostéosarcomes périostés

Les ostéosarcomes périostés sont des ostéosarcomes chondroblastiques de grade intermédiaire de malignité.^{9, 35} Contrairement aux chondrosarcomes périostés, de localisation métaphysaire, ils sont le plus souvent de topographie diaphysaire ou diaphyso-métaphysaire. Ils comportent des foyers d'ostéogénèse tumorale, ainsi que des territoires fibroblastiques, le plus souvent situés à la périphérie de la tumeur.²

I.2.6. Chondrosarcomes versus tumeurs bénignes et pseudo-tumeurs osseuses

Certaines tumeurs bénignes et pseudo-tumeurs osseuses peuvent être confondues avec un chondrosarcome. Les aspects morphologiques et le rapport de la tumeur avec l'os préexistant sont deux éléments clés dans ce diagnostic différentiel. Il n'existe pas de marqueurs immunohistochimiques disponibles dans ce cadre.

a) Chondrosarcomes centraux de bas grade (grade 1) et enchondromes

La distinction entre un chondrosarcome de grade 1 et un enchondrome est difficile, la variabilité inter-observateurs est importante.^{36, 37} Les principaux critères de malignité permettant de trancher en faveur d'un chondrosarcome de grade 1 sont la présence d'os lamellaire préexistant englobé dans la tumeur, témoignant d'une résorption osseuse, les remaniements myxoïdes étendus et la cellularité augmentée.³⁸ Dans certains cas (chondromes des extrémités, chondromes des enfants et des adolescents, enchondromatoses), une hypercellularité, de légères atypies nucléaires, des binucléations et des remaniements myxoïdes limités peuvent être tolérés.² Il s'agit alors de rechercher des signes de résorption osseuse de la corticale, une extension tumorale dans les parties molles ou les éléments d'un grade cytologique élevé (atypies cyto-nucléaires importantes, mitoses) pour porter le diagnostic de chondrosarcome.³⁹ Compte tenu de cette difficulté à différencier ces deux entités, certains auteurs ont proposé que les chondromes et les chondrosarcomes de grade 1 soient regroupés sous le terme de tumeurs cartilagineuses de bas grade, tandis que les chondrosarcomes de grades 2 et 3 sont des tumeurs cartilagineuses de haut grade.

b) Chondrosarcomes périostés et chondromes périostés

Les chondromes périostés surviennent chez des patients plus jeunes que les chondrosarcomes périostés. Ils sont de taille plus petite (< 5 cm). Ils peuvent présenter une hypercellularité, de légères atypies nucléaires, des binucléations ou des remaniements myxoïdes mais sans signe de résorption osseuse.^{2, 18}

c) Chondrosarcomes centraux de haut grade et fibromes chondromyxoïdes

Le diagnostic différentiel peut se poser avec des chondrosarcomes conventionnels de haut grade comportant des remaniements myxoïdes. Les éléments permettant de les distinguer sont l'architecture lobulée typique des fibromes chondromyxoïdes du fait de septa fibreux richement cellulaires, jamais observés dans les chondrosarcomes, contenant des fibroblastes, des éléments inflammatoires, des cellules géantes de type ostéoclastique et parfois des chondroblastes.²

d) Chondrosarcomes centraux de bas grade et chondromatoses synoviales

Il s'agit de tumeurs bénignes formant des nodules cartilagineux hyalins développés au sein de la membrane synoviale. Parfois, elles s'étendent à l'os et le diagnostic différentiel avec un chondrosarcome se pose. La transformation maligne d'une chondromatose synoviale en chondrosarcome est par contre extrêmement rare.⁹

e) Chondrosarcomes et pseudo-tumeurs (cal et Nora)

Les cals sont des processus réparateurs survenant dans un contexte fracturaire ou micro-fracturaire, pouvant comporter de larges zones de néo-chondrogenèse et d'ossification enchondrale. S'ils sont prélevés, leur aspect histologique peut être très inquiétant, comportant des atypies et des mitoses et conduire à porter à tort le diagnostic de chondrosarcome ou d'ostéosarcome.

Les lésions de Nora (proliférations ostéochondromateuses parostéales bizarres) sont des processus réactionnels, comportant une composante cartilagineuse dont les chondrocytes sont de grande taille avec des binucléations.

Dans ces deux cas, le contexte radio-clinique est essentiel à l'établissement du diagnostic.²

I.3. Biologie moléculaire des chondrosarcomes : les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*

I.3.1. Histoire de la découverte des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* dans les chondrosarcomes

Des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* dans les chondrosarcomes ont été décrites pour la première fois par Amary et al. en 2011.⁴⁰

Ces mutations étaient déjà connues dans les gliomes, les glioblastomes secondaires, les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et certaines myélodysplasies.^{41, 42} Rarement, elles avaient aussi été rapportées dans d'autres tumeurs (carcinomes de la thyroïde, de la prostate et colorectaux, lymphomes B). Jusqu'en 2011, aucune mutation d'*IDH1* ou *IDH2* n'avait été décrite dans les tumeurs mésenchymateuses.

Les enchondromatoses, comme la maladie d'Ollier et le syndrome de Maffucci, comportent non seulement des enchondromes multiples mais aussi un risque de développer d'autres tumeurs comme des gliomes ou des LAM. Ces deux tumeurs pouvant être mutées sur les gènes *IDH1* et *IDH2*, il semblait intéressant de rechercher ces mutations dans les chondromes et dans les chondrosarcomes, puisque ceux-ci peuvent provenir d'une transformation maligne des chondromes. Au final, Amary et collaborateurs⁴⁰ ont effectué un screening de plus de 1000 tumeurs mésenchymateuses, retrouvant des mutations d'*IDH1* ou *IDH2* dans 56% (81/137) des tumeurs cartilagineuses centrales ou périostées (enchondromes et

chondromes périostés, chondrosarcomes conventionnels centraux, chondrosarcomes dédifférenciés et chondrosarcomes périostés). Les mutations d'*IDH* n'ont pas été retrouvées dans les autres chondrosarcomes (périphériques secondaires, mésoenchymateux, à cellules claires), dont la génétique est différente.^{40,43} Par contre, leur présence dans les chondrosarcomes périostés a conduit à rattacher ces derniers aux chondrosarcomes conventionnels centraux dans la classification de l'OMS 2013 (*Tableau 1*).⁹

Ces mutations n'ont été retrouvées dans aucune autre tumeur mésoenchymateuse et en particulier dans aucun ostéosarcome.

I.3.2. Physiopathologie des gènes *IDH1* et *IDH2*

Le gène *IDH1* est localisé sur le chromosome 2 en position q33 et le gène *IDH2* sur le chromosome 15 en position q36. Les protéines enzymatiques *IDH1* et *IDH2* sont des homodimères, situées respectivement dans le cytoplasme et dans la mitochondrie.⁴⁴

a) Fonctions normales des enzymes *IDH1* et *IDH2*

Lorsque les gènes *IDH1/2* sont de phénotype sauvage, les enzymes *IDH1/2* catalysent la réaction réversible de décarboxylation de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α CG), utilisant comme co-facteur le NADP⁺ alors réduit en NADPH. Le NADPH et l' α CG sont des éléments clés dans les processus de détoxification cellulaire et de protection contre les dommages du stress oxydatif. *IDH1* et *IDH2* sont les enzymes fournissant le plus de NADPH dans la majorité des organes, dont le cerveau.

En cas d'hypoxie, le facteur 1 α HIF (hypoxia-inducible factor 1 α), qui bloque la production de pyruvate (issu de la glycolyse), est augmenté. Ceci interrompt la synthèse d'énergie par glycolyse, qui est remplacée par la glutaminolyse. La glutamine est transformée en glutamate puis en α CG. Les enzymes *IDH1/2* catabolisent la carboxylation de l' α CG en isocitrate, fournissant ainsi une nouvelle source de citrate, facteur intermédiaire du cycle de Krebs et précurseur d'acides gras pour la lipogenèse (*Figure 4*).

Il existe également une enzyme *IDH3* (hétéro-trimère) qui transforme l'isocitrate en α CG, avec comme cofacteur NAD⁺, et qui intervient dans le cycle de Krebs mais dont les mutations n'ont pas été reliées à l'oncogenèse.⁴⁵

b) Fonctions des mutants *IDH1/2* et oncogenèse

Les enzymes mutées *IDH1/2* perdent leur capacité à transformer l'isocitrate en α CG, entraînant une diminution d' α CG et de NADPH, deux facteurs permettant le maintien de l'intégrité cellulaire. De plus, les mutants *IDH1/2* diminuent encore l'activité des enzymes *IDH1/2* non mutées en formant des hétérodimères inactifs.

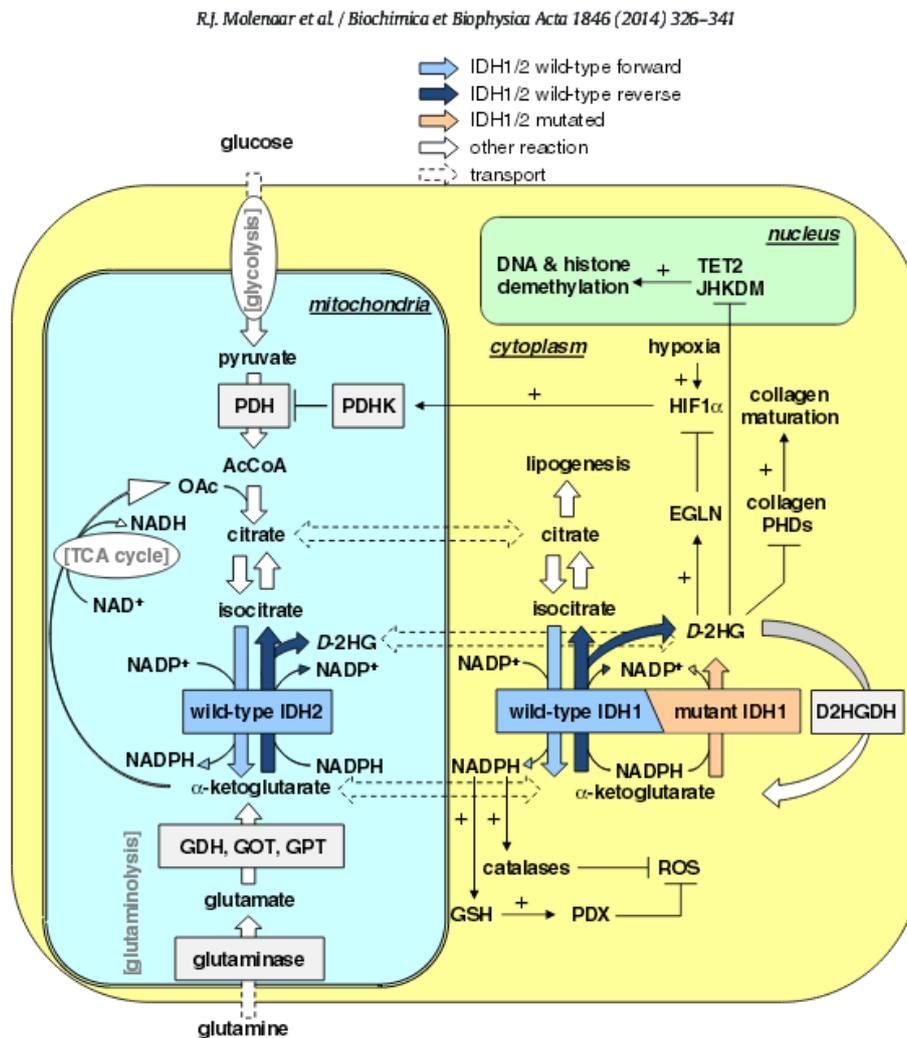
Les mutants *IDH1/2* catalysent la réduction de l' α CG en D-2-hydroxyglutarate (D-2HG), un oncométabolite fortement associé à la tumorigenèse. Les mécanismes exacts permettant d'expliquer l'implication du D-2HG et donc des mutations d'*IDH1/2* dans l'oncogenèse sont encore mal connus. Molenaar et al.⁴⁵ ont détaillé les différentes voies possiblement impliquées dans ce processus (*Figure 4*) :

-D-2HG entre en compétition avec l'isocitrate, du fait de leur ressemblance moléculaire, inhibant ainsi les enzymes *IDH1/2* sauvages.

-D-2HG induit directement un stress oxydatif, bien que les mécanismes ne soient pas clairs.

-D-2HG entre en compétition avec l' α CG, du fait de leur ressemblance moléculaire, modifiant l'activité des dioxygénases dépendantes d' α CG et aboutissant notamment à l'hyperméthylation de l'ADN et des histones.

Figure 4. Effets cellulaires et moléculaires des mutants *IDH1* et *IDH2*.



Les enzymes *IDH1* et *IDH2* wild-type/phénotype sauvage (en bleu) catalysent la réaction réversible de conversion de l'isocitrate en α CG, avec production concomitante de NADPH à partir de NADP⁺. Les mutants *IDH1* et *IDH2* (orange) convertissent l' α CG en D-2HG et réduisent le NADPH en NADP⁺. D-2HG entraîne une hyperméthylation de l'ADN et des histones via l'inhibition de TET2 et de JHDM, altère la maturation du collagène via l'inhibition de la collagène PHD et augmente la dégradation de HIF1 α via l'activation de EGLN. Abréviations : PDH: pyruvate déshydrogénase ; AcCOA: acétyl co-enzyme A ; OAc: oxaloacétate ; PHD: prolyl hydroxylase ; GDH: glutamate déshydrogénase ; GOT :glutamate oxaloacétate transférase ; GPT: glutamate pyruvate transférase ; PDX: péroxidoxine.

I.3.3. Types de mutations d'*IDH1* et *IDH2*

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* interviennent sur un seul des deux allèles (mutation hétérozygote). Il s'agit de mutations par substitution d'une base azotée (au niveau de l'exon 4 de chacun des gènes) entraînant un changement d'acide aminé au niveau des sites actifs des enzymes.

Des mutations somatiques des gènes *IDH1/2* sont retrouvées dans 50 à 80% des gliomes et des glioblastomes secondaires (rares mutations d'*IDH1/2* dans les glioblastomes primaires), avec une très nette prédominance des mutations d'*IDH1*.⁴⁵ Le sous-type de mutation le plus fréquemment rencontré (90% des cas) est la substitution de l'arginine par l'histidine en position 132 (R132H). D'autres mutations plus rares existent : R132C, R132G, R132L, R132S pour *IDH1* et R172K, R172M, R172W pour *IDH2*.⁴⁵

Les LAM *de novo* sont mutées dans 15% des cas sur les gènes *IDH1/2* et les LAM secondaires à des syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs dans 20% des cas. Les mutations concernent le plus souvent *IDH2* (60%), avec le sous-type R140Q.⁴⁵

Dans l'étude d'Amary et al.⁴⁰, la recherche des mutations d'*IDH1/2* dans les tumeurs cartilagineuses a mis en évidence une prédominance des mutations d'*IDH1* par rapport à *IDH2* (ratio *IDH1:IDH2* de 10.6:1). Le sous-type le plus fréquent était R132C (40%). Les mutations R132G (20%), R132H (17%), R132L (7%), R132S (7%) et R172S (9%) étaient également retrouvées. Aucune mutation concernant R140 pour *IDH2* n'était observée.

I.3.4. Diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade versus ostéosarcomes chondroblastiques par les mutations d'*IDH1* et *IDH2*

Kerr et collaborateurs⁴⁶ ont mis en évidence en 2013 le fait que les mutations des gènes *IDH1/2* constituent des bio-marqueurs solides des chondrosarcomes centraux et une aide pour le diagnostic différentiel avec les ostéosarcomes chondroblastiques. 61% (14/23) des chondrosarcomes étaient mutés sur *IDH1/2*, dont 86% sur *IDH1*. Aucun ostéosarcome chondroblastique (0/36) n'était muté.

I.4. Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'intérêt de la recherche des mutations d'*IDH1/2* dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes différenciés avec les sarcomes indifférenciés pléomorphes primitifs osseux et les ostéosarcomes conventionnels de haut grade.

L'objectif secondaire était de vérifier les résultats de l'étude de Kerr et al.⁴⁴, à savoir que les mutations d'*IDH1/2* sont une aide au diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade avec les ostéosarcomes chondroblastiques.

Enfin, à travers l'étude du statut mutationnel des chondrosarcomes pour les gènes *IDH1/2*, nous voulions apporter des éléments observationnels pouvant contribuer à une meilleure connaissance de ces tumeurs, concernant notamment leur tumorigenèse et les implications pronostiques.

II. Méthodes moléculaires de recherche des mutations des gènes *IDH1/2* utilisées dans notre étude

II.1. Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une méthode permettant de déterminer la succession des nucléotides d'un court fragment d'ADN (~ 10 nucléotides). C'est une technique assez rapide qui permet d'étudier 24 échantillons en 20 minutes.

Le pyroséquençage pour l'étude des gènes *IDH1/2* n'était pas mis en place sur la plateforme de biologie moléculaire de Tours. Nous l'avons développé pour la réalisation de cette étude.

Dans un premier temps, on réalise une PCR (Polymerase Chain Reaction) permettant d'amplifier la séquence d'ADN que l'on souhaite étudier. Pour cela, on met en contact l'ADN double brin et des amorces sens et anti-sens spécifiques des régions d'ADN encadrant la séquence d'intérêt. L'une des deux amorces est couplée à une molécule de biotine.

L'ADN double brin ainsi amplifié et biotinylé est mis en présence de billes de streptavidine, lesquelles ont une affinité pour la biotine et viennent s'y fixer.

En utilisant la station de travail Pyromark reliée au vide d'air, on aspire l'ADN double brin dont les billes de streptavidine lui permettent d'être retenu à travers un filtre. On plonge l'ADN dans un bain d'alcool puis d'hydroxyde de sodium, ce qui entraîne sa dénaturation: on obtient un ADN mono brin. On met en contact l'ADN mono brin et l'amorce de séquençage spécifique qui s'hybride en amont de la séquence d'intérêt.

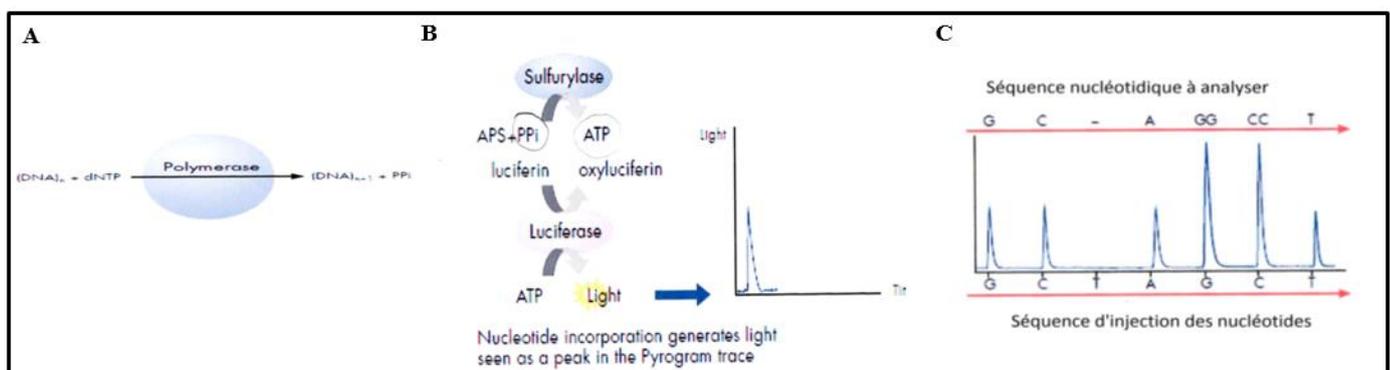
On ajoute ensuite un mélange réactionnel contenant différentes enzymes ainsi que des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates) qui sont injectés selon une séquence pré-définie.

Lorsqu'un dNTP injecté est complémentaire de la base azotée du brin d'ADN matrice, il est incorporé à la séquence grâce à une polymérase. Cela libère un pyrophosphate (PPi) qui est converti en ATP par la sulfurylase puis en signal lumineux par la luciférase. Le signal lumineux est traduit par un pic dont la hauteur est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. On obtient ainsi un pyrogramme (Figure 5). Les dNTP en excès ou non intégrés et l'ATP sont détruits par l'apyrase.

On utilise le logiciel Pyromark sw 2.0.6 (Qiagen) pour l'analyse des pyrogrammes.

En cas de mutation, des pics diminuent ou disparaissent et d'autres augmentent ou apparaissent (Figures 6 et 7).

Figure 5. Principes du pyroséquençage.



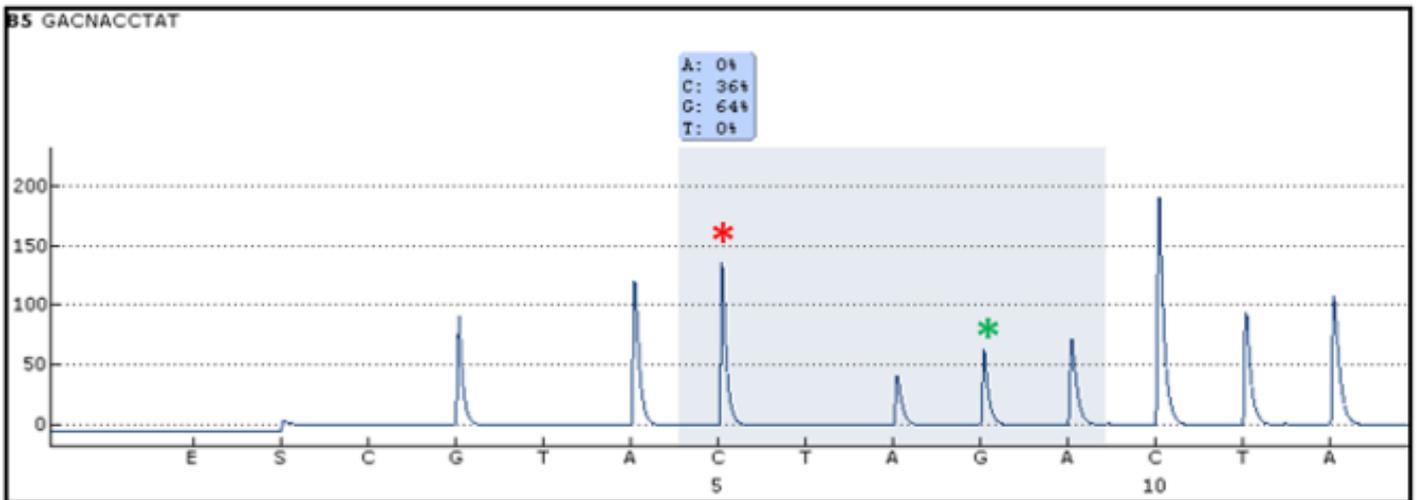
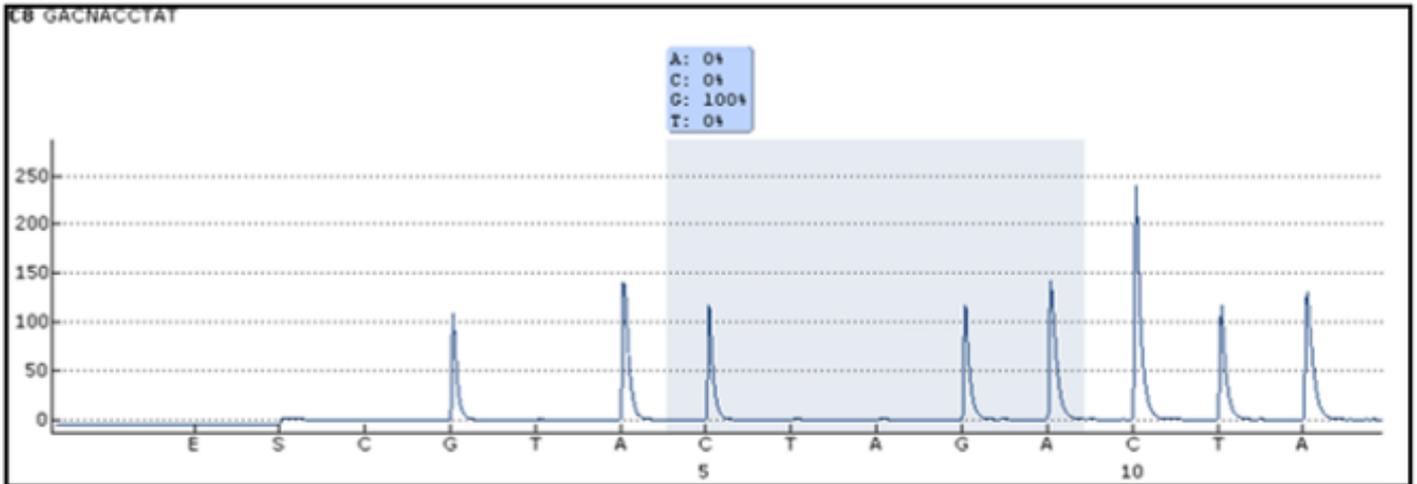
A : Incorporation d'un dNTP à la séquence par la polymérase et libération d'un PPi.

B : Conversion du PPi en ATP par la sulfurylase puis en signal lumineux par la luciférase.

C : Obtention d'un pyrogramme.

Figure 6. Pyrogrammes IDH1.

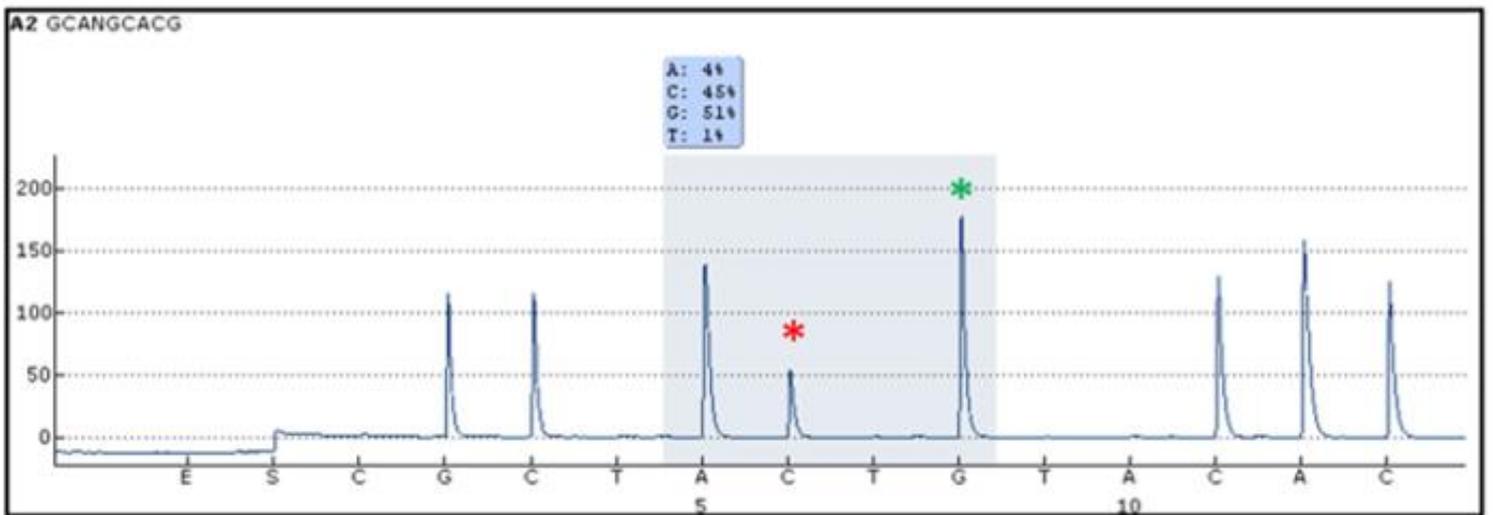
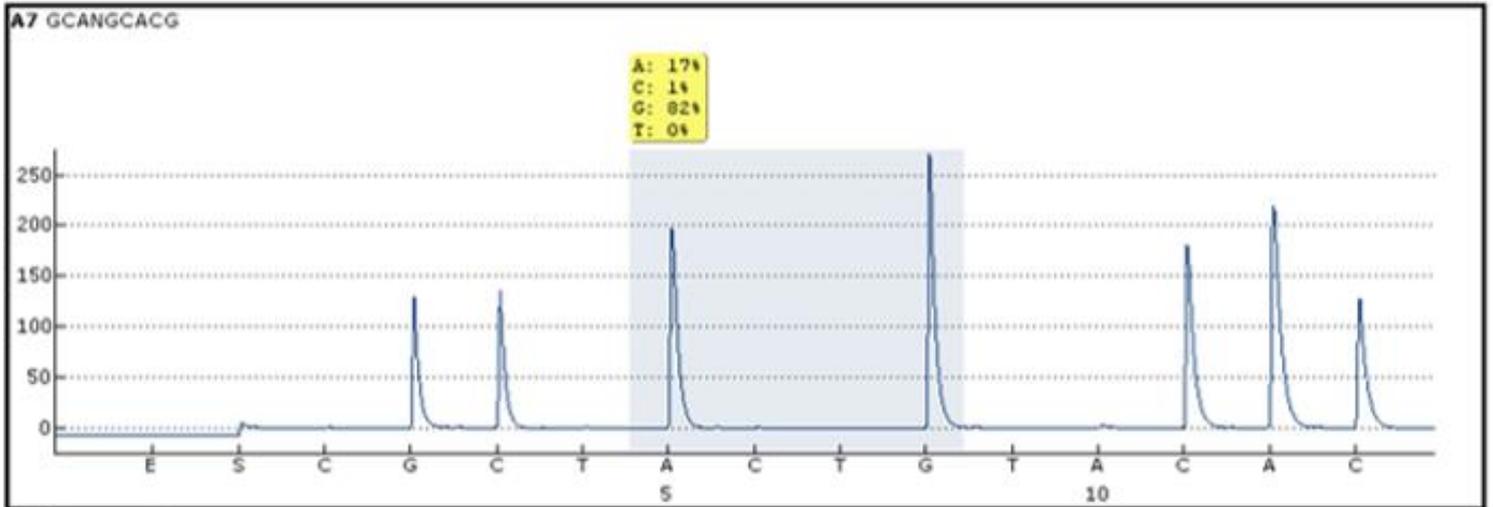
IDH1



Echantillon avec mutation d'IDH1 R132G : augmentation du pic de Cytosine () et diminution du pic de Guanine (*). Lecture anti-sens.*

Figure 7. Pyrogrammes IDH2.

IDH2



Echantillon avec mutation d'IDH2 R172T : apparition d'un pic de Cytosine () et diminution du pic de Guanine (*). Lecture sens.*

II.2. Séquençage direct

Il s'agit d'un séquençage direct automatisé (méthode Sanger). C'est une technique plus longue que le pyroséquençage, permettant l'étude de 4 échantillons en 30 minutes. Le séquençage direct porte sur des doubles brins d'ADN d'environ 200 nucléotides.

C'est la technique de référence à laquelle nous avons comparé les résultats obtenus en pyroséquençage afin de les valider.

Une PCR d'amplification de la séquence d'intérêt est d'abord réalisée.

Les produits doubles brins issus de la PCR sont mis en présence d'une amorce de séquençage (complémentaire à l'extrémité 3' de la séquence d'intérêt), de dNTP et de ddNTP (didésoxyribonucléotides triphosphates). Les ddNTP ne comportent pas de groupement OH en 3', ce qui empêche l'incorporation d'autres nucléotides par la polymérase et stoppe la synthèse du brin d'ADN. Les ddNTP sont couplés à quatre fluorochromes différents, permettant de distinguer les 4 bases azotées adénine, thymine, cytosine, guanine.

En fin de réaction de séquençage, on obtient ainsi des brins d'ADN de longueur variables, séparés par électrophorèse.

Quatre capteurs enregistrent les différentes longueurs d'ondes émises par les quatre ddNTP. Les pictogrammes obtenus sont superposés et traduit par un logiciel en séquence (Figure 8).

En cas de mutation, deux pics de couleurs différentes se superposent (Figure 9).

Figure 8. Principes du séquençage direct Sanger.

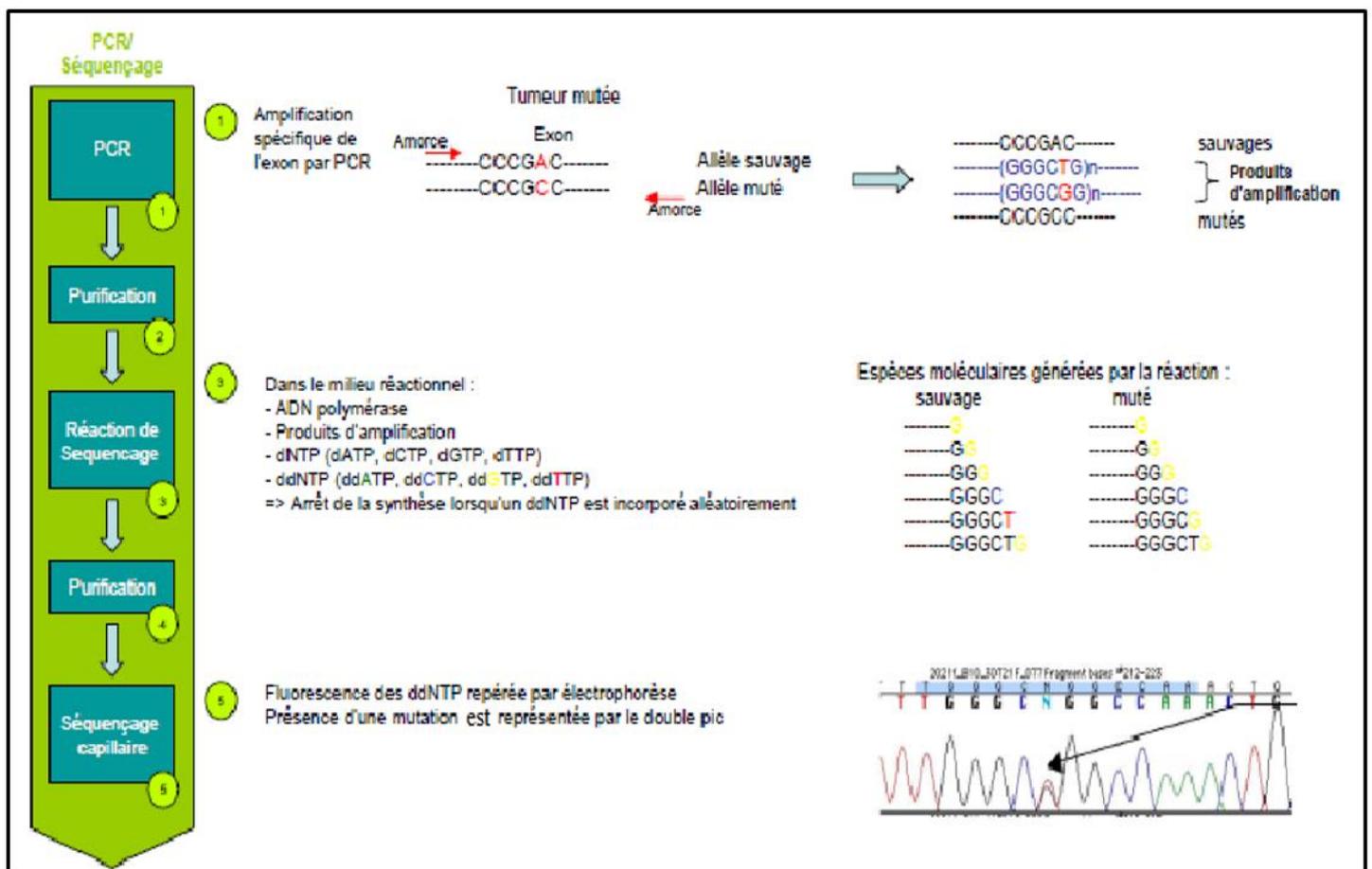
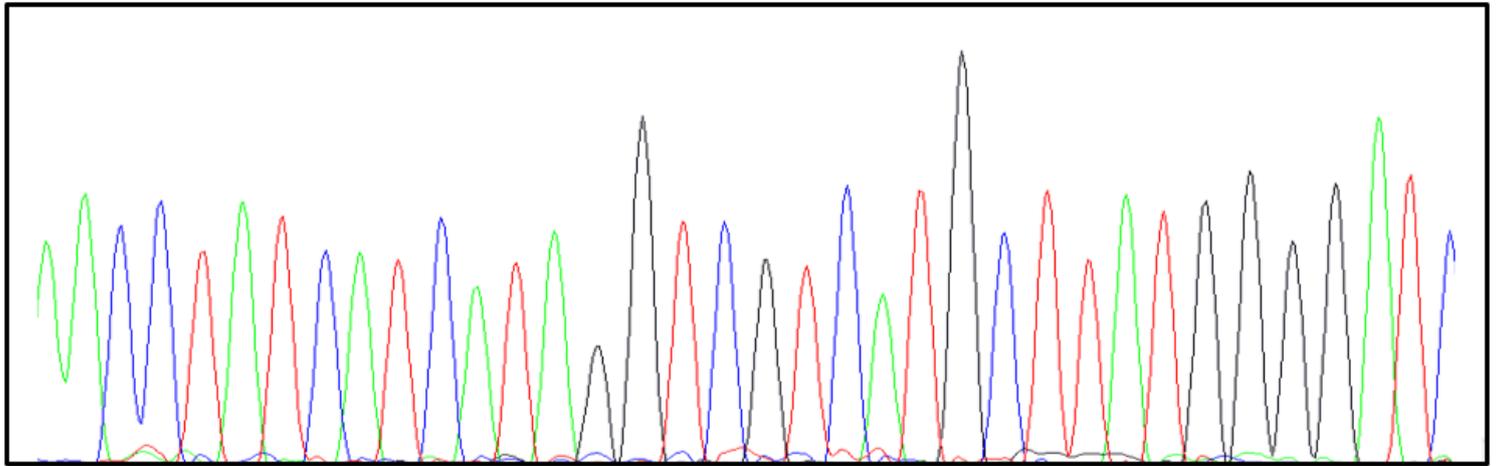
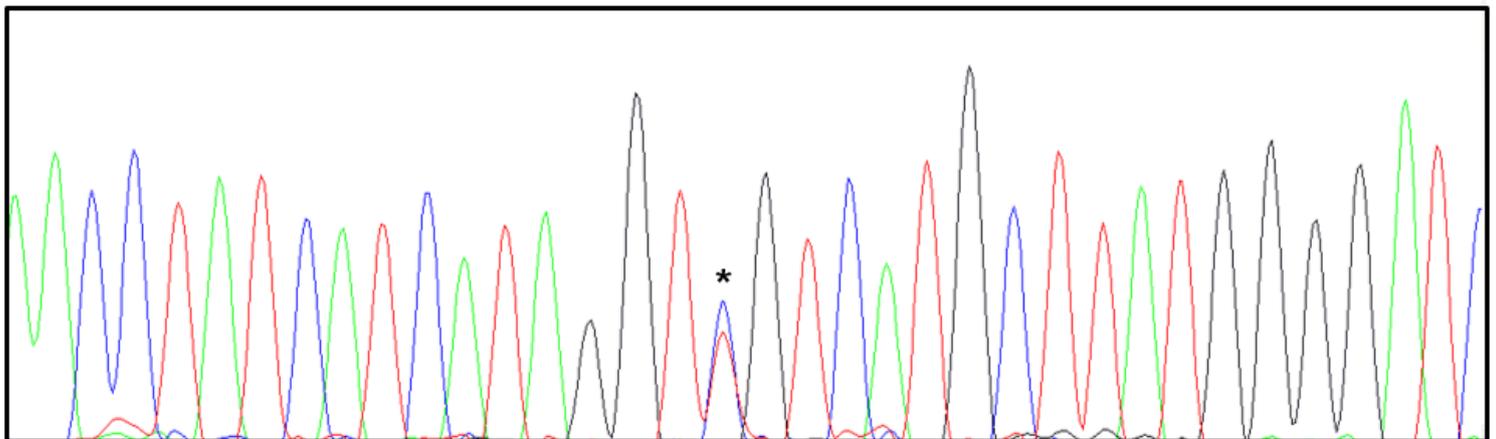


Figure 9. *Electrophorégrammes IDH1.*



Non muté

C G T



R132C

T G T

*Echantillon avec mutation d'IDH1 R132C : présence d'une Thymine (pic rouge *) à la place d'une Cytosine (pic bleu).*

III. Article

1- Introduction

Les chondrosarcomes centraux représentent environ 20% des tumeurs primitives osseuses malignes.² Ils peuvent être de bas grade/grade 1 ou de haut grade/grades 2 et 3 (classification de O'Neal et Ackerman) (*Tableau 2*).^{7,9} Ils peuvent évoluer en chondrosarcomes dédifférenciés (avec un risque de 10-15%), dont le pronostic est très péjoratif (survie à 5 ans : 0-15%).^{2,25} Les chondrosarcomes peuvent aussi se développer à la surface de l'os, comme les chondrosarcomes périostés. Ils peuvent se développer de novo ou être secondaires, notamment à des chondromes (enchondromes ou chondromes périostés). Dans les enchondromatoses, syndromes caractérisés par des enchondromes multiples associés à d'autres tumeurs, le risque de transformation d'un chondrome en chondrosarcome est augmenté (maladie d'Ollier : 53%, syndrome de Maffucci : 40%).⁶ Dans ces pathologies, les chondrosarcomes peuvent être multiples.

Le diagnostic différentiel des chondrosarcomes pose parfois des problèmes aux pathologistes. Les prélèvements micro-biopsiques accentuent ces difficultés diagnostiques, où seule une partie de la tumeur est échantillonnée et où l'architecture tumorale et les rapports avec l'os sain ne sont souvent pas évaluables. Histologiquement, la présence d'une composante cartilagineuse de bas grade accolée de façon abrupte à une composante sarcomateuse de haut grade (indifférenciée ou à différenciation hétérologue, notamment ostéosarcomateuse) permettra d'orienter le diagnostic vers un chondrosarcome dédifférencié. Devant une tumeur cartilagineuse maligne, la présence d'une ostéogenèse tumorale orientera vers un ostéosarcome chondroblastique. Il est important de distinguer les chondrosarcomes centraux de haut grade et les chondrosarcomes dédifférenciés des sarcomes indifférenciés primitifs osseux et des ostéosarcomes puisque leur pronostic et leurs traitements diffèrent. Les ostéosarcomes et les sarcomes indifférenciés nécessitent une chimiothérapie néo-adjuvante, suivie d'une chirurgie carcinologique. Les chondrosarcomes sont traités essentiellement par chirurgie, parfois associée à une chimiothérapie dans le cadre des chondrosarcomes dédifférenciés.

Une confrontation anatomo-radio-clinique est souvent nécessaire. Les chondrosarcomes concernent en moyenne des personnes plus âgées que les ostéosarcomes ou les sarcomes indifférenciés primitifs osseux. Leurs localisations les plus fréquentes sont le pelvis, le fémur proximal et l'humérus proximal alors que les ostéosarcomes et les sarcomes indifférenciés touchent principalement les os longs autour des genoux.

Des marqueurs immunohistochimiques peuvent aider au diagnostic différentiel des chondrosarcomes. L'ezrine et la galectine-1 (Gal-1) sont deux marqueurs des ostéosarcomes. Si, pour Gal-1, l'intérêt diagnostique semble être établi pour distinguer les chondrosarcomes centraux de haut grade des ostéosarcomes chondroblastiques,^{30, 31} celui de l'ezrine est controversé.^{32, 33} Ces deux marqueurs sont exprimés par les composantes de haut grade des chondrosarcomes dédifférenciés et n'apportent par conséquent pas d'aide dans le diagnostic différentiel de ce sous-type de chondrosarcome.

Les mutations d'*IDH1/2* sont connues dans les gliomes, les glioblastomes secondaires et les leucémies aiguës myéloblastiques.^{41, 42} Ces tumeurs pouvant être associées aux enchondromatoses, Amary et al.⁴⁰ ont recherché des mutations des gènes *IDH1/2* dans les chondromes et les chondrosarcomes, qu'ils ont retrouvées dans 56% des cas. Aucune autre tumeur mésenchymateuse n'était mutée, en particulier aucun ostéosarcome. Les enzymes *IDH1/2* interviennent dans les processus de détoxification cellulaire en fournissant du NADPH et de l' α -cétoglutarate (α CG). A l'état muté, les enzymes *IDH1/2* perdent cette fonction et transforment l' α CG en δ -2-hydroxyglutarate, un oncométabolite fortement associé à la

tumorigenèse.^{44, 45} Le rôle exact du δ -2-hydroxyglutarate n'est pas clair, mais il est associé à une hyperméthylation de l'ADN et des histones.

Kerr et collaborateurs⁴⁶ ont mis en évidence le fait que les mutations des gènes *IDH1/2* constituent des bio-marqueurs solides des chondrosarcomes centraux et une aide pour le diagnostic différentiel avec les ostéosarcomes chondroblastiques.

Les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'intérêt de la recherche des mutations d'*IDH1/2* dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes dédifférenciés avec les sarcomes indifférenciés pléomorphes primitifs osseux et les ostéosarcomes conventionnels de haut grade et de confirmer leur intérêt dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade avec les ostéosarcomes chondroblastiques.

2- Matériels et méthodes

2.1- Sélection des patients et caractéristiques

Cette étude rétrospective a été conçue dans le respect des règles bio-éthiques encadrant l'utilisation de matériels biologiques. Entre 2005 et 2015, 116 chondrosarcomes, 17 sarcomes indifférenciés pléomorphes de haut grade, 39 ostéosarcomes, 1 chordome et 31 tumeurs osseuses bénignes ont été sélectionnés, inscrits dans la base de données du réseau GFPO/RESOS. 58 cas provenaient de l'hôpital universitaire de Tours et 146 cas étaient issus des autres Centres de Référence du Réseau,

Nous avons sélectionnés des tissus néoplasiques susceptibles d'être compatibles avec une analyse moléculaire. Un minimum de 50% de cellules tumorales était requis. 69 prélèvements étaient des biopsies chirurgicales et 122 étaient des pièces opératoires (données manquantes pour 13 échantillons). Les échantillons pouvaient être issus de tumeurs primitives, de récidives ou de métastases. Une partie des chondrosarcomes étudiés ont été classés comme étant secondaires à la transformation d'un chondrome sur des arguments cliniques et/ou macroscopiques et/ou microscopiques (*Figure 10*). Les autres chondrosarcomes étaient classés par défaut en chondrosarcomes primaires. Quand cela était possible, les composantes différenciées et dédifférenciées des chondrosarcomes étaient analysées séparément. Plusieurs échantillons par patients pouvaient être étudiés. Seuls les échantillons pour lesquels une analyse complète des deux gènes *IDH1* et *IDH2* était possible ont été utilisés pour l'analyse finale des données.

2.2- Analyse moléculaire

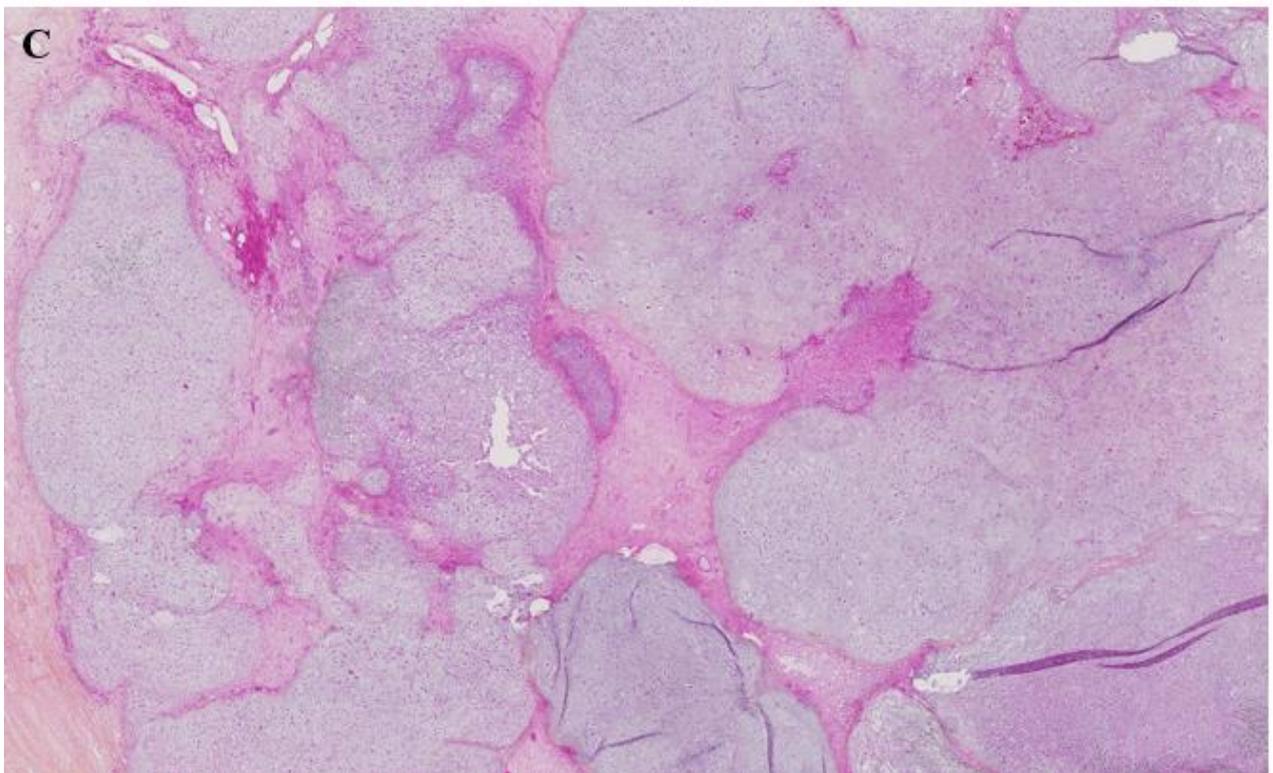
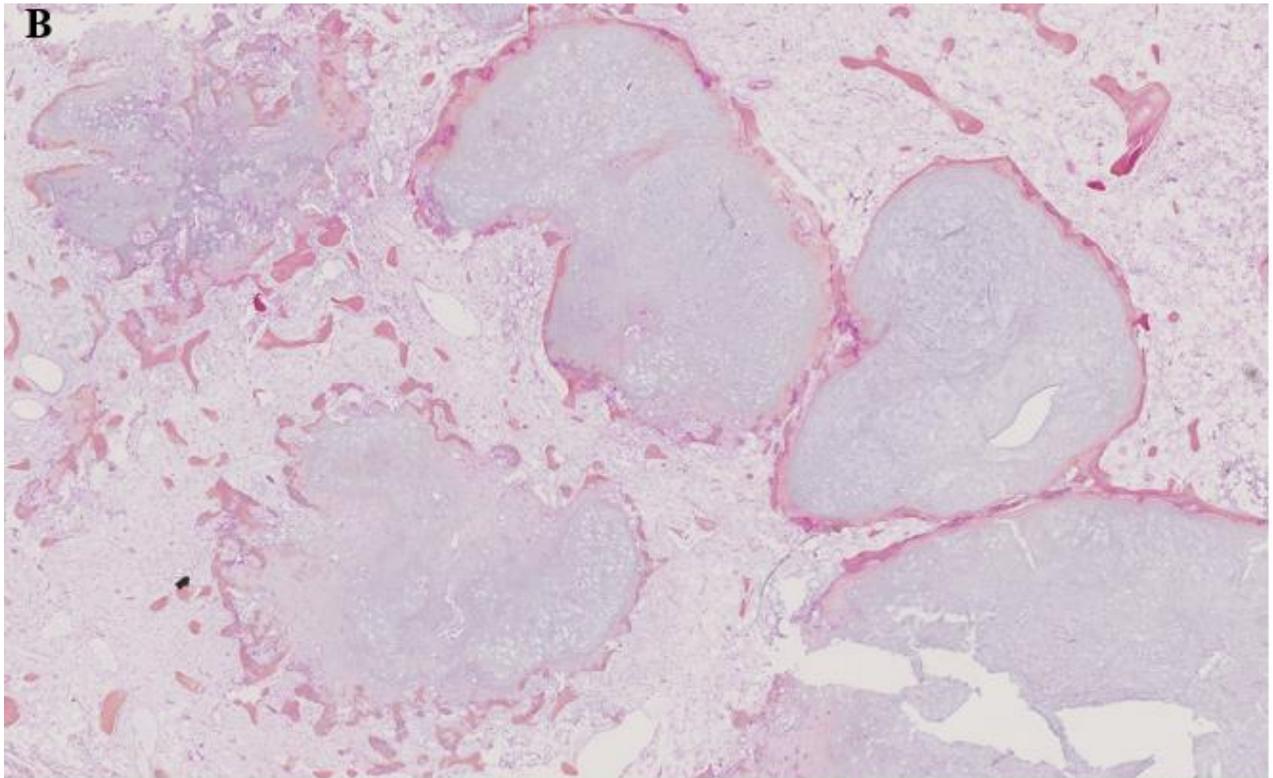
2.2.1- Extraction de l'ADN

L'ADN génomique était extrait à partir de 47 échantillons congelés (conservés à -80°C) et de 210 échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (dont 29 décalcifiés à l'acide chlorhydrique, 26 non décalcifiés et 155 pour lesquels les données concernant la décalcification étaient manquantes dont 44 lames blanches archivées depuis plus de 3 mois). Afin d'isoler l'ADN génomique, on utilisait un automate Maxwell[®] 16 (Promega) avec un kit de purification Maxwell[®] 16 FFPE Plus LEV DNA selon les recommandations du fabricant.

Figure 10. *Chondrosarcome secondaire sur enchondrome. Arguments macroscopique (A) et histologique (B, C).*



A : Tumeur cartilagineuse endo-médullaire de la diaphyse fémorale. Partie proximale : aspect lobulé de couleur blanc-gris. Partie distale : aspect nécrotico-hémorragique et kystique.



B : Partie proximale : lobules cartilagineux de petite taille, peu cellulaires, d'aspect quiescent, suggérant un enchondrome préexistant. (HPS, x10)

C : Partie distale : lobules cartilagineux irréguliers en taille et en forme, de densité cellulaire modérée à élevée, comportant des atypies cyto-nucléaires. (HPS, x10).

2.2.2- Pyroséquençage

L'analyse portait sur les substitutions du codon R132 pour le gène *IDH1* (loci c.394 et c.395) et du codon R172 pour le gène *IDH2* (loci c.515 et c.516).

Une PCR (Polymerase Chain Reaction) était réalisée en utilisant un kit PyroMark PCR (Qiagen): 30 ng d'ADN était ajoutés à 20 µl d'un mélange contenant 2.5 µl de CoralLoad 10x, 12.5 µl de master mix, 3 µl d'eau et 10 pmol de chaque amorce (*Tableau 4*). Les conditions de réalisation de la PCR étaient : 15 min à 95°C, 20 sec à 94°C, 30 sec à 53°C et 20 sec à 72°C, pendant 42 cycles puis 5 min at 72°C.

10 µl de produits de PCR étaient ajoutés à un mélange d'immobilisation de l'ADN constitué de 1 µl de billes de streptavidine (GE Healthcare), 40 µl d'un tampon d'immobilisation PyroMark (Qiagen) et 29 µl d'eau, sur une plaque à 24 puits. Après avoir été recouverte d'un film, la plaque était agitée pendant 5 à 10 min à 1400 rpm à l'aide d'un agitateur de plaque. En utilisant une station de travail Pyromark, l'ADN simple brin était déposé sur une plaque à 24 puits (PyroMark Q24) contenant chacun 25 µl (8 pmol) d'amorce de séquençage (*Tableau 3*) dans un tampon d'hybridation. Après 2 min à 80°C, la plaque était conservée à température ambiante pendant 20 min avant de procéder à la réaction de pyroséquençage.

Le pyroséquençage était réalisé en utilisant des réactifs PyroMark Gold Q24 (Qiagen). Les séquences analysées étaient GACGACCTA pour *IDH1* et GCAGGCAC pour *IDH2*. La séquence d'injection des nucléotides était CGTACTAGACTA pour *IDH1* et CGTCATCGTCAC pour *IDH2*. Les résultats étaient analysés avec un logiciel PyroMark sw 2.0.6 (Qiagen).

Tableau 4. Amorces de PCR spécifiques d'allèle utilisées pour la détection des mutations d'*IDH1* et *IDH2*.

Noms des amorces	Séquences
IDH1-PY-F1	5'-TGGATGGGTAAAACCTATCATCA-3'
IDH1-PY-R1B	5'-GACTTACTTGACCCCCATAAGCA-3'
IDH1-PY-S1	5'-TGATCCCCATAAGCAT-3'

Noms des amorces	Séquences
IDH2-PY-F2	5'-AACATCCCACGCCTAGTCCCT-3'
IDH2-PY-R2B	5'-CTCTCCACCCTGGCCTACCT-3'
IDH2-PY-S2	5'-AGCCCATCACCATTG-3'

2.2.3- Amplification par PCR et séquençage direct

Afin de valider les résultats obtenus en pyroséquençage, des échantillons mutés et des échantillons de phénotype sauvage étaient séquencés par séquençage direct Sanger (technique de référence). L'analyse portait sur l'exon 4 du gène *IDH1* et sur l'exon 4 du gène *IDH2*.

Pour la réaction de PCR, 2 µl de tampon de polymérase 10x, 1.2 µl de MgCl₂ à 25 mM, 0.4 µl de dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates) à 10 mM, 1 µl de chaque amorce à 10 µM, 1 unité d'ADN polymérase AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), 12 µl d'eau et 80 ng d'ADN génomique ont été mélangés pour un volume total de 20 µl. Les conditions de réalisation de la PCR étaient: 8 min à 95°C puis 45 sec à 94°C, 45 sec à 55°C et 1 min à 72°C, pendant 35 cycles suivis d'une élongation finale de 7 min à 72°C.

Les produits de PCR étaient purifiés par ExoI et Fast-AP (Fermentas) selon les recommandations du fabricant. La réaction de séquençage était réalisée en utilisant le kit de séquençage Big Dye terminator V3.1 cycle (Applied Biosystems) avec des amorces à 2 µM, selon le protocole du fabricant. Les produits de séquençage étaient purifiés avec le kit de purification Big Dye Xterminator (Applied Biosystems) avant l'analyse par 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Les données du séquençage étaient analysées avec le logiciel Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

2.2.4- Analyse statistique

La sensibilité et la spécificité de la détection des mutations d'*IDH1* et *IDH2* ont été évaluées dans les chondrosarcomes, les sarcomes indifférenciés pléomorphes de haut grade, les ostéosarcomes et des tumeurs osseuses bénignes ou de bas grade. Des tests de Pearson χ^2 , Mann-Whitney, Fisher et Kruskal-Wallis ont été utilisés pour rechercher des associations entre les données anatomo-cliniques et les mutations d'*IDH1/2* dans les chondrosarcomes. Le logiciel de statistique utilisé était R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Des valeurs de *p* inférieures ou égales à 0.05 étaient considérées comme significatives.

3- Résultats

3.1- Données clinico-pathologiques

Sur les 204 cas que comptait notre cohorte initiale, 172 (84%) comportaient une qualité et/ou quantité suffisantes d'ADN pour une analyse complète des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*. Cette cohorte finale était composée de 90 chondrosarcomes, 16 sarcomes indifférenciés pléomorphes de haut grade, 39 ostéosarcomes (21 ostéosarcomes conventionnels de haut grade dont 13 ostéosarcomes chondroblastiques, 9 ostéosarcomes de bas grade, 1 ostéosarcome périosté, 1 ostéosarcome télangiectasique, 7 ostéosarcomes dont le sous-type n'était pas connu), 1 chordome, 27 tumeurs bénignes (13 chondromes, 5 fibromes chondromyxoides, 2 chondroblastomes, 2 chondromastoses synoviales, 4 ostéoblastomes).

3.1.1- Patients atteints de chondrosarcomes

La cohorte de 90 chondrosarcomes (*Tableau 5*) comportait 40 chondrosarcomes centraux (11 de bas grade/grade 1 et 29 de haut grade/grades 2 et 3), 34 chondrosarcomes dédifférenciés, 4 chondrosarcomes périostés, 2 chondrosarcomes périphériques, 7 chondrosarcomes à cellules claires, 2 chondrosarcomes mésenchymateux. Un chondrosarcome présentant un aspect histologique cytologique inhabituel « chondroblastoma-like » était inclassé.

Les patients avaient une médiane d'âge de 60 ans (de 11 à 90 ans) et présentaient une discrète prédominance masculine (ratio hommes-femmes: 1.48; hommes: 49, femmes: 33; données non disponibles (ND): 8). Les chondrosarcomes dédifférenciés touchaient des patients plus âgés (moyenne d'âge: 71 ans) que les chondrosarcomes centraux (moyenne d'âge: 47 ans) ou périostés (moyenne d'âge: 29 ans) (*p*=0.002). Les localisations les plus fréquentes étaient le fémur (*n*=23), l'humérus (*n*=15), le pelvis (*n*=8), les os des mains et des pieds (*n*=8). Les chondrosarcomes dédifférenciés atteignaient exclusivement les os longs (fémur: 12; humérus: 9; tibia: 3; fibula: 1; données ND: 9).

Sur les 40 chondrosarcomes centraux, 7 (18%) étaient secondaires à la transformation d'un enchondrome (4 de haut grade, 3 de bas grade), dont un développé sur une enchondromatose (patient 56, *Tableau 5*). Les deux groupes de chondrosarcomes, primaires et

secondaires (hors chondrosarcomes périphériques), étaient similaires pour l'âge ($p=1$) et la localisation tumorale ($p=0.39$).

Soixante-deux tumeurs étaient primitives et trois étaient des récidives (données ND: 25). Les récidives comprenaient 1 chondrosarcome dédifférencié (patient 9, *Tableau 5*) et 2 chondrosarcomes centraux de haut grade (patients 59 et 87, *Tableau 5*).

3.1.2- Patients atteints d'autres tumeurs osseuses

La médiane d'âge des patients atteints d'ostéosarcome était de 46 ans (de 14 à 91 ans) et le ratio hommes-femmes était de 0.85 (hommes: 17; femmes: 20; données ND: 2). Les localisations les plus fréquentes étaient le fémur ($n=10$), la mandibule ($n=9$), le pelvis ($n=5$) et le tibia ($n=3$). Les cinq ostéosarcomes qui touchaient le pelvis étaient chondroblastiques.

La médiane d'âge des patients atteints de sarcomes indifférenciés pléomorphes était de 64 ans. Le patient le plus jeune était un enfant (âge exact non connu) et le patient le plus âgé avait 94 ans. Le ratio hommes-femmes était de 1.3 (hommes: 9 ; femmes: 7). Les localisations les plus fréquentes étaient l'humérus ($n=4$), le fémur ($n=3$), le tibia ($n=2$) et le pelvis ($n=2$).

Sur les 13 chondromes, il y avait 11 enchondromes, 1 chondrome périosté et 1 chondrome dont le sous-type n'était pas connu. La médiane d'âge était de 22.5 ans (de 9 à 84 ans) et le ratio hommes-femmes était de 1.6 (hommes: 8, femmes: 5). Les localisations les plus fréquentes étaient les os longs tubulaires ($n=7$) et les petits os tubulaires des mains ($n=4$).

3.2- Analyse mutationnelle

Trente-deux cas, correspondant à 55 échantillons tumoraux, n'étaient pas interprétables. Parmi ces échantillons, 17 avaient été décalcifiés à l'acide chlorhydrique (soit 59% d'échecs, 17/29), 1 avait été fixé non décalcifié et les données de fixation n'étaient pas disponibles pour les 37 restants. Parmi ces 37 échantillons, on comptait 24 lames blanches archivées depuis plus de 3 mois, soit un taux d'échec de 55% (24/44). Tous les échantillons congelés étaient interprétables.

Trente et un échantillons mutés en pyroséquençage ont été testés en séquençage Sanger. 26/31 (84%) des échantillons étaient interprétables et retrouvaient la mutation révélée en pyroséquençage. 4/31 (4%) des échantillons n'étaient pas interprétables et pour un échantillon la mutation n'était pas retrouvée. Tous les sous-types mutationnels obtenus en pyroséquençage pour *IDH1* ont été retrouvés en séquençage Sanger. Pour *IDH2*, les sous-types R172T et R172S c.516 G > T n'étaient pas retrouvés et faisaient partie des cas non interprétables en séquençage Sanger.

3.2.1- Patients atteints de chondrosarcomes

Sur les 40 chondrosarcomes centraux, 17 (43%) étaient mutés avec 13/29 (45%) des chondrosarcomes de haut grade et 4/11 (36%) des chondrosarcomes de bas grade. Toutes les mutations portaient sur le gène *IDH1*, avec une prédominance pour R132G ($n=7$), puis R132C ($n=6$), R132L ($n=2$) et R132S ($n=1$). Nous avons observé trois chondrosarcomes de localisation cranio-faciale mutés sur les quatre testés (75%, 1 R132C, 1 R132L, 1 R132G). Un chondrosarcome central de haut grade (patient 27, *Tableau 5*) présentait une double mutation R132C+R132L (*Figure 11*) sur le même échantillon.

Sur les 34 chondrosarcomes dédifférenciés, l'étude moléculaire séparée des composantes bien différenciées et dédifférenciées a été possible pour 6 patients. Pour 4 patients, le statut mutationnel était identique. Une tumeur (patient 24, *Tableau 5*) présentait une

Tableau 5. Données clinico-pathologiques et statuts mutationnels IDH1/2 chez les patients atteints de chondrosarcomes.

<i>N</i>	<i>Diagnostique</i>	<i>Age</i> (<i>a</i>)	<i>Sexe</i>	<i>Localisation</i>	<i>Primaire</i> <i>/Secondaire</i> (* <i>Enchondromatose</i>)	<i>Primitive</i> <i>/Récidive</i>	<i>Statut mutationnel</i>
1	CS BG	89	F	Main	Secondaire	Primitive	WT
2	CS HG	73	F	Fémur	Primaire	ND	WT
3	CS HG	79	F	Fémur	Secondaire	Primitive	R132G
4	CS Dediff	84	F	Fibula	Primaire	Primitive	R172K
5	CS Dediff	68	H	Humérus	Primaire	Primitive	WT
6	CS HG	62	F	Métatarse	Primaire	Primitive	R132G
7	CS HG	88	H	Métatarse	Primaire	Primitive	WT
8	CS BG	71	F	Phalange pied	Primaire	Primitive	WT
9	CS Dediff	58	H	Fémur	Primaire	Récidive	R132G
10	CS Dediff	86	H	Fémur	Primaire	Primitive	R172T
11	CS HG	67	H	Sternum	Primaire	Primitive	WT
12	CS HG	75	H	Omoplate	Primaire	Primitive	WT
13	CS HG	43	H	Sacrum	Primaire	Primitive	WT
14	CS HG	63	H	Omoplate	Primaire	Primitive	WT
15	CS HG	59	F	Humérus	Primaire	Primitive	WT
16	CS Dediff	76	H	Fémur	Primaire	Primitive	WT
17	CS Dediff	70	H	Humérus	Primaire	Primitive	WT
18	CS BG	11	H	Clavicule	Primaire	Primitive	WT
19	CS BG	73	F	Pelvis	Primaire	Primitive	WT
20	CS Dediff	90	H	Humérus	Primaire	Primitive	R172S (c.516 G>T)
21	CS HG	62	H	Vertèbre (T6-7)	Secondaire	Primitive	WT
22	CS HG	56	F	Pelvis	Primaire	Primitive	R132G
23	CS Perios	44	F	Tibia	Primaire	Primitive	WT
24	CS Dediff	54	H	Humérus	Primaire	Primitive	R132C+R172S (c.516 G>T)
25	CS HG	42	F	Pelvis	Primaire	Primitive	R132C
26	CS HG	76	H	Vertèbre (T9-10)	Primaire	Primitive	WT
27	CS HG	34	H	Vertèbre (T6-7)	Primaire	Primitive	R132C+R132L
28	CS HG	76	F	Pelvis	Primaire	Primitive	WT
29	CS BG	19	F	Pelvis	Primaire	Primitive	WT
30	CS Perios	27	H	Humérus	Primaire	Primitive	WT
31	CS HG	76	H	Metacarpe	Primaire	Primitive	R132L
32	CS BG	43	F	Humérus	Secondaire	Primitive	R132G
33	CS BG	49	F	Fémur	Primaire	Primitive	WT
34	CS BG	63	H	Fémur	Primaire	Primitive	WT
35	CS Dediff	67	H	ND	Primaire	Primitive	R132C
36	CS Dediff	75	F	ND	ND	ND	R172S (c.516 G>C)
37	CS Dediff	70	H	Fémur	ND	ND	WT
38	CS Dediff	84	F	Humérus	ND	ND	WT
39	CS Periost	31	H	Humérus	Primaire	Primitive	R132L
40	CS HG	70	H	Fémur	Primaire	Primitive	R132S
41	CS Dediff	78	H	Humérus	ND	ND	WT
42	CS Dediff	51	ND	Humérus	ND	ND	WT
43	CS Dediff	ND	ND	ND	ND	ND	WT
44	CS Dediff	ND	ND	ND	ND	ND	WT
45	CS Dediff	71	H	Fémur	ND	ND	R172S (c.516 G>T)
46	CS Dediff	65	F	Tibia	ND	ND	R132L
47	CS Dediff	74	F	Fémur	ND	ND	WT
48	CS Dediff	84	H	ND	ND	ND	R132C
49	CS Dediff	82	H	Tibia	ND	ND	R172T

50	CS Dediff	ND	ND	ND	ND	ND	WT
51	CS Dediff	ND	ND	ND	ND	ND	WT
52	CS Dediff	64	H	Fémur	ND	ND	R132L
53	CS HG	ND	ND	ND	ND	ND	WT
54	CS HG	17	H	Calcanéum	Primaire	Primitive	WT
55	CS Chondro	65	H	Tibia	Primaire	Primitive	WT
56	CS HG	23	H	Pelvis	Secondaire*	Primitive	R132C
57	CS Dediff	70	F	Fémur	Primaire	Primitive	WT
58	CS HG	48	F	Fémur	Primaire	Primitive	R132C
59	CS HG	57	H	Côte	Primaire	Récidive	R132C
60	CS Dediff	74	F	Tibia	Primaire	Primitive	R132C
61	CS Dediff	70	F	Humérus	Primaire	Primitive	WT
62	CS Dediff	51	H	Fémur	Primaire	ND	R132S
63	CS Dediff	77	F	Humérus	Primaire	ND	WT
64	CS Dediff	60	F	Fémur	Primaire	ND	WT
65	CS Dediff	65	H	Fémur	ND	ND	R132S
66	CS Dediff	ND	ND	ND	ND	ND	R132C
67	CS BG	23	F	Humérus	Secondaire	Primitive	R132G
68	CS BG	44	H	Fémur	Primaire	Primitive	WT
69	CS Perios	15	H	Clavicule	Primaire	Primitive	WT
70	CS HG	48	F	Tibia	Primaire	Primitive	WT
71	CS Dediff	ND	H	ND	ND	ND	WT
72	CS Dediff	66	F	Fémur	Primaire	ND	WT
73	CS HG	60	H	Omostrate	Primaire	Primitive	WT
74	CS HG	77	F	Fémur	Primaire	ND	R132C
75	CS HG	49	F	Fémur	Secondaire	Primitive	R132G
76	CS CC	67	H	Fémur	Primaire	Primitive	WT
77	CS Periph	65	H	Calcanéum	Secondaire	Primitive	WT
78	CS Periph	19	F	Tissus mous cuisse	Secondaire	Primitive	WT
79	CS CC	48	H	Humérus	Primaire	Primitive	WT
80	CS CC	56	H	Fémur	Primaire	Primitive	WT
81	CS Mes	21	F	Tibia	Primaire	Primitive	WT
82	CS Mes	39	F	Massif cranio facial	Primaire	Primitive	WT
83	CS CC	60	H	Phalange pied	Primaire	Primitive	WT
84	CS CC	34	H	Pelvis	Primaire	Primitive	WT
85	CS CC	ND	ND	ND	Primaire	Primitive	WT
86	CS CC	ND	ND	ND	Primaire	Primitive	WT
87	CS HG	67	F	Massif cranio facial	Primaire	Récidive	R132G
88	CS BG	22	F	Massif cranio facial	Primaire	Primitive	R132L
89	CS HG	61	H	Massif cranio facial	Primaire	Primitive	WT
90	CS BG	59	H	Massif cranio facial	Primaire	Primitive	R132C

Abbreviations : CS: Chondrosarcome ; HG: Haut grade ; BG : Bas grade ; Dediff: Dédifférencié ; Perios: Periosté ; Periph: Périphérique ; CC: Cellules Claires ; Mes: Mésenchymateux ; Chondro: Chondroblastoma-like ; F: Femme ; H: Homme ; WT: Wild-type.

hétérogénéité mutationnelle avec des échantillons mutés R132C sur *IDH1* (composante bien différenciée) et des échantillons mutés R172S c.516 G > T sur *IDH2* (composantes bien différenciée et dédifférenciée) et des échantillons de phénotype sauvage (composantes bien différenciée et dédifférenciée). Histologiquement, cette tumeur présentait aussi une hétérogénéité morphologique avec des secteurs bien différenciés de grade 1, d'autres secteurs bien différenciés de grade 2 et des secteurs indifférenciés pléomorphes (*Figure 12*). Une autre tumeur (patient 65, *Tableau 5*) était mutée R132S pour la composante bien différenciée et de phénotype sauvage pour la composante dédifférenciée. Sur les 32 chondrosarcomes dédifférenciés restants, 14 étaient mutés soit au total 47% (16/34), 10 (59%) sur *IDH1* et 7 (41%) sur *IDH2*. Les chondrosarcomes dédifférenciés étaient plus fréquemment mutés sur *IDH2* que les chondrosarcomes conventionnels centraux et périostés ($p=0.003$). La mutation prédominante était R132C ($n=4$), suivie de R172S ($n=3$; c.516 G > T, $n=2$; c.516 G > C, $n=1$), puis R132S ($n=2$), R132L ($n=2$), R172T ($n=2$), R132G ($n=1$) et R172K ($n=1$).

Sur les 4 chondrosarcomes périostés, un seul (25%) était muté (R132L).

Aucun autre sous-type de chondrosarcome (périphérique, à cellules claires, mésenchymateux et "chondroblastoma-like") n'était muté *IDH1/2*.

Nous avons comparé les chondrosarcomes mutés et de phénotype sauvage (parmi les chondrosarcomes centraux de bas grade et de haut grade, dédifférenciés et périostés) concernant l'âge, le sexe, la localisation tumorale, le statut primaire ou secondaire, le statut primitif ou récidivant (*Tableau 6*). Les deux groupes étaient identiques pour le sexe (ratio hommes-femmes: 1.54 vs 1.29, $p=0.72$), l'âge ($p=0.66$) et la localisation tumorale ($p=0.47$). Sur les 7 chondrosarcomes secondaires, 5 (71%) étaient mutés alors que seulement 36% (13/36) des chondrosarcomes primaires l'étaient ($p=0.11$). Les chondrosarcomes secondaires étaient également plus fréquemment mutés que les chondromes (71% vs 54%, $p=0.19$). Tous les chondrosarcomes secondaires mutés présentaient le sous-type R132G, à l'exception d'un cas (R132C) qui était développé dans un contexte d'enchondromatose, alors qu'aucun chondrome ne présentait cette mutation ($p=0.01$). Il y avait 3 cas de chondrosarcomes récidivants, tous étaient mutés (2 R132G, 1 R132C) contre 42% (21/50) des tumeurs primitives ($p=0.09$).

Parmi les chondromes et les chondrosarcomes conventionnels centraux, périostés et dédifférenciés, 2/7 (29%) des tumeurs décalcifiées à l'acide chlorhydrique étaient mutées, 3/7 (43%) des tumeurs fixées non décalcifiées étaient mutées ($p=1$) et 15/29 (52%) des tumeurs cryopréservées étaient mutées ($p=0.4$), données ND: 48.

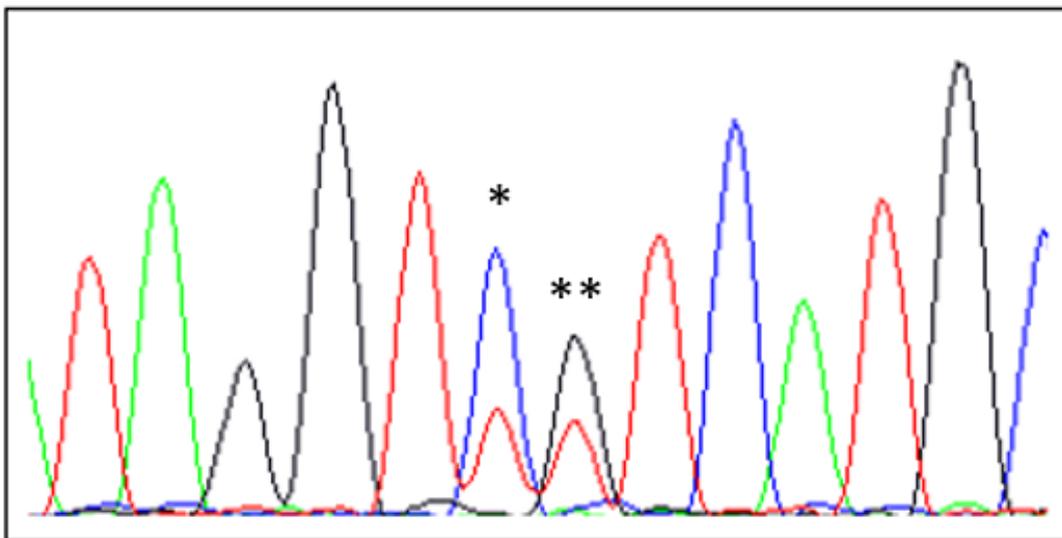
Sur les 43 chondrosarcomes non mutés (parmi les chondrosarcomes conventionnels centraux, périostés et dédifférenciés) 29 étaient fixés (dont 4 décalcifiés, 4 non décalcifiés, données ND: 21, dont 11 issus de lames blanches archivées depuis plus de 3 mois) et 14 cryopréservés.

3.2.2- Patients atteints d'autres tumeurs osseuses

A part les chondromes, aucune autre tumeur osseuse n'était mutée pour *IDH1* ou *IDH2*, en particulier aucun sarcome indifférencié pléomorphe de haut grade ni aucun ostéosarcome chondroblastique.

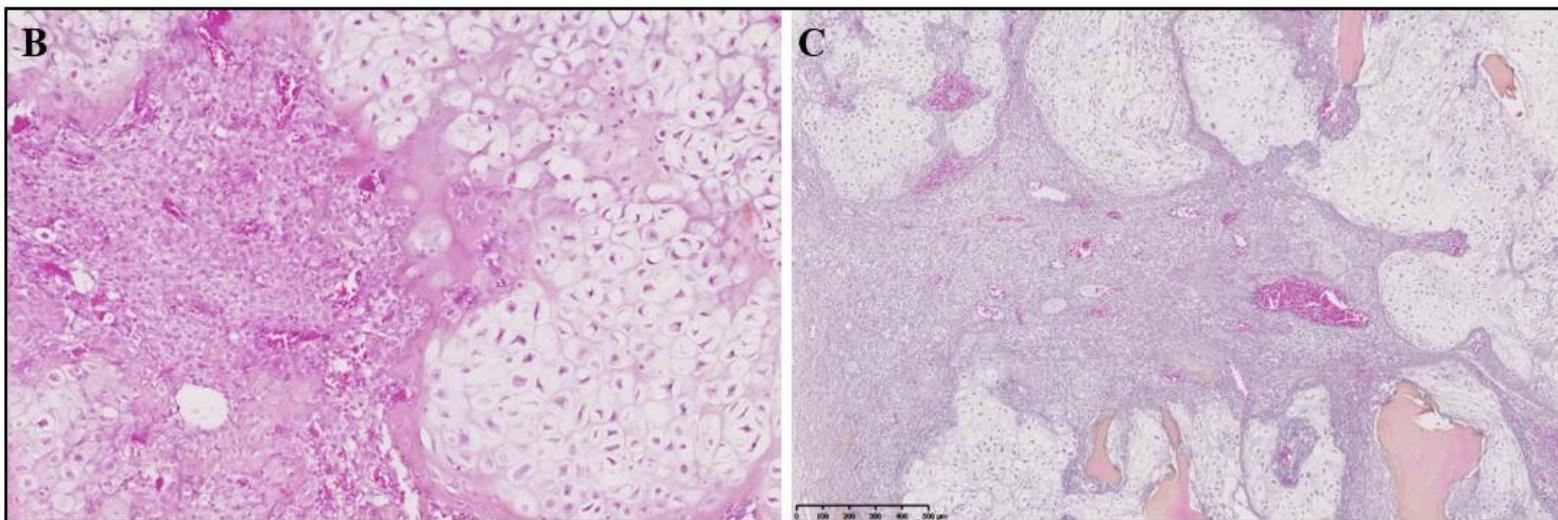
Sur les 13 chondromes, 7 (54%) étaient mutés pour *IDH1*: 5/11 enchondromes (4 R132C, 1 R132H), 1/1 chondrome périosté (R132C) et 1 chondrome muté R132L dont le sous-type n'était pas connu. Sur les 4 enchondromes mutés R132C, 2 l'étaient dans un contexte d'enchondromatose. Aucun chondrome ne présentait de mutation sur *IDH2*.

Figure 11. *Electrophorégramme avec hétérogénéité mutationnelle d'IDH1 R132C + R132L.*



Substitution d'une Thymine à une Cytosine ().*
*Substitution d'une Thymine à une Guanine (**).*

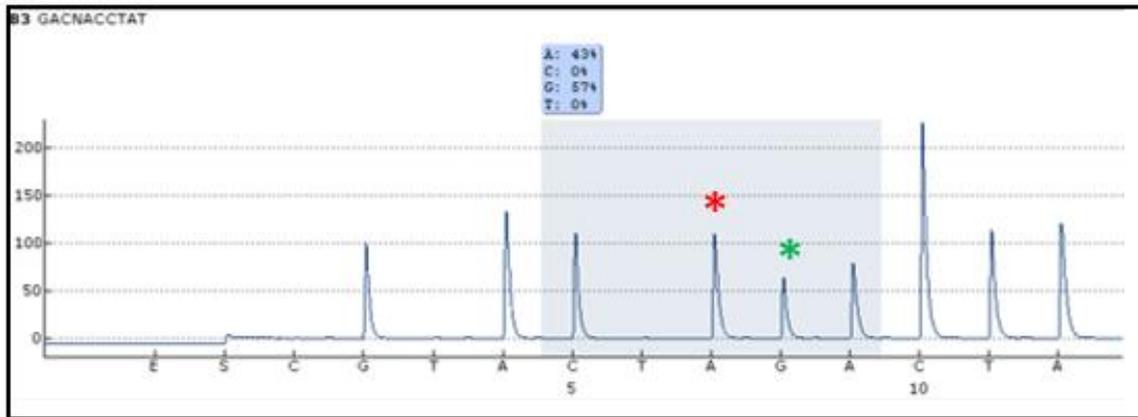
Figure 12. Chondrosarcome dédifférencié présentant une hétérogénéité morphologique (macroscopique (A) et microscopique (B, C)) et mutationnelle (D, E).



B : Territoire dédifférencié accolé à un secteur de grade 1. HPS, x20.

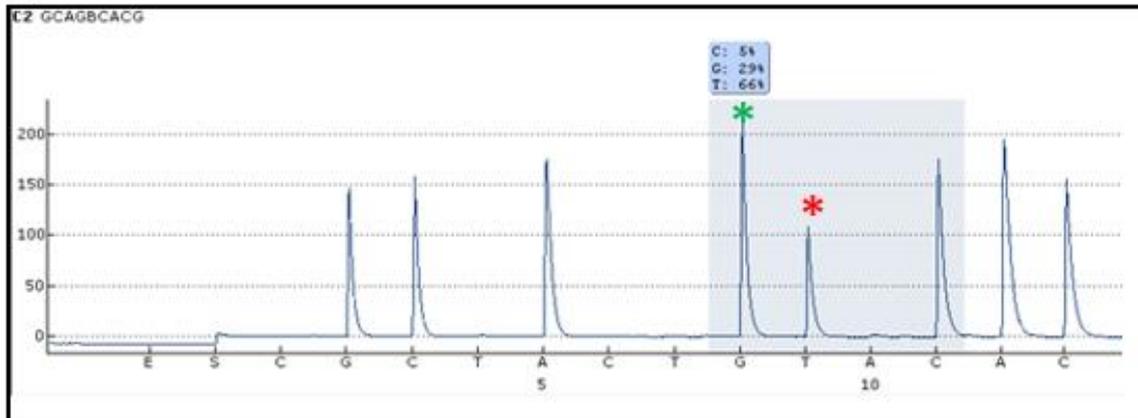
C : Territoires bien différenciés de grades 1 et 2. HPS, x5.

D



IDH1 R132C

E



IDH2 R172S G > T

D : Mutation d'IDH1 R132C : apparition d'un pic d'Adénine () et diminution du pic de Guanine (*). Lecture anti-sens. (Secteurs bien différenciés de grade 1 et 2).*

E : Mutation d'IDH2 R172S G > T : apparition d'un pic de Thymine () et diminution du pic de Guanine (*). Lecture sens. (Secteurs bien différenciés et dédifférenciés).*

Tableau 6. Comparaison des données cliniques chez les patients atteints de chondrosarcomes selon le statut mutationnel pour IDH1 et IDH2 (parmi les chondrosarcomes centraux de bas et haut grades, dédifférenciés et périostés)

	Chondrosarcomes mutés (n=34)	Chondrosarcomes phénotype sauvage (n=44)	Valeur de p
Sexe			0.72
<i>Femme</i>	13	17	
<i>Homme</i>	20	22	
<i>Données ND</i>	1	5	
Age (moyenne)	60	60	0.66
Localisation			0.47
<i>Os longs tubulaires</i>	19	22	
<i>Pelvis</i>	3	5	
<i>Extremités</i>	2	4	
<i>Autres</i>	5	8	
<i>Données ND</i>	5	5	
Formes Primaires	13	23	0.11
<i>CS centraux</i>	12	20	
<i>CS perios</i>	1	3	
Formes Secondaires	5	2	
<i>CS centraux</i>	5	2	
<i>CS perios</i>	0	0	
<i>Données ND</i>	0	1	
Tumeurs Primitives	21	29	0.09
<i>CS centraux</i>	14	21	
<i>CS dediff</i>	6	5	
<i>CS perios</i>	1	3	
Récidives	3	0	
<i>CS centraux</i>	2	0	
<i>CS dediff</i>	1	0	
<i>CS perios</i>	0	0	
<i>Données ND</i>	10	15	

Abbréviations : CS: Chondrosarcome ; Dediff: Dédifférencié ; Perios: Periosté ; ND: Non Disponible.

4- DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré que 43% des chondrosarcomes conventionnels centraux (36% pour les chondrosarcomes centraux de bas grade, 45% pour les chondrosarcomes centraux de haut grade), 47% des chondrosarcomes dédifférenciés et 25% des chondrosarcomes périostés étudiés étaient mutés pour les gènes *IDH1/IDH2*. Les autres sous-types de chondrosarcomes n'étaient pas mutés (chondrosarcomes conventionnels périphériques, à cellules claires, mésoenchymateux, « chondroblastoma-like »). Parmi les autres tumeurs osseuses testées, seuls les chondromes présentaient également des mutations sur le gène *IDH1* (54%, 7/13). Parmi les tumeurs osseuses primitives malignes, la spécificité des mutations d'*IDH1/2* dans les chondrosarcomes était de 100%, puisqu'aucun ostéosarcome (en particulier chondroblastique) ni aucun sarcome indifférencié primitif osseux n'était muté. Ainsi, la recherche des mutations des gènes *IDH1/2* représente un outil diagnostique intéressant dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade et des chondrosarcomes dédifférenciés.

Nos résultats sont concordants avec ceux de Amary et al.⁴⁰ et Kerr et al.⁴⁶ bien que le taux observé de mutations d'*IDH1/2* soit plus faible dans notre étude. Amary et al.⁴⁰ ont mis en évidence le fait que des mutations d'*IDH1/2* étaient présentes dans les tumeurs cartilagineuses centrales (58.9% des chondrosarcomes centraux de haut grade et 56.5% des chondrosarcomes dédifférenciés) et périostées et qu'aucune autre tumeur mésoenchymateuse n'était mutée. Kerr et al.⁴⁶ retrouvaient 61% (14/23) des chondrosarcomes (majoritairement centraux de haut grade) mutés et aucune mutation dans les ostéosarcomes chondroblastiques (n=36).

Le taux plus faible des mutations d'*IDH1/2* dans notre étude nous a amené à nous interroger sur les aspects techniques, notamment sur les méthodes de séquençage et le type de décalcifiant utilisés. 59% (17/29) des échantillons décalcifiés à l'acide chlorhydrique étaient ininterprétables alors qu'aucun de nos échantillons congelés (n=47) n'a conduit à un échec. La détérioration de l'ADN par l'acide chlorhydrique pourrait être à l'origine de faux négatifs (FN), pour lesquels la quantité et/ou qualité de l'ADN étaient suffisantes pour obtenir un résultat interprétable mais où le pourcentage d'allèle muté pouvait être inférieur au seuil de détection (10% d'allèle muté nécessaire en pyroséquençage et 20% en séquençage Sanger). L'un de nos chondrosarcomes muté en pyroséquençage et non muté en séquençage Sanger (FN) illustre cette situation. La proportion des mutations d'*IDH1/2* parmi les chondromes et les chondrosarcomes (conventionnels centraux, périostés et dédifférenciés) était plus faible lorsque les tumeurs étaient décalcifiées à l'acide chlorhydrique (2/7, 29%) que lorsqu'elles étaient fixées non décalcifiées (3/7, 43%, p=1) ou cryopréservées (15/29, 52%, p=0.4). Quatre chondrosarcomes décalcifiés à l'acide chlorhydrique et 11 chondrosarcomes issus de lames blanches archivées depuis plus de 3 mois (dont le taux d'échecs était particulièrement élevé, 55%, 24/44) étaient non mutés et représentaient de potentiels FN. Kerr et al.⁴⁶ ont utilisé des échantillons fixés en formol et inclus en paraffine (n=81) ou congelés (n=9) et ont essayé d'exclure ceux qui avaient subi une décalcification par acide chlorhydrique. Le taux d'échecs était de 34% (31/90) dont 56% (17/31) étaient des échantillons décalcifiés à l'acide chlorhydrique. Parmi les 19 échantillons décalcifiés, 17 (89%) étaient ininterprétables. 93% de leurs résultats interprétables n'avaient pas été décalcifiés, limitant ainsi le risque de FN. Amary et al.⁴⁰ n'ont utilisé que des échantillons fixés et inclus en paraffine dont une majorité avait été décalcifiée par de l'EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetic acid) et une minorité par de l'acide formique (effectifs non précisés) mais aucun avec de l'acide chlorhydrique. Il semble que le statut mutationnel de tous leurs échantillons ait pu être obtenu. Afin de limiter au maximum les FN, l'utilisation de l'acide chlorhydrique doit être remise en question. D'autres décalcifiants comme l'acide formique ou l'EDTA qui détériorent moins les nucléotides sont des alternatives. Cette étude met en relief

l'importance de l'étape pré-analytique pour préserver le matériel et optimiser la mise en évidence de mutations.

Concernant les méthodes d'étude moléculaire, Kerr et al.⁴⁶ ont utilisé une technique snap shot pour *IDH1* et un séquençage Sanger pour *IDH2* lorsque les échantillons étaient de phénotype sauvage pour *IDH1*. Cette technique est moins sensible dans la détection des mutations d'*IDH1/2* que le pyroséquençage, méthode que nous avons utilisée. Amary et al.⁴⁰ ont utilisé une technique Sequenom® high-throughput MASS ARRAY, validée par un séquençage capillaire et/ou une digestion avec une enzyme de restriction spécifique. Cette méthode est plus sensible que le pyroséquençage.

Dans le cadre des tumeurs osseuses et de leur diagnostic différentiel, s'il existait des marqueurs de différenciation cartilagineuse, aucun marqueur spécifique des tumeurs cartilagineuses n'avait été mis en évidence jusqu'à maintenant. L'ezrine et la galectine-1 (GAL-1) sont deux marqueurs immunohistochimiques des ostéosarcomes, pouvant être utilisés dans le diagnostic différentiel entre les ostéosarcomes chondroblastiques et les chondrosarcomes centraux de haut grade. Si pour GAL-1 l'intérêt diagnostique semble être établi, celui de l'ezrine est controversé. Gomez-Brouchet et collaborateurs³⁰ ont montré que la sensibilité de l'expression de GAL-1 dans les ostéosarcomes était de 92%. Ce résultat a été confirmé par Machado et al.³¹ avec une expression de GAL-1 par 78% des ostéosarcomes. En revanche, l'expression de GAL-1 manquait de spécificité puisque 18% des chondrosarcomes conventionnels centraux l'exprimaient dans l'étude de Gomez-Brouchet et al.³⁰ (avec un pourcentage de cellules marquées et une intensité de marquage plus faibles que dans les ostéosarcomes) et 33% dans l'étude de Machado et al.³¹ Concernant l'ezrine, Salas et al.³² ont montré que 62.5% des ostéosarcomes chondroblastiques l'exprimaient, avec une spécificité de 100% par rapport aux chondrosarcomes conventionnels. Ces résultats n'ont pas été validés par l'étude de Machado et al.³³ qui ne retrouvait aucun ostéosarcome chondroblastique (n=5) exprimant l'ezrine. Par contre, 30% des chondrosarcomes conventionnels centraux (n=23) l'exprimaient. Concernant les chondrosarcomes dédifférenciés, GAL-1 comme l'ezrine ne sont pas utiles au diagnostic différentiel avec les ostéosarcomes puisqu'ils sont également exprimés par la composante sarcomateuse de haut grade des chondrosarcomes dédifférenciés. Dans ce contexte, la recherche des mutations d'*IDH1/2* a tout à fait sa place dans l'aide au diagnostic différentiel des chondrosarcomes, en particulier dans le cadre des chondrosarcomes dédifférenciés, dans lequel il n'existe à ce jour pas d'autres outils diagnostiques immunohistochimiques ou moléculaires.

Aucune association entre le statut mutationnel des chondrosarcomes pour les gènes *IDH1/2* et l'âge, le sexe ou la localisation tumorale n'a été mise en évidence. Les trois chondrosarcomes récidivants que nous avons étudiés étaient tous mutés, mais cet effectif trop faible ne permet pas d'en tirer de conclusion. Kerr et al.⁴⁶ ont par ailleurs testé 4 chondrosarcomes centraux de haut grade récidivants dont seulement 2 (50%) étaient mutés (sous-types non précisés).

Nous avons constaté que les chondrosarcomes considérés comme secondaires étaient plus souvent mutés que les chondromes (71% 5/7 vs 54% 7/13, p=0.19), avec une nette prédominance de R132G (86% 6/7, p=0.01). Ce résultat, bien que non significatif, suggère que les mutations d'*IDH1/2* et particulièrement le sous-type R132G, pourraient éventuellement constituer un facteur de risque de transformation des chondromes en chondrosarcomes. L'étude d'une plus grande cohorte pourrait sans doute permettre de répondre à cette question, la difficulté étant d'identifier les chondrosarcomes secondaires, sur des arguments histologiques, macroscopiques ou cliniques, pas toujours présents. Les chondrosarcomes secondaires étaient également plus souvent mutés que les chondrosarcomes considérés comme primaires (71% 5/7 vs 36% 13/36, p=0.11). On peut faire le parallèle avec les glioblastomes qui sont beaucoup plus fréquemment mutés sur le gène *IDH1* lorsqu'ils sont secondaires que primaires (76% vs 5.6%),

mais pas plus que les gliomes de bas grade à partir desquels ils se développent.^{47, 48} Cette observation concernant le statut mutationnel des glioblastomes selon qu'ils sont primaires ou secondaires s'intègre dans des contextes cliniques différents qui permettent de distinguer deux types de population : les glioblastomes primaires touchent plutôt des patients âgés et sont caractérisés par une progression rapide de la maladie et une survie courte alors que les glioblastomes secondaires touchent des sujets jeunes dont la survie est plus longue. Ainsi, les mutations d'*IDHI* pourraient aider à distinguer les glioblastomes primaires et secondaires, notamment quand la preuve histologique de l'évolution à partir d'un gliome n'est pas présente.⁴⁹ Il serait tentant de transposer le même raisonnement aux tumeurs cartilagineuses. Néanmoins, il est beaucoup plus difficile d'évaluer le caractère secondaire d'un chondrosarcome, un enchondrome pouvant rester très longtemps asymptomatique au cours de son évolution. Les territoires enchondromateux peuvent par ailleurs avoir totalement disparu au moment où le diagnostic de chondrosarcome est posé. Le taux de chondrosarcomes développés sur chondromes a ainsi longtemps été très débattu par les auteurs dans la littérature. Dans notre étude, les patients atteints d'un chondrosarcome secondaire n'étaient pas différents des patients atteints d'un chondrosarcome primaire concernant l'âge et la localisation tumorale. Il paraît donc difficile de tirer pour le moment des implications diagnostiques de ces observations comme pour les glioblastomes.

Nous avons testé séparément les composantes bien différenciée et dédifférenciée de 6/34 chondrosarcomes dédifférenciés. Dans 4 cas, les deux composantes avaient un statut mutationnel identique pour les gènes *IDHI/2* (3 cas mutés et 1 cas non muté). Le cinquième cas comportait une composante bien différenciée mutée R132S et une composante dédifférenciée non mutée. Dans la littérature, l'existence d'une mosaïque intra-tumorale concernant le statut mutationnel *IDHI/2* des chondrosarcomes a été étayée. Il s'agit de mosaïques de cellules non mutées/cellules mutées sur le même sous-type de mutation. Ces mosaïques sont décrites dans les enchondromatoses (maladie d'Ollier et syndrome de Maffucci) où l'hypothèse d'une mosaïque somatique due à un événement mutationnel post-zygotique précoce est défendue. Les principaux arguments qui soutiennent cette hypothèse sont que ces pathologies ne sont pas héréditaires, que les enchondromes sont souvent unilatéraux et que lorsque l'on recherche les mutations d'*IDHI/2* dans différentes tumeurs d'un même patient le sous-type de mutation est le même (jusqu'à 6 tumeurs testées).^{50, 51} Ainsi, Pansuriya et al.⁵¹ ont retrouvé la même mutation dans différentes tumeurs de 14 patients sur 16, Amary et al.⁵⁰ chez 15 patients sur 19. Amary et al.⁵⁰ ont également retrouvé des mutations d'*IDHI/2* dans des tissus sains (sang et moelle osseuse) de 2 patients sur 12 testés. Ces mutations étaient les mêmes que celles présentes dans les tumeurs de ces patients. Hao et al.⁵² ont rapporté un cas de patient atteint d'un syndrome de Maffucci qui présentait un chondrosarcome et un adénome pituitaire, tous deux mutés R132C. Le chondrosarcome étant d'origine mésodermique et l'adénome pituitaire d'origine neuroectodermique, cela conforte l'hypothèse d'un événement post-zygotique précoce (antérieur à la gastrulation) à l'origine d'une mosaïque somatique. La mosaïque intra-tumorale a également été mise en évidence par l'immunohistochimie, avec l'anticorps anti-R132H, qui montrait le mélange au sein d'une même tumeur (dont des chondrosarcomes développés sur enchondromatoses ou solitaires) de cellules exprimant R132H et d'autres de phénotype sauvage (50 à 95% de cellules positives).⁵¹ Moriya et al.⁵³ ont également apporté des arguments en faveur de la mosaïque intra-tumorale en réalisant une PCR à partir d'échantillons tumoraux mutés. Les produits de PCR étaient sous-clonés puis séquencés. Seule une partie des clones était mutée.

Le sixième cas de chondrosarcome dédifférencié dont nous avons testé séparément les composantes bien différenciée et dédifférenciée était particulièrement intéressant. Il s'agissait d'une tumeur de la tête humérale. Histologiquement, cette tumeur présentait un aspect hétérogène avec de nombreux territoires bien différenciés de grade 1 dans sa moitié distale, des

territoires de grade 2 dans sa moitié proximale et enfin des foyers dédifférenciés intra-osseux et envahissant les parties molles en regard. Cette hétérogénéité tumorale morphologique était retrouvée au niveau moléculaire. Plusieurs échantillons des composantes bien différenciées de grades 1 et 2 et de la composante dédifférenciée ont été testés. Les trois échantillons issus des composantes bien différenciées étaient pour l'un non muté, pour l'autre muté R132C et pour le 3^{ème} muté R172S. Les deux échantillons testés pour la composante dédifférenciée étaient pour l'un non muté et pour l'autre muté R172S. Parmi notre cohorte de chondrosarcomes conventionnels centraux, nous avons également un cas d'hétérogénéité mutationnelle R132C et R132L sur un même échantillon d'un chondrosarcome de grade 2. Ainsi, à notre connaissance, notre étude est la première à mettre en évidence une hétérogénéité mutationnelle intra-tumorale et la présence concomitante au sein d'une même tumeur de différentes mutations d'*IDH1* et d'*IDH2*. Ces résultats montrent également que les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* ne sont pas toujours mutuellement exclusives.⁵⁴

Dans la littérature, les mutations des chondrosarcomes concernent majoritairement *IDH1*, que ce soit pour les chondrosarcomes conventionnels centraux (97%) ou dédifférenciés (92%).⁴⁰ Dans notre étude, 100% des chondrosarcomes conventionnels centraux et périostés mutés l'étaient sur *IDH1*. En revanche, parmi les chondrosarcomes dédifférenciés mutés, les mutations d'*IDH2* représentaient 41% (7/17, 4 R172S, 2 R172T, 1R172K, p=0.003). La mise en évidence de cette association significative entre les chondrosarcomes dédifférenciés et les mutations d'*IDH2* suggère que les mutations d'*IDH2* pourraient constituer un facteur de risque dans la dédifférenciation des chondrosarcomes conventionnels centraux.

En conclusion, notre étude a permis de confirmer les résultats des précédentes études⁴⁶ quant à l'utilité de rechercher les mutations d'*IDH1/2* dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes centraux de haut grade ainsi que d'affirmer leur intérêt dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes dédifférenciés.

Elle apporte une donnée nouvelle en mettant en évidence une possible hétérogénéité mutationnelle intra-tumorale, avec la présence concomitante au sein d'une même tumeur de différentes mutations d'*IDH1* et d'*IDH2*

Notre étude soulève par ailleurs des hypothèses qu'il serait intéressant de mettre à l'épreuve sur des cohortes plus importantes concernant l'implication pronostique potentielle des mutations d'*IDH1/2* dans les chondrosarcomes. Il s'agit en particulier de l'association des mutations d'*IDH2* avec les chondrosarcomes dédifférenciés et du rôle possible que pourraient avoir ces mutations dans la dédifférenciation des chondrosarcomes conventionnels centraux. De façon moins évidente, ces études pourront également s'intéresser à l'éventuelle association pouvant exister entre les mutations d'*IDH1* R132G et le statut secondaire, souvent difficile à établir, d'un chondrosarcome et à l'implication hypothétique de ce type de mutation dans le processus de transformation d'un enchondrome.

IV. Conclusion

Notre étude confirme la spécificité des mutations d'*IDH1/2* dans les chondrosarcomes, parmi les tumeurs osseuses malignes primitives. Actuellement, il n'existe pas d'autres marqueurs pour les tumeurs cartilagineuses. Ainsi, malgré leur assez faible sensibilité de détection, leur recherche peut constituer une aide non négligeable dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes. Les implications thérapeutiques et pronostiques qui en découlent sont majeures pour la prise en charge des patients.

Le développement du pyroséquençage comme méthode de recherche des mutations d'*IDH1/2* est particulièrement intéressant. C'est une technique rapide, peu coûteuse et efficace avec un seuil de sensibilité de détection des mutations nécessitant 10% d'allèles mutés. Les mutations d'*IDH1/2* étant hétérozygotes et sous forme de mosaïque intra-tumorale, il est primordial que l'ADN utilisé soit le mieux préservé possible afin d'éviter les faux négatifs. Notre étude a montré l'importance de la phase pré-analytique en mettant en évidence une perte importante des échantillons décalcifiés à l'acide chlorhydrique ainsi qu'un taux de mutations plus faible parmi ces derniers que celui des échantillons fixés non décalcifiés ou congelés. Cela peut expliquer en partie notre taux de mutations plus faible que dans d'autres études.^{40, 46} Il est donc nécessaire de mettre en place de nouveaux protocoles utilisant des décalcifiants moins délétères pour les acides nucléiques, comme l'EDTA ou l'acide formique.

Si le concept de mosaïques somatique et intra-tumorale est largement étayé dans la littérature, en particulier concernant les enchondromatoses,^{50, 51, 52, 53} celui d'une possible hétérogénéité mutationnelle intra-tumorale que retrouve notre étude est inédit.

Notre étude a permis de mettre en évidence une association significative entre les mutations d'*IDH2* et les chondrosarcomes dédifférenciés ainsi qu'entre les mutations d'*IDH1* R132G et les chondrosarcomes secondaires. A notre connaissance, ces observations n'avaient jamais été rapportées. Elles soulèvent l'hypothèse que les mutations d'*IDH1/2* pourraient jouer un rôle pronostique dans l'évolution, la progression des chondrosarcomes alors que jusqu'à présent seule leur implication dans la tumorigenèse était évoquée.

V. Références

1. Lichtenstein L, Jaffe HL. Chondrosarcoma of bone. *Am J Pathol.* 1943; 19:553-89
2. De Pinieux G, Bouvier C, Brouchet A. Enseignement post-universitaire, tumeurs et pseudo-tumeurs osseuses. *Académie internationale de pathologie, division française.* 2013; 33-42.
3. Campanacci M. Bone and soft tissue tumors. *New York, Springer.* 1986; 267-304.
4. Lee Fy, Mankin HJ, Fondren G, et al. Chondrosarcoma of bone. An assessment of outcome. *J Bone joint Surg Am.* 1999; 81-A:326-38.
5. Ucla E, Tomeno B, Forest M. Facteurs du pronostic tumoral dans les chondrosarcomes de l'appareil locomoteur. *Rev Chir Orthop.* 1991; 77:301-11.
6. Verdegaal SH, Bovee JV, Pansuriya TC et al. Incidence, predictive factors, and prognosis of chondrosarcoma in patients with Ollier disease and Maffucci syndrome: an international multicenter study of 161 patients. *Oncologist.* 2011; 16:1771-9.
7. O'Neal LW, Ackerman LV. Chondrosarcoma of bone. *Cancer.* 1952; 5:551-577.
8. Bjornsson J, McLeod LA, Unni KK et al. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. *Cancer.* 1998; 83:2105-2119.
9. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. World health organization classification of tumours of soft tissue and bone. 2013; 264-74.
10. Dahlin DC. Bone tumors: general aspect and data on 6221 cases. 1978; 3:190-225.
11. Evans HI, Ayala AG, Romsdahl MM et al. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer.* 1977; 40:818-831.
12. Frassica FJ, Unni KK, Beabout JW et al. Dedifferentiated chondrosarcoma. A report of the clinicopathological features and treatment of seventy-eight cases. *J Bone joint Surg Am.* 1986; 68:1197-1205.
13. Staals EL, Bacchini P, Bertoni F. Dedifferentiated central chondrosarcoma. *Cancer.* 2006; 106:2682-2691.
14. Grimmer RJ, Gosheger G, Taminiau A et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: prognostic factors and outcome from a European group. *Eur J Cancer.* 2007; 43:2060-2065.
15. Anract P, Tomeno B, Forest M. Chondrosarcomes dédifférenciés. Etude de treize cas cliniques et revue de la littérature. *Rev Chir Orthop.* 1994; 80:669-680.
16. Dahlin DC, Beabout JW. Dedifferentiation of low-grade chondrosarcoma. *Cancer.* 1971; 28:461-468.
17. Dickey ID, Rose PS, Fuchs B et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: the role of chemotherapy with updated outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A:2412-2418.
18. Nojima T, Unni K, McLeod RA et al. Periosteal chondroma and periosteal chondrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 1985; 9:666-667.
19. Chaabane S, Bouaziz MC, Drissi C et al. Periosteal chondrosarcoma. *AJR AM J Roentgenol.* 2009; 192:W1-W6.
20. Papagelopoulos PJ, Galanis EC, Mavrogenis AF et al. Survivorship analysis in patients with periosteal chondrosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 448:199-207.
21. Wicklund CL, Pauli RM, Johnston D et al. Natural history study of hereditary multiple exostoses. *Am J Med Genet.* 1995; 55:43-46.
22. Forest M, Tomeno B, Vanel D et al. Diagnosis of tumors and pseudotumoral lesions of bone and joint. Edinburgk London, New York Philadelphia San Francisco Sydney Toronto. Churchill Livingstone. *Orthopedic Surgical Pathology.* 1998; 27-32.

23. Bommer KK, Ramzy I, Mody D. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis and management of bone lesions: a study of 450 cases. *Cancer*. 1997; 81(3):148-56.
24. Kosciak RL, Petersilge CA, Makley JT et al. CT-guided fine needle aspiration and needle core biopsy of skeletal lesions. Complementary diagnostic techniques. *Acta Cytol*. 1998; 42(3):697-702.
25. Anract P, de Pinieux G, Tomeno B. Les chondrosarcomes intra-osseux. *Encycl Méd Chir*. 2001; 14-716 :1-12.
26. Mitchell AD, Ayoub K, Mangham DC et al. Experience in the treatment of dedifferentiated chondrosarcoma. *J Bone Joint Surg*. 2000; 82-B: 55661.
27. Papagelopoulos PJ, Galanis EC, Sim FH et al. Clinicopathological features, diagnosis, and treatment of malignant fibrous histiocytoma of bone. *Orthopedics*. 2000; 23:59-65.
28. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009; 152:3-13.
29. Savage SA, Mirabello L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma* 2011. 2011:54815.
30. Gomez-Brouchet A, Mourcin F, Gourraud PA et al. Galectin-1 is a powerful marker to distinguish chondroblastic osteosarcoma and conventional chondrosarcoma. *Hum Pathol*. 2010; 41(9):1220-1230.
31. Machado I, [López Guerrero JA](#), Navarro S et al. Galectin-1 (GAL-1) expression is a useful tool to differentiate between small cell osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Virchows Arch*. 2013; 462(6):665-671.
32. Salas S, de Pinieux G, Gomez-Brouchet A et al. Ezrin immunohistochemical expression in cartilaginous tumours: a useful tool for differential diagnosis between chondroblastic osteosarcoma and chondrosarcoma. *Virchows Arch*. 2009; 454(1):81-87.
33. Machado I, Navarro S, Giner F et al. Ezrin immunohistochemical expression in chondrosarcomas, osteosarcomas and Ewing sarcoma family of tumors. *Virchows Arch*. 2010; 457:87-89.
34. Vujovic S, Henderson S, Presneau N et al. Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *J Pathol*. 2006; 209:157-165.
35. Rose PS, Dickey ID, Wenger DE et al. Periosteal osteosarcoma: long-term outcome and risk of late recurrence. *Clin Orthop Relat Res*. 2006; 453:314-317.
36. Eefting d, Schrage YM, Geirnaerd MJ et al. Assessment of interobserver variability and histologic parameters to improve reliability in classification and grading of central cartilaginous tumors. *Am J Surg Pathol*. 2009; 33 :50-57.
37. Murphey MD, Flemming DJ, Boyea RS. Enchondroma versus chondrosarcoma in the appendicular skeleton : differentiating features. *Archives de l'AFIP*. 1998 :1213-36.
38. Mirra JM, Gold R, Downs J et al. A new histologic approach to the differentiation of enchondroma and chondrosarcoma of bones. A clinicopathologic analysis of 51 cases. *Clin Orthop*. 1985; 201:214-237.
39. Bovee JVMG, van der Heul RO, Taminiou AHM et al. Chondrosarcoma of the phalanx. *Cancer*. 1999; 86:1724-1732.
40. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol*. 2011; 224:334-343.
41. Yan H, Bigner DD, Velculescu V et al. Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer Res*. 2009; 360:765-773.

42. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemia transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2010; 362:369-370.
43. Damato S, Alorjani M, Bonar F et al. IDH1 mutations are not found in cartilaginous tumours other than central and periosteal chondrosarcomas and enchondromes. *Histopathology.* 2011; 60:363-365.
44. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013; 125(5):621-636.
45. Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP et al. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochimica et biophysica acta.* 2014; 1846:326-341.
46. Kerr DA, Lopez HU, Deshpande V et al. Molecular distinction of chondrosarcoma from chondroblastic osteosarcoma through IDH1/2 mutations. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37(6):787-795.
47. Dang L, Jin S, Su SM. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol Med.* 2010; 16:387-397.
48. Dunn GP, Andronesi OC, Cahill DP. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. *Neurosurg Focus.* 2013; 34.
49. Liu A, Hou C, Chen, H et al. Genetics and epigenetics of glioblastoma: applications and overall incidence of IDH1 mutation. *Frontiers in oncology.* 2016; 6:1-9.
50. Amary F, Damato S, Halai D et al. Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat Genet.* 2011; 43:1262-1266.
51. Pansuriya TC, van Ejjik R, d'Adamo P et al. Somatic mosaic IDH1 or IDH2 mutations are associated with enchondroma and spindle cell hemangioma in Ollier disease and Maffucci syndrome. *Nat Genet.* 2012; 43(12):1256-1261.
52. Hao S, Hong CS, Feng J et al. Somatic IDH1 mutation in a pituitary adenoma of a patient with Maffucci syndrome. *J Neurosurg.* 2015; 1-6.
53. Moriya K, Kaneko MK, Liu X et al. Idh2 and TP53 mutations are correlated with gliomagenesis in a patient with Maffucci syndrome. *Cancer science.* 2014; 105:359-362.
54. Yen KE, Schenkein DP. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations. *The oncologist.* 2012; 17:5-8.

Vu, le Directeur de Thèse

**Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS**

PONROY Bérengère

60 pages – 6 tableaux – 12 figures

Résumé :

Introduction. Les chondrosarcomes centraux représentent environ 20% des tumeurs primitives osseuses malignes. Ils posent différents problèmes diagnostiques au pathologiste en fonction de leur grade histologique (classification de O'Neal et Ackerman). Les chondrosarcomes de grade 1 peuvent être difficiles à différencier d'un enchondrome, les chondrosarcomes de grades 2 et 3 d'un ostéosarcome chondroblastique. Le diagnostic différentiel entre la composante dédifférenciée d'un chondrosarcome et un sarcome indifférencié primitif osseux ou un ostéosarcome de haut grade peut également s'avérer difficile, surtout s'agissant de micro-biopsies. Il est important de distinguer ces différentes entités puisque leur pronostic et leur traitement diffèrent.

Des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* ont récemment été décrites dans les tumeurs cartilagineuses conventionnelles centro-médullaires et périostées. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt de rechercher ces mutations dans le diagnostic différentiel des chondrosarcomes.

Matériels et méthodes. Cette étude a consisté en la recherche des mutations d'*IDH1* et d'*IDH2* dans 116 chondrosarcomes et 88 autres tumeurs primitives osseuses, vus au sein du réseau d'expertise des sarcomes osseux GFPO/RESOS entre 2005 et 2015.

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons tumoraux fixés et inclus en paraffine ou cryopréservés, puis analysé par pyroséquençage après amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). Des échantillons tumoraux mutés ont été également analysés par séquençage Sanger, technique de référence. La recherche de mutations par substitution portait sur l'exon 4 du gène *IDH1* codon R132 et sur l'exon 4 du gène *IDH2* codon R172.

Résultats. La quantité et/ou qualité de l'ADN extrait a permis l'étude de 90 (78%) des chondrosarcomes : 11 chondrosarcomes centraux de grade 1, 29 chondrosarcomes centraux de haut grade (grades 2 et 3), 34 chondrosarcomes dédifférenciés, 4 chondrosarcomes périostés, 2 chondrosarcomes conventionnels périphériques et 10 chondrosarcomes de variantes rares, ainsi que de 83 (94%) autres tumeurs primitive osseuses : 16 sarcomes indifférenciés primitifs osseux, 39 ostéosarcomes (dont 13 ostéosarcomes chondroblastiques), un chordome et 27 tumeurs osseuses bénignes (dont 13 chondromes). 43 % (17/40) des chondrosarcomes conventionnels centraux étaient mutés, avec 100% de mutations sur *IDH1* et une prédominance de R132G (n=7) et R132C (n=6). 47% (16/34) des chondrosarcomes dédifférenciés étaient mutés, avec 41% de mutations sur *IDH2*. Un chondrosarcome périosté sur les 4 testés était muté. Les autres sous-types de chondrosarcomes n'étaient pas mutés. Aucun autre sarcome primitif osseux n'était muté, en particulier aucun ostéosarcome chondroblastique, ni aucun sarcome indifférencié. Parmi les tumeurs bénignes, seuls les chondromes étaient mutés (7/13, 54%).

Conclusion. Parmi les tumeurs primitives osseuses malignes, les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* semblent constituer des marqueurs spécifiques mais de faible sensibilité des chondrosarcomes. En pratique, la recherche de ces mutations peut constituer une aide dans le diagnostic différentiel entre les chondrosarcomes centraux conventionnels et dédifférenciés et les autres sarcomes osseux, ostéosarcomes chondroblastiques et sarcomes indifférenciés en particulier.

Mots clés :

- mutations d'*IDH1* et *IDH2*
- chondrosarcome
- ostéosarcome chondroblastique
- sarcome indifférencié primitif osseux
- hétérogénéité mutationnelle

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Serge Guyétant

Membres : Monsieur le Professeur Gonzague de Pinieux

Monsieur le Professeur Jean-Christophe Pagès

Monsieur le Professeur Philippe Rosset

Madame le Docteur Flore Tabareau-Delalande

Date de la soutenance : 1^{er} juillet 2016

