

Place du séquençage haut débit dans la prise en charge des méningiomes humains

Noémie Basset

▶ **To cite this version:**

Noémie Basset. Place du séquençage haut débit dans la prise en charge des méningiomes humains. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01761473

HAL Id: dumas-01761473

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01761473

Submitted on 9 Apr 2018

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

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

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 6 avril 2018

Par **Mme BASSET Noémie**
Née le 08/09/1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

TITRE : PLACE DU SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DANS LA PRISE EN CHARGE DES MENINGIOMES HUMAINS

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur BADENS Catherine

Membres : Mme le Professeur BARLIER Anne (directrice de thèse)

Mme le Professeur SABATIER Florence

M. le Docteur GRAILLON Thomas

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 6 avril 2018

Par Mme BASSET Noémie
Née le 08/09/1990

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE : PLACE DU SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DANS LA PRISE EN CHARGE DES MENINGIOMES HUMAINS

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur BADENS Catherine

Membres : Mme le Professeur BARLIER Anne (directrice de thèse)

Mme le Professeur SABATIER Florence

M. le Docteur GRAILLON Thomas

Faculté de Pharmacie
Aix+Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Sandrine NOURIAN
Responsable de la Scolarité :	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN Mme Florence SABATIER-MALATERRE
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE	M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Catherine DIANA Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Thierry ATHUYT
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	Mme Camille DESGROUAS

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE

ATER	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1er décembre 2015

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Remerciement

A Madame le Professeur Catherine BADENS, vous me faites l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A Madame le Professeur Anne BARLIER, qui a dirigé mon travail avec beaucoup d'intérêt et d'application. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail à vos côtés. Je vous remercie également pour votre pédagogie, vos conseils toujours constructifs, votre entrain, votre confiance et vos nombreux encouragements.

A Madame le Professeur Florence SABATIER, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance pour l'intérêt que vous avez manifesté pour mon travail.

A Monsieur le docteur Thomas Graillon, merci de m'avoir permis de réaliser ce travail en mettant à ma disposition les données cliniques et les prélèvements nécessaires à ce projet. Merci également d'avoir accepté de participer à ce jury. J'espère que ce travail te donnera entière satisfaction.

Ce projet est un travail d'équipe, et je tiens à ce titre à remercier du fond du cœur Cathy. J'espère que tu as eu plaisir à travailler avec moi, et j'espère avoir de nouveau l'occasion de travailler avec toi.

Merci également à tout le personnel du laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital de la Conception.
- L'équipe biologique : et particulièrement Pauline, pour sa douceur et ses encouragements.
- L'équipe des ingénieurs : et particulièrement Amirette, qui fait partie des belles personnes dont j'ai eu la chance de croiser le chemin.
- L'équipe technique : Merci à tous pour votre gentillesse, et merci à Didine qui m'a transmis, avec beaucoup de délicatesse et d'indulgence, son savoir-faire !!

Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés!!!

A mes parents, Françoise et Fréderic, qui me soutienne et me rassure en toute circonstance. Merci du fond du cœur !!

A mes deux merveilleux frangins, Adrien et Félix!! Et à Lulu et Cynthia Nicole Angélique, merci de prendre soin d'eux.

Merci à mes grands-parents, Léon, Christiane et Mamé, j'espère vous avoir rendu fiers.

Merci aux cousins, sans oublier Luca, le petit dernier !!

Merci à la famille du cœur, les Toussaint, les Nicolas et les Muiras.

Merci aux vieux copains, Aurore, Benjamin, Chloé, Crystal, Floriane, Margaux, Margot, je n'ai pas de mot pour résumer presque 20 ans d'amitié !!!!

Merci aux copains moins vieux mais tout aussi précieux, Auréole, Caro, Chlo, Fannouche et Ju, on a plein de bons moments qui nous attentent, j'ai hâte !!

Merci aux ex-sudistes qui sont parties braver le froid du Nord, Anne-Sophie et Constantine.

Merci à Lisette et à Pascalou, vous avez su être présent dans les bons et les moins bons moments, vous êtes mes deux soleils marseillais !!

Et merci à tous les co-internes, et toutes les personnes qui ont égayé ces années d'internat !!!

Table des matières

1 ère partie : Introduction - États des lieux : méningiomes humains 4
I- Classification 5
1- Grade I : 5
2- Grade II : 6
3- Grade III : 7
II- Epidémiologie 7
1- Généralités 7
2- En France 8
3- Récidives 9
III- Caractéristiques cliniques 10
1- Localisation 11
2- Manifestations cliniques : 12
3- Métastases 12
IV- Caractéristiques biologiques 13
1- Rappel histologique et origine cellulaire des méningiomes : 13
2- Vascularisation et œdème péri-lésionnel 14
3- Réaction osseuse au voisinage et calcification : 15
V- Diagnostic : 15
1- Imagerie 15
2- Marqueur biologique : 16
VI- Traitement : 17
1- La chirurgie : 18
2- La radiothérapie externe : 19
a- La radiochirurgie : 19
b- Radiothérapie conformationnelle en 3D : 20
3- Traitement pharmacologique : 20
2 ème partie : Objectif de l'étude : Recherche de nouveaux marqueurs somatiques et circulants pour une meilleure prise en charge des méningiomes humains 22
I - Analyse de la littérature et sélection bibliographique de marqueurs génique d'intérêt diagnostique et/ou pronostique 22
1- Analyse de la littérature : Prédisposition génétique - mutation constitutionnelle 22
2- Analyse de la littérature : Anomalies moléculaires somatiques 23
a- Etat des lieux 23
b- Emergence de nouvelle voie d'initiation : 25
c- Progression tumorales : 29
3- Des anomalies moléculaires vers de nouveaux marqueurs : 31
a- Corrélations génotype-phénotype : Localisation : 31
b- Corrélations génotype-phénotype : Histologie : 31

c- Corrélations génotype-phénotype : Pronostique : 31
d- Thérapeutique : 32
4- Sélection bibliographique de marqueurs génique d'intérêt diagnostique et/ou pronostique 33
II- Recherche d'une approche innovante par biopsie liquide : 34
1- ADN circulant : Généralité 35
2- Biopsie liquide 36
III- Objectifs : 38
3 ème partie : Matériels et Méthodes 40
I- Matériel : 40
1- Patients 40
2- Recueil de données cliniques 40
3- Matériel 41
II – Méthodes 41
1- Préparation des échantillons : 41
a- Extraction de l'ADN 41
b- Quantification et qualification de l'ADN : 42
2- Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs et de l'ADN circulant par séquençage haut débit 43
a- Principe générale de la méthode 43
b- Préparation des librairies de séquençage haut débit 44
c- Outils bio-informatiques : 47
3- Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs par analyse du nombre de copie du gène NF2 par PCR en temps réel. 51
a- Analyse du nombre de copie du gène NF2 par PCR en temps réel par hydrolyse de sondes - Taqman assay 51
b- Outils bio-informatiques : 51
4- Corrélation génotype-phénotype : Outils statistiques 52
4 eme partie : Résultat 53
I- Présentation des cohortes de patients : 53
II- Validation des librairies de séquençage haut débit : analyse primaire. 56
1- Evaluation de la qualité des séquençages haut débit à partir des données brutes : 56
2- Evaluation de la qualité des séquences produites à partir des données brutes : analyse du score de qualité des séquences : 58
3- Evaluation de la qualité des séquences produites après analyse par le pipeline d'analyse bio-informatique : 58
III- Etude de la cohorte Timone : 59
1- Analyse du nombre de copie du gène NF2 : 59
2- Profil mutationnel des tumeurs obtenu par séquençage haut débit du panel de gènes : 61
a- Mutation du gène NF2 61
b- Mutation du gène TRAF7 62
c- Mutation du gène KLF4 64
d- Mutation du gène AKT1 64

e- Mutation du gène SMO 65
f- Mutation des autres gènes 66
3- Analyse clinicopathologique : 67
IV- Etude de l'ADN circulant tumoral : 69
1- Mise au point de l'extraction d'ADN circulant et qualification: 69
2- Quantification de l'ADN circulant de méningiomes 72
3- Analyse du profil mutationnel de l'ADN circulant obtenu par séquençage haut débit 73
V- Etude de la cohorte CEVOREM : 74
1- Analyse du nombre de copie du gène NF2 : 74
2- Profil mutationnel des tumeurs obtenu par séquençage haut débit : 75
5 ème partie : Discussion 77
6 ème partie : Conclusion et perspective 84
Bibliographie : 86
Annexes: 90

Liste des abréviations :

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

EANO: European Association of Neuro-Oncology

IRM: Imagerie par Résonnance Magnétique

VEGF: Vascular endothelial growth factor

PDGF: Platelet-derived growth factor

EGF: Epidermal Growth Factor

VGF: Vascular growth factor

SST2: Somatostatin receptor subtype 2

PFS: Progression free survival

FERM domaine : four-point-one, ezrin, radixin, moesin domaine

mTOR: mechanistic target of rapamycin

TNF: Tumor necrosis factor

WD 40: Tryptophane (W) et acide aspartique (D) x 40

CEVOREM: Combination of Everolimus and Octreotide LAR in Aggressive Recurrent Meningiomas

SIGNET: SIGnalling in NeuroEndocrine Tumors

CRN2M: Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille

FFPE tissue: formalin-fixed paraffin-embedded tissue

PCR: polymerase chain reaction

UMI: Unique molecular index

FASTQ: format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique, associé à un score de qualité de la séquence

BAM: Binary Alignment Map

BAI: Binary Alignment Map index

VCF: Variant call format

GRCh37/hg19: Genome Reference Consortium Human Build 37/human genome 19

HGVS: Human Genome Variation Society

COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer

dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database

SIFT: Sort Intolerant From Tolerant human Protein

POLYPHEN2: Polymorphism Phenotyping v2

HSF: Human Splicing Finder

RQ: quantité relative

IDH1: ISOCITRATE DEHYDROGENASE 1

BRAF: V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1

EGFR: EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

TP 53: TUMOR PROTEIN p53

MET: MET PROTOONCOGENE

ERBB2: V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2

NF2: NEUROFIBROMIN 2

SMARCB1: SWI/SNF-RELATED, MATRIX-ASSOCIATED, ACTIN-DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY B, MEMBER 1

SMARCE1: SWI/SNF-RELATED, MATRIX-ASSOCIATED, ACTIN-DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY E, MEMBER 1

SUFU: SUPPRESSOR OF FUSED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF

SMO: SMOOTHENED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF

PDGFB: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR, BETA

AKT1: V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1

TRAF7: TNF RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR 7

KLF4: KRUPPEL-LIKE FACTOR 4

PIK3CA: PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA

TERT: TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE

POLR2A: POLYMERASE II, RNA, SUBUNIT A

PTEN: PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOL

CDKN2A: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2A

CDKN2B: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2B

1 ère partie : Introduction - États des lieux : méningiomes humains

Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes extra-parenchymateuses le plus souvent bénignes, développées aux dépens des cellules arachnoïdiennes.
Chez l'adulte, elle constitue la tumeur intracrânienne la plus fréquente, (20 à 30 % des tumeurs primitives cérébrales de l'adulte) [1]. A l'inverse, cette tumeur reste rare chez l'enfant (selon les séries 0,4% à 4,6% des tumeurs cérébrales de l'enfant et l'adolescent). [2]
Le terme de méningiome a été utilisé pour la première fois par Harvey Cushing en 1922. Une classification a été proposée dès 1979 par l'OMS, reposant sur les caractéristiques histologiques spécifiques de ces tumeurs [3]. Dans cette classification, les méningiomes ont été divisés en deux sous-groupes : les méningiomes bénins ou malins. Depuis 2000, les méningiomes sont classés en trois grades de malignité distincts selon l'OMS. Cette classification a depuis connu deux révisons : en 2007, et en 2016 [4-5].

I- Classification

La classification de ces tumeurs repose sur la quantification des critères d'agressivités histologiques potentiels que représentent : une activité mitotique élevée, une forte densité cellulaire de la population tumorale, des atypies architecturales (prolifération en nappes cellulaires compactes) ou cytologiques (rapport nucléo-cytoplasmique élevé, nucléoles proéminents), la présence de nécrose tumorale spontanée (étendue ou localisée), ainsi que l'envahissement du parenchyme cérébral.

Elle permet de classer les méningiomes en trois grades, chaque grade étant corrélé à un potentiel de croissance, de dissémination métastatique et de récurrence ainsi qu'à un pronostic différent. Dans chaque grade tumoral, plusieurs types histologiques sont recensés et possèdent des caractères cytologiques propres [4-5].

1- Grade I :

Il s'agit du grade le plus fréquent, ces méningiomes évoluent généralement comme des tumeurs bénignes [6]. Ils ne possèdent que quelques rares évènements mitotiques (moins de 4 mitoses pour 10 champs). Neuf types architecturaux sont définis au sein de ce groupe. Les trois types architecturaux les plus fréquents sont les méningiomes méningothéliaux, fibroblastiques et transitionnels.

- Méningiome méningothélial : ils sont formés par des plages de cellules méningothéliales. Des pléomorphismes cellulaires peuvent être observés ainsi que des cellules géantes avec noyau unique ou multiple. Cependant ce pléomorphisme n'est pas un signe d'évolutivité maligne. Les plages cellulaires sont entourées par du tissu fibreux plus ou moins abondant.
- Méningiome fibroblastique : ces tumeurs sont composées par des faisceaux de cellules allongées ressemblant aux fibroblastes. Le stroma est souvent riche en collagène et réticuline.
- Méningiome transitionnel : les caractéristiques histologiques de ce type de tumeurs sont une association des caractères des méningiomes méningothéliaux et fibroblastiques.
- Méningiome psammomateux : sa caractéristique principale est la richesse en corps psammeux. Le stroma peut contenir une substance amyloïde.
- Méningiome angiomateux : ils sont formés par de très nombreux vaisseaux, entre lesquels il y a des plages méningiomateuses.
- Méningiome microkystique : macroscopiquement ce type histologique possède souvent une surface luisante. Des formations kystiques peuvent être retrouvées. Les cellules tumorales sont étoilées avec de longs filaments délimitant des espaces clairs et formant des microkystes intercellulaires. Le cytoplasme est éosinophile, vacuolisé.
- Méningiome sécrétant : c'est une forme rare. Il s'agit de méningiomes de type méningothélial ou transitionnel dans lesquels on trouve une différenciation pseudo épithéliale avec des cellules en contenant du matériel sécrétoire éosinophile.
- Méningiome riche en lymphoplasmocytes : ce type est caractérisé par la présence de lymphocytes et de cellules plasmocytaires dans des variants méningothéliaux, fibroblastiques ou transitionnels.
- Méningiomes métaplasiques : les différents variants de méningiomes (méningothéliaux, fibroblastiques) peuvent être associés à des transformations métaplasiques (os, cartilage, lobules adipeux).

2- Grade II :

Cette catégorie de grade tumoral regroupe trois types architecturaux.

- Méningiome atypique : ces tumeurs dérivent des types architecturaux décrits ci- dessus. Quel que soit leur type histologique, un méningiome est dit atypique si on retrouve une invasion du parenchyme cérébral ou, plus de 4 mitoses pour 10 champs mais moins de 20, ou

si on retrouve 3 des 5 critères suivants : cellularité élevée, rapport nucléo cytoplasmique élevé, nucléoles proéminents, perte de l'organisation de l'architecture tissulaire et nécrose.

- Méningiome à cellules claires : ces tumeurs sont constituées par des empilements de cellules polygonales au cytoplasme optiquement vide. Ces cellules ont un cytoplasme clair, résultant d'une accumulation de glycogène.
- Méningiome chordoïde : ces méningiomes renferment des foyers d'aspect histologique similaires à ceux d'un chordome. Ces foyers sont formés de travées de cellules épithélioïdes, éosinophiles et vacuolisées. L'ensemble présente une architecture lobulée. Les lobules sont séparés par de fins septa fibreux. Ces zones chordoïdes coexistent avec des zones de méningiome typique.

3- Grade III :

Il s'agit du grade le plus rare mais le plus agressif. Cette catégorie de grade tumoral regroupe également trois types architecturaux.

- Méningiome anaplasique : ce sont de vraies tumeurs malignes ayant une anaplasie cellulaire, une activité mitotique supérieure aux types atypiques. Les critères d'inclusion de l'OMS sont : plus de 20 mitoses pour 10 champs, caractéristiques histologiques malignes avec des caractères pseudo sarcomateux, pseudo carcinomateux, ou pseudo mélaniques.
- Méningiome papillaire : ces tumeurs sont formées d'une prolifération monomorphe de cellules d'aspect méningothélial pourvues d'un noyau plus rond et uniforme. Leur disposition péri vasculaire, pseudo-papillaire ou en rosettes, est caractéristique.
- Méningiome rhabdoïde : les cellules sont semblables à celles trouvées dans d'autres localisations de tumeurs rhabdoïdes : volumineux noyau excentré avec un nucléole proéminent, cytoplasme éosinophile abondant. Le méningiome rhabdoïde est une tumeur très rare.

II- Epidémiologie

1- Généralités

Bien que considéré comme la tumeur intracrânienne la plus fréquente de l'adulte, les données épidémiologiques concernant les méningiomes sont réduites. En partie à cause du caractère

majoritairement bénin de ces tumeurs qui n'a pas encouragé les différents acteurs de la communauté neuro-oncologique à mener de grandes études épidémiologiques. [6]
On estime l'incidence annuelle de l'ensemble des méningiomes à 6/100 000 habitants. Ils représentent environ 20 à 30 % des tumeurs intracrâniennes primitives et sont identifiés comme plus fréquents entre 55 et 75 ans et chez les femmes avec un sexe ratio de 1/3.
Une augmentation de l'incidence des tumeurs primitives du système nerveux central, en général, et des méningiomes, en particulier, a été observée au cours des dernières décennies dans plusieurs pays. Cela peut s'expliquer par le vieillissement de la population, mais également par le développement de l'imagerie diagnostique.

Les méningiomes de grade I représenterait 80 à 90 % des méningiomes, selon les études, avec une médiane de survie supérieure à 10 ans.
Les méningiomes grade II et III sont des tumeurs plus rares. Ils ont un pronostic plus réservé que celui des méningiomes de grade I. La prévalence de ces tumeurs est difficile à estimer compte tenu du « flou » histopathologique qui existait avant l'année 2000. Les méningiomes de garde II représenterait 5 à 7 % des méningiomes selon les études avec une médiane de survie inférieure à 5 ans et les méningiomes de grade III représenteraient moins de 3 % des méningiomes avec une médiane de survie inférieure à 3 ans. [6] L'âge au diagnostic, la qualité de l'exérèse chirurgicale, le caractère malin du méningiome, et la survenue d'une complication opératoire semblent être des facteurs influençant la survie. [7]

2- <u>En France</u>

En France de 2004 à 2009, 43 929 tumeurs cérébrales primitives ayant une confirmation histologique ont été recensés dont 12363 méningiomes (28 %) par le Recensement National des Tumeurs cérébrales primitives. Ces tumeurs arrivent en seconde position des tumeurs cérébrales en France en termes de fréquence, (derrière les gliomes (42.4 %) pour une population d'adultes et d'enfants), avec un âge médian au diagnostic de 58 ans et un sexe ratio de 1 homme pour 3 femmes. On retrouve 89.7 % de tumeurs de grade I, 8.7 % de grade II et 1.6 % de grade III. [8]

Tableau 1 : tableau extrait du Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central, années 2004 à 2009 [8].

ADICAP		ICD-O SNOMED	NB	HOMME	FEMME	AGE MOY	AGE MED	CRYO	TOTAL	R%	B%
	TUMEURS DES MENINGES										
	TUMEURS DES CELLULES MENINGOTHELIALES										
N0J0	Méningiome (SAI)	9530/0	3416	819	2597	56,90	57,0	394	2302	98,5%	1,5%
N0K2	Méningiome Méningothélial	9531/0	3652	929	2723	57,18	57,0	826	2415	98,6%	1,4%
N0J4	Méningiome Fibroblastique	9532/0	1102	192	910	58,00	58,0	224	785	98,7%	1,3%
N0K4	Méningiome Transitionnel (Mixte)	9537/0	1730	391	1339	57,71	58,0	395	1255	97,8%	2,2%
N0K8	Méningiome Psammomateux	9533/0	480	65	415	61,57	62,0	77	317	98,7%	1,3%
N0J2	Méningiome Angiomateux	9534/0	219	91	128	59,10	58,0	46	153	96,1%	3,9%
N0K9*	Méningiome Variété Rare (SAI)	9530/0	212	42	170	57,77	58,0	30	129	97,7%	2,3%
N0K9	Méningiome Microkystique	9530/0	94	24	70	56,20	56,0	25	75	100,0%	0,0%
N0K9	Méningiome Sécrétoire	9530/0	113	13	100	58,69	57,0	21	76	97,4%	2,6%
N0K9	Méningiome à Stroma Lymphoïde	9530/0									
N0K9	Méningiome à Cellules Claires	9538/1	49	14	35	52,59	52,0	14	42	100,0%	0,0%
N0K9	Méningiome Chordoïde	9538/1	77	21	56	53,47	52,0	15	56	100,0%	0,0%
N0K9	Méningiome Rhabdoïde	9538/3	11	8	3	54,54	61,0	5	6	100,0%	0,0%
N0K3	Méningiome Métaplasique (Chondroïde et Osseux)	9530/0	65	14	51	59,81	59,0	9	44	95,5%	4,5%
N4J0	Méningiome Atypique	9539/1	944	439	505	59,27	61,0	219	547	97,4%	2,6%
N7K6	Méningiome Papillaire	9538/3	14	8	6	46,00	45,0	3	7	100,0%	0,0%
N7J0	Méningiome Anaplasique	9530/3	176	87	89	60,98	62,5	45	90	95,6%	4,4%
N4J9	Méningiomatose	9530/1	9	3	6	51,56	56,0	3	6	100,0%	0,0%
			12363	3160	9203	57,64	58,0	2351	8305		
				25,6%	74,4%			19,0%		98,3%	1,7%

Distribution des tumeurs en fonction, de leurs types histologiques (classification OMS), du sexe, de l'âge médian (AGE MED) et moyen (AGE MOY), NB : nombre total ; SAI : sans autre information.

3- Récidives

Le premier problème posé par les méningiomes est celui de la récidive tumorale après exérèse chirurgicale. Classiquement un méningiome récidivera avec le même grade tumoral, bien qu'une progression vers un grade tumoral supérieur soit possible.

Selon les études les taux de récidives varient mais on estime, pour les méningiomes de grade I, à 10 ans, un taux de récidive après résection totale de 15 à 20%. Et pour les méningiomes de grade II et III, à 5 ans, un taux de récidive de 50 % et de 80% respectivement [9-10]. Ainsi l'association européenne de neuro-oncologie (EANO : European Association of Neuro-Oncology) recommande un suivi par IRM [11]:

- Une fois par an puis tous les deux ans après 5 ans pour un méningiome de grade I
- Tous les 6 mois puis tous les ans après 5 ans pour un méningiome de grade II
- Tous les 3 à 6 mois pour un méningiome de grade III

Les trois grades de malignité ainsi que leurs caractéristiques histologiques et épidémiologiques sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif du grading OMS des méningiomes et de leurs caractéristiques épidémiologiques.

Grade	Sous type histologique	Risque de récidive	Suivie recommandé	Médiane de survie
Grade I : le plus fréquent, il recense 80 % à 90 % des méningiomes, selon les études.	Méningothélial Fibroblastique Transitionnel Angiomateux Psammomateux Microkystique Sécrétant Riche en lymphoplasmocytes. Métaplasique	Faible	Une fois par an puis tous les 2 ans après 5 ans.	> à 10 ans
Grade II : représente 5 à 7 % des méningiomes selon les études.	Atypique Chordoïde A cellules claires	Elevé	2 fois par an puis tous les ans après 5 ans.	Très variable selon les études
Grade III : grade le plus rare mais le plus agressif, on y retrouve moins de 3 % des méningiomes.	Anaplasique Papillaire Rhabdoïde	Très élevé	Tous les 3 à 6 mois.	< à 3 ans

III- Caractéristiques cliniques

Les méningiomes se présentent sous deux formes principales : la plus fréquente, le méningiome "en masse", masse plus ou moins arrondie, parfois polylobée, dont la forme est sous la dépendance des structures de voisinage, en général bien limité.
Plus rare le méningiome "en plaque", qui est un épaississement tumoral de la méninge entrainant une réaction osseuse de voisinage. Quelques formes kystiques ont été décrites. [12]

Leur taille dépend de la précocité du diagnostic clinique, de quelques millimètres de diamètre pour certains méningiomes développés au contact d'un nerf crânien et rapidement diagnostiqués à plusieurs centimètres de diamètre pour certains méningiomes frontaux longtemps asymptomatiques. En effet ce n'est pas le grade tumoral mais la localisation qui conditionne la sémiologie neurologique et explique que le retentissement clinique sera plus précoce si la tumeur se situe à proximité de structures neurologiques à forte expression clinique. Les signes cliniques révélateurs dépendent donc de la localisation et sont les conséquences d'un effet de masse local. [12]

1- Localisation

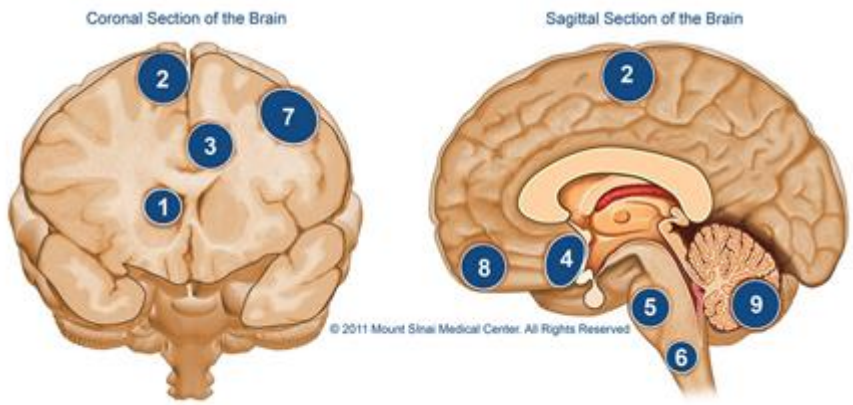
Habituellement, il s'agit d'une tumeur isolé et sporadique. On observe parfois des localisations multiples, généralement dans les formes familiales.

Les méningiomes intracrânien sont ubiquitaire et peuvent se développer à partir de n'importe quelle structure sous arachnoïdienne. On distingue ainsi par une classification anatomique :

- Les méningiomes de la convexité hémisphérique (7 sur la figure 1)
- les méningiomes de la base du crâne (4, 5, 6 et 8 sur la figure 1)
- les méningiomes parasagittaux (2 sur la figure 1)
- les méningiomes de la faux du cerveau (3 sur la figure 1)
- les méningiomes de la fosse cérébrale postérieure (9 sur la figure 1)
- les méningiomes intraventriculaires (1 sur la figure 1)

Chacune de ces variétés étant précisée par la structure anatomique la plus proche (par exemple sinus caverneux, angle ponto-cérébelleux...). [12]

Figure 1 : Coupe frontale et sagittale du cerveau illustrant les différents localisations possibles des méningiomes.



Ils se développent plus fréquemment au niveau de la convexité cérébrale hémisphérique (35%), au niveau de la base du crâne (30%) des cas, et au niveau des sinus parasagittaux ou de la faux (25%) [13], et exceptionnellement au niveau intraventriculaire.

Les localisations extra crâniennes sont moins fréquentes. Il s'agit de méningiomes du canal rachidien, qui représentent 10 % de l'ensemble des méningiomes et environ 30 % des tumeurs intra-canalaires. Ces tumeurs s'observent dans 90 % des cas chez la femme après 40 ans et se localisent au niveau thoracique dans 70 % des cas, au niveau cervical dans 25 % des cas, au niveau lombaire dans 5 % des cas et exceptionnellement dans la région lombo-sacrée. [14]

2- Manifestations cliniques :

Comme dit précédemment les signes cliniques révélateurs dépendent de la localisation, et également de la taille de la tumeur, et sont les conséquences d'un effet de masse local. Ils ne sont pas spécifiques des méningiomes et se rencontrent dans les autres tumeurs intracrâniennes. [12]

Il peut y avoir apparition :

- De douleurs : céphalées diffuses ou localisées, qui s'aggravent régulièrement et sont rebelles aux antalgiques habituels ;
- De douleurs "neurologiques" telles qu'une névralgie faciale ;
- D'une hypertension intracrânienne ;
- De crises d'épilepsies : symptôme le plus fréquent dans le cadre du méningiome ;
- De déficits neurologiques focaux plus ou moins rapidement progressifs, liés directement à la compression du parenchyme cérébral par la tumeur , tous les nerfs crâniens peuvent être touchés et déficitaires ;
- De troubles psychiatriques.

Quelques méningiomes n'ont pas d'expression clinique et sont découverts de façon fortuite au cours d'un examen radiologique réalisé pour un bilan d'une autre affection.

3- Métastases

Les métastases des méningiomes sont rares, même pour les tumeurs les plus agressives, et ne sont décrites que dans 1 % des méningiomes. [16] Les grades élevés ont un potentiel métastatique plus important, mais il est possible de rencontrer des métastases dans des tumeurs de grade I. Le poumon est la localisation préférentielle des implantations

métastatiques mais des lésions ont été retrouvées au niveau du foie, de l'os, de la peau et des tissus mous [15].

IV- Caractéristiques biologiques

1- Rappel histologique et origine cellulaire des méningiomes :

On distingue trois grands groupes de tumeurs intracrâniennes : les tumeurs primitives, les tumeurs secondaires (métastases) et les tumeurs osseuses du crâne.
Les tumeurs primitives sont classées en fonction des éléments histologiques dont elles dérivent. On oppose les tumeurs dérivant du parenchyme cérébral aux tumeurs extra-parenchymateuses. [17] Voir tableau 3.

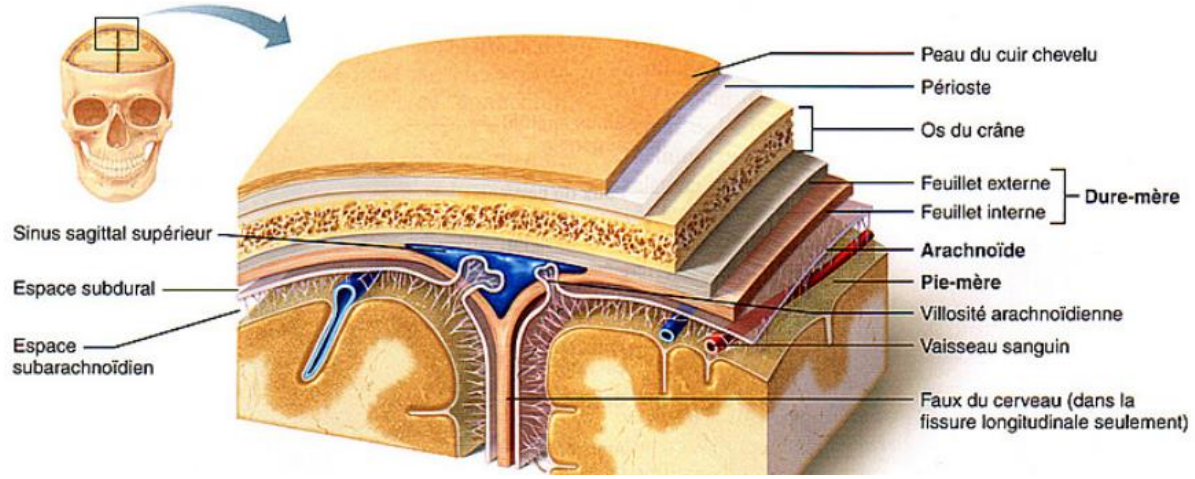
Tableau 3 : Classification histologique simplifiée des principales tumeurs intracrâniennes primitives à l'exclusion des tumeurs embryonnaire d'après The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System.

Tumeurs cérébrales intra parenchymateuses	Tumeurs astrocytaires	Astrocytome Glioblastome
	Tumeurs oligodendrogliales	Oligodendrogliome
	Tumeurs épendymaires	Ependymome
	Tumeurs des plexus choroïdes	Papillome des plexus choroïdes
	Tumeurs neuronales et mixtes glio- neuronales	Neurocytome central Gangliocytome
Tumeurs cérébrales extra parenchymateuses	Tumeurs de la région sellaire	Adénome pituitaire Craniopharyngiome
	Lymphome	Lymphome cérébrale primitif Plasmocytome
	Tumeurs méningés	Hémangioblastome Méningiome Sarcome

Les méningiomes sont des tumeurs méningées, qui dérivent de l'arachnoïde, l'un des trois feuillets constitutifs des méninges.

L'arachnoïde est formée de cellules arachnoïdiennes, de fibres collagènes et de fibres élastiques. Les méningiomes se développent à partir de cellules arachnoïdiennes de l'arachnoïde. Ces cellules arachnoïdiennes forment des lamelles de cellules épithélioïdes aplaties qui sont en fait des fibroblastes modifiés. Elles peuvent porter divers noms : cellules méningothéliales, cellules méningées, ou encore cellules mésothéliales. [18]
Les méningiomes se développent principalement au dépend des cellules formant les villosités arachnoïdiennes, qui s'invaginent en doigt de gant dans les veines et les sinus duraux. Ceci explique leur présence préférentielle au niveau des grandes voies de drainage veineux des méninges (convexité hémisphérique et base du crane).

Figure 2 : Coupe frontal du crane montrant les méninges.



2- Vascularisation et œdème péri-lésionnel

La vascularisation des méningiomes est caractéristique par son double apport :
- en provenance des vaisseaux méningés (carotide externe par exemple) au niveau de la base d'implantation, par le pédicule d'insertion,
- et en provenance des artères corticales par les pédicules de capsule. Ces pédicules de capsule peuvent assurer à la fois la vascularisation de la tumeur et du parenchyme cérébral avoisinant ce qui peut être à l'origine de difficultés de résection et d'ischémie cérébrale. [12]

Certains méningiomes présentent un œdème péri lésionnel. D'importance variable, il n'est pas corrélé au volume de la tumeur, et proviendrait d'un phénomène de sécrétion active par les

cellules tumorales. L'œdème péri lésionnel aggrave généralement les manifestations cliniques (déficits neurologiques focaux) mais ne modifie pas le pronostique.

3- Réaction osseuse au voisinage et calcification :

Ce sont des tumeurs capables, quel que soit leur grade, de provoquer une réaction osseuse au niveau de leur base d'implantation. Généralement il s'agit d'un épaississement de l'os en regard de la tumeur, par un processus hyperostosique, allant parfois jusqu'à former de véritable ostéome. La destruction des structures osseuses est plus rare. Un envahissement osseux pouvant être à l'origine de récidives après exérèse macroscopiquement complète, est possible, indépendamment du grade tumoral.

De même que les craniopharyngiomes et les oligodendrogliomes, les méningiomes sont des tumeurs fréquemment calcifiées, indépendamment du grade tumoral, et du sous type histologique.

V- Diagnostic :

Le diagnostic est suspecté sur les données de l'imagerie sans et avec injection de produit de contraste. Les méningiomes apparaissent classiquement comme des tumeurs rondes isolées, avec un contact étroit avec la dure-mère et un renforcement après injection de produit de contraste, aucun signe radiologique n'est pathognomonique du grade tumoral [25], et le diagnostic ne peut être affirmé que par l'examen histologique de biopsies cérébrales stéréotaxiques ou d'une pièce d'exérèse de la lésion, selon la classification OMS.

1- Imagerie

Bien que non spécifique, c'est la sémiologie, le plus souvent fonctionnelle (déficit neurologique, crise comitiale…), qui fait poser l'indication de l'imagerie cérébrale. Certains méningiomes sont de découverte fortuite par l'utilisation en routine du scanner cérébral et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

L'association européenne de neuro-oncologie (EANO : European Association of Neuro-Oncology) recommande un diagnostic et un suivi par IRM [11], le scanner cérébrale est indiqué en cas de contre-indication à l'IRM.

L'IRM permet de localiser le processus expansif (sus-tentoriel, sous-tentoriel, intra- ou extra-parenchymateux, uni- ou multifocal) ; de préciser ses caractéristiques (prise de contraste homogène ou hétérogène, œdème péri-lésionnel, des calcifications, une nécrose) ; de diagnostiquer certaines complications évolutives de la tumeur (hémorragie, hydrocéphalie) ; de définir la suite de la stratégie diagnostique (biopsie, exérèse), ou d'orienter vers un diagnostic différentiel.
Le scanner garde toute fois un intérêt pour l'analyse plus fine des anomalies osseuses associées aux méningiomes et a recherche de calcifications intra tumorales.

2- Marqueur biologique :

Il n'existe pas de marqueur spécifique aux méningiomes et leur utilité est donc minime dans la classification OMS, la détermination du pronostique et le diagnostic différentiel.
La majorité des méningiomes fixent les anticorps anti-EMA (Antigène Epithélial Membranaire) avec perte d'expression pour les grades plus élevés. Par ailleurs, la réactivité à la vimentine est souvent retrouvée dans toutes les variantes. Cependant, ces données restent non spécifiques. Le marqueur de l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) peut être positif en cas de méningiomes sécrétant et on retrouve une perte d'expression de la phosphatase alcaline de façon significative dans les méningiomes de grade OMS II et III. En pratique, ces marqueurs peuvent être utilisés par les anatomo-pathologistes lors de l'étude histologique des méningiomes pour aider à la détermination du grade tumorale et du sous-type histologique, en plus des techniques de colorations habituelles.

D'autres marqueurs de croissance et de prolifération cellulaire ont été étudiés et décrits dans la littérature, avec des résultats intéressants restant à valider avant d'envisager une application clinique. Notamment l'expressivité des facteurs de croissances et de leurs récepteurs (VEGF, PDGF, EGF, VGF), et des récepteurs hormonaux (progestérone, œstrogènes, androgènes, somatostatine).
Ainsi il est intéressants de noter que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et ses récepteurs sont exprimés par certains méningiomes et participent à la formation des œdèmes

péri-tumoraux. [27] Que la présence de récepteurs à la progestérone a été rapportée dans environ deux tiers des méningiomes, surtout de bas grade et de type méningothélial, et de façon plus fréquente chez la femme que chez l'homme. [19]
Et enfin que le récepteur SST2 de la somatostatine, habituellement exprimé au niveau de l'axe hypothalamo- hypophysaire, est fortement exprimé par les méningiomes. [28]

Enfin comme pour beaucoup d'autres tumeurs, l'activité télomérase apparaît corrélée avec le grade histologique et l'agressivité tumorale des méningiomes. Elle est peu fréquente dans les méningiomes bénins mais pourrait, lorsqu'elle est présente, avoir une valeur prédictive de récidive. [19]

En pratique, pour apprécier l'agressivité d'un méningiome en dehors du grade tumoral, le seul marqueur utilisé est le Ki-67. Il s'agit d'un antigène nucléaire qui persiste tout au long des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2, M), mais est absent en phase G0. Il permet une estimation du taux de prolifération des cellules tumorales. La détermination de l'index Ki-67 se fait par une technique immunohistochimique en comptant le pourcentage de cellules tumorales dont le noyau a été marqué par des anticorps anti Ki-67. Le résultat est exprimé en pourcentage de cellules tumorales positives, et ne rentre pas en compte dans la détermination du grade tumoral, mais doit être vu comme un marqueur complémentaire du grading. Des taux plus élevés tendent à être corrélés à un grade tumoral, à une extension plus grande et à un risque de récurrence accru. [29] Des valeurs moyennes de Ki-67 selon les grades de la tumeur ont été définie, on estime une valeur moyennes de 3,8% pour les méningiomes de grade I, de 7,2% pour les méningiomes de garde II et de 14,7% pour les méningiomes de grade III.

VI- Traitement :

Actuellement la prise en charge thérapeutique du patient comprend trois volets : la surveillance, la chirurgie et la radiothérapie seule ou en adjuvant après la chirurgie. Le traitement est dépendant de plusieurs critères, il doit être planifié au cas par cas par une concertation pluridisciplinaire. L'âge, l'état général du patient, la localisation de la tumeur et sa taille, et le retentissement clinique sont à prendre en compte. A ce jour la chirurgie reste

l’option de choix dès que cela est possible. Il n'existe pas actuellement de chimiothérapie efficace dans le traitement des méningiomes.

L’association européenne de neuro-oncologie (EANO : European Association of Neuro-Oncology) recommande :

- En cas de méningiome asymptomatique : une abstention thérapeutique avec une simple surveillance.
- En cas de méningiomes symptomatique : une chirurgie quel que soit le grade tumorale, quand celle-ci est possible (en fonction de l’état général du patient, et de la localisation de la tumeur). Cette chirurgie peut être associée à une radiothérapie en fonction du grade tumoral et du degré de résection de la tumeur.
- En cas de méningiomes symptomatique : lorsque la chirurgie n’est pas envisageable : une radiochirurgie ou une radiothérapie.
- En cas de méningiomes symptomatique : si aucune option chirurgicale ou radio thérapeutique n’est possible : un traitement pharmacologique expérimental peut être envisagé.

1- <u>La chirurgie :</u>

C'est le seul traitement curatif mais elle connait des limites qui sont liées à la taille de la tumeur, sa localisation, l’adhésion à des structures vitales (englobement d’artères majeures et de nerfs crâniens), ou l’invasion extensive des structures adjacentes (envahissement osseux, envahissement sinus veineux).
La qualité de l’exérèse chirurgicale est appréciée par le neuro-chirurgien à l’aide de la classification SIMPSON (SIMPSON, 1957) qui définit cinq grades en fonction de la qualité de l'exérèse, et conditionne la suite de la prise en charge.

Tableau 3 : Classification SIMPSON : appréciation de la qualité de l'exérèse chirurgical :

Grade	Définition
Grade I	Exérèse macroscopiquement complète intéressant l'attache durale et éventuellement l'envahissement osseux
Grade II	Exérèse macroscopiquement complète avec coagulation de l'insertion durale
Garde III	Exérèse macroscopiquement complète sans coagulation de l'insertion durale ou sans résection de l'envahissement osseux
Grade IV	Exérèse incomplète
Grade V	Simple biopsie.

Le degré de résections doit être confirmé par IRM, les grades de résection I, II et III correspondent à une résection complète.
En fonction du grade tumoral et du degré de résection de la tumeur, une radiothérapie ou un radiochirurgie peut être associée.

La chirurgie des formes récidivantes est plus délicate, avec des zones adhérentes, remaniées. Il existe alors un risque accru de complications postopératoires : ischémie, oedème et déficits neurologiques, on lui préférera alors la radiothérapie.

2- La radiothérapie externe :

a- La radiochirurgie :

La radiochirurgie est une technique de radiothérapie externe en conditions stéréotaxiques. C'est-à-dire que les rayons sont produits par un accélérateur linéaire de particules et que la position de la structure à irradiée est définie grâce à un système de coordonnées dans l'espace au moyen d'un système de contention sur le crâne du patient et de moyens d'imagerie médicale (IRM, tomodensitométrie, radiographie, etc.) pour extraire des repères dans l'espace.

L'irradiation est réalisée en une séance unique. Elle nécessite : une contention (soit un cadre implanté dans la table externe osseuse du crâne, soit un masque thermoformé repositionnable), un système d'irradiation spécifique (soit un Gammaknife® avec sources de Cobalt, soit un accélérateur de photons) et un système de contrôle stéréotaxique (dans les 3 axes de l'espace). C'est une technique de très haute précision, qui permet de diminuer les

marges d'incertitude et de limiter le volume sain irradié. Elle permet ainsi de délivrer par la convergence de multiples faisceaux, la dose de rayonnement à haute énergie dans le volume cible, avec une diminution très brutale de la dose en dehors de ce volume.

La radiochirurgie est donc une option de choix s'il reste un résidu après exérèse, que la lésion est petite, et bien définie dans l'espace.

La radiochirurgie est également l'option de choix pour certaine petite tumeur de grade I inaccessible ou dangereusement accessible à la chirurgie en prévention de complications secondaires.

On parle de radiothérapie stéréotaxique fractionnée lorsque l'irradiation est délivrée en plusieurs séances, cette option est envisagée en fonction de l'environnement fonctionnel (par exemple méningiome développé à proximité des voies visuelles) et de la taille importante de la tumeur. [30]

b- Radiothérapie conformationnelle en 3D :

Comme pour la radiochirurgie ou la radiothérapie stéréotaxique fractionnée, il s'agit d'une radiothérapie externe, les rayons sont produits par un accélérateur linéaire de particules, mais on travaille à partir d'images 3D de la tumeur et des organes avoisinants. Ces images sont, la plupart du temps, obtenues par scanner ou par IRM. Des logiciels permettent ensuite de simuler, en 3D, la forme des faisceaux d'irradiation et la distribution des doses de rayons. Cette technique de radiothérapie parait plus appropriée pour les méningiomes malins aux limites floues et avec possible envahissement du parenchyme cérébral, ou en cas de récidive chez un méningiome déjà traité par radiochirurgie ou radiothérapie stéréotaxique fractionnée. [30]

3- Traitement pharmacologique :

Il n'existe pas actuellement de traitements pharmacologiques recommandés dans la prise en charge des méningiomes. Un traitement peut être proposé au patient comme alternative thérapeutique lorsque les thérapies conventionnelles ont échoué et ne peut être administré que dans le cadre de protocoles.

On estime que la survie sans progression à 6 mois (PFS-6) est le meilleur marqueur de l'efficacité du traitement et doit être comme référence pour les essais cliniques. La PFS-6 est estimé à 29% pour les méningiomes de grade I et 26% pour les grades II et III. Une PFS-6 supérieur à 40% pour les tumeurs de grade I et supérieures à 30% pour les grades II et III indique une efficacité du traitement. A ce jour aucun traitement pharmacologique n'a pu être identifié. [31]

Actuellement au niveau international, 140 essais thérapeutiques sont recensés sur la base de données ClinicalTrials.gov., dont 2 essais en France (voir tableau 4).

Tableau 4 : essais thérapeutiques dans le traitement pharmacologique des méningiomes en France recensés sur la base de données ClinicalTrials.gov, en 2018

Titre de l'étude	Molécules testées	Lieux de l'étude
Combination of Everolimus and Octreotide LAR in Aggressive Recurrent Meningiomas	Octréotide et évérolimus	Assistance publique des hôpitaux de Marseille Assistance publique des hôpitaux de Paris , France
Hydroxyurea in Treating Patients With Recurrent and/or Unresectable Meningioma	Hydroxyurée	Hôpital Saint André - Bordeaux, France Centre Léon Bérard- Lyon, France Centre Régional de Lutte Contre le Cancer - Centre Val d'Aurelle - Montpellier, France

On peut séparer ces essais en deux catégories :

- les essais portant sur les chimiothérapies de type classique : Interféron alpha, Irinotécan, Témozolomide, Hydroxyurée…
- et les essais portant sur des thérapies ciblées s'appuyant sur des découvertes récentes améliorant la compréhension de ces tumeurs : anti-angiogénique (bevacizumab), thérapies hormonales (mifepristone), analogue de la somatostatine (octréotide), Vismodegib…

2 ème partie : Objectif de l'étude : Recherche de nouveaux marqueurs somatiques et circulants pour une meilleure prise en charge des méningiomes humains

Les méningiomes intracrâniens sont des tumeurs majoritairement bégnines, cependant la prise en charge de ces tumeurs est délicates :

- De par leur localisation cérébrale qui conditionne la prise en charge thérapeutique, et les options thérapeutiques qui sont limitées par l'absence de traitement pharmacologique efficace.
- De par leur agressivité tumorale qui demeure imparfaitement évaluée avec une récidive possible même après résection chirurgicale complète.
- Et de par l'augmentation de la découverte fortuite de méningiomes asymptomatiques avec l'avènement de l'imagerie radiologique et la difficulté d'évaluer la nécessité d'une prise en charge thérapeutique précoce.

Dans d'autres tumeurs du système nerveux central (gliome, épendymome et médulloblastome), l'étude moléculaire de ces tumeurs a permis de distinguer différents sous types ayant des caractéristiques propres, associés à des pronostics et des thérapeutiques différents. Ces marqueurs, tel que par exemple le gène *IDH1*, font désormais partie intégrante de la classification OMS 2016 de ces tumeurs et ont trouvé leur place dans les laboratoires de routine. Par conséquent il serait intéressant d'évaluer de nouveaux marqueurs moléculaires d'intérêt diagnostic et/ou pronostique dans les méningiomes.

I - Analyse de la littérature et sélection bibliographique de marqueurs génique d'intérêt diagnostique et/ou pronostique

La grande majorité des méningiomes surviennent de façon isolé et sporadique, mais il existe de rares cas familiaux.

1- Analyse de la littérature : Prédisposition génétique - mutation constitutionnelle

On retrouve plusieurs syndromes de susceptibilité tumorale incluant des méningiomes. Le syndrome le plus fréquent est la neurofibromatose de type II avec une incidence de 1/33000 naissances. C'est une affection autosomique dominante liée à des mutations constitutionnelles inactivatrices du gène NF2, situé sur le chromosome 22q12, elle associe des atteintes

neurologiques, cutanées et oculaires, la sévérité des manifestations cliniques varie d'un patient à l'autre mais la pénétrance à 60 ans est presque de 100 % [35]. Des méningiomes ont également été décrits dans la maladie de Von Hippel Lindau, le syndrome de Li Fraumeni, le syndrome de Cowden, ou encore le syndrome de Gorlin; mais de façon plus anecdotique.

Des mutations constitutionnelles du gène SMRACE1 (codant pour une protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne), ont été décrites dans une famille présentant de multiples méningiomes spinaux à cellules claires. [32] A ce jour au niveau somatique, aucune mutation de ce gène n'a été rapportée. L'étude d'une famille présentant de multiples méningiomes a mis en évidence une mutation inactivatrice dans le gène *SUFU* (impliqué dans la voie de signalisation Hedgehog) associé à une mutation du gène *PDGFB* [33]. Des mutations constitutionnelles du gène *SMARCB1* (codant pour une protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne) ont également été décrites dans deux familles de patients, une associant des schwannomes et de multiples méningiomes et l'autre présentant uniquement de multiples méningiomes [34].

2- Analyse de la littérature : Anomalies moléculaires somatiques

Au niveau somatique, les gènes fréquemment impliqués dans l'oncogenèse des autres tumeurs cérébrales en particulier les gliomes (tels que *BRAF, EGFR, TP53, MET, ERBB2, IDH1*) ne sont pas mutés dans les méningiomes.

a- Etat des lieux

D'un point de vue cytogénétique, la découverte en 1972 de la monosomie (totale ou partielle) du chromosome 22 est la première anomalie génétique décrite dans les méningiomes sporadiques. [20] Cette perte chromosomique est retrouvée dans 40% à 60% des méningiomes sporadiques, elle est à l'origine de la perte du gène suppresseur de tumeur, le gène *NF2* localisé en 22q12.2. Cette monosomie est associée dans la majorité des cas à une mutation du gène NF2 situé sur l'autre allèle.

On retrouve des mutations du gène *NF2* dans 50 % des méningiomes. [36] Le gène *NF2* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 22, le plus souvent, il s'agit de mutations non-sens, de microdélétions ou d'insertions, ou de mutation au niveau d'un site

d'épissage, résultant en une protéine tronquée et non fonctionnelle. Jusqu'à récemment, en dehors du gène *NF2*, aucun autre gène intervenant dans la tumorigénèse des méningiomes n'avait été identifié. L'avènement des techniques de séquençages hauts débits a révolutionné la compréhension des fondements génétiques des méningiomes sporadiques et de nouvelles voies oncogéniques alternatives ont récemment émergées.

En 2013, une équipe a étudié par séquençage du génome une série de 17 méningiomes, puis par séquençage ciblé une série de 48 méningiomes pour valider les altérations génétiques somatiques retrouvées. Cette étude a identifié une inactivation de *NF2* dans 43% des tumeurs, et des mutations oncogéniques récurrentes dans le gène *AKT1* (p.Glu17Lys) et le gène *SMO* (p.Trp535Leu) dans des méningiomes non mutés NF2, avec des preuves immunohistochimiques d'activation de ces voies. Enfin cette étude a conclu que la plupart des méningiomes avaient moins de mutations, de réarrangements et d'altérations du nombre de copies que dans d'autres tumeurs de l'adulte. [37]
En 2013 également, une autre étude a analysé par séquençage de l'exome 50 méningiomes, et par séquençage ciblée une série de 250 méningiomes. Des mutations du gène *NF2* ont été retrouvées dans 36 % des tumeurs. Cette étude a conduit à la découverte de mutations du gène *SMARCB1* en association avec des mutations du gène *NF2*. Dans les tumeurs non mutées NF2, cette équipe a identifié la mutation oncogénique récurrente dans le gène *AKT1* (p.Glu17Lys) dans 13 % des tumeurs, des mutations oncogéniques récurrentes dans le gène *SMO* (p.Trp535Leu et p. Leu412Phe) dans 5 % des tumeurs, et a conduit, à la découverte de mutations dans le gène *TRAF7* dans presque 25% des tumeurs, et à la découverte d'une mutation récurrente (p.Lys409Gln) dans le gène *KLF4*. Les mutations du gène *TRAF7* survenaient généralement associées à la mutation oncogénique récurrente dans le gène *AKT1* (p.Glu17Lys) ou à la mutation récurrente (p.Lys409Gln) dans le gène *KLF4*. [38]

En 2016, une équipe japonaise a confirmé par séquençage ciblée de 103 méningiomes, la présence de ces altérations génétiques dans ces tumeurs, en observant des mutations dans le gène *NF2* dans 38 % des tumeurs, et des mutation dans les gènes *TRAF7, KLF4, AKT1* et *SMO* dans respectivement 16 %, 8 %, 5 % et 1 % des tumeurs.
Une autre équipe a identifié par l'étude de 150 méningiomes, des mutations du gène *PIK3CA* dans 10.7 % des tumeurs de la cohorte. Ces mutations semblent survenir en association avec des mutations du gène *TRAF7*, des mutations du gène *NF2*, et plus rarement seule. [39]

Enfin une étude s'intéressant aux hotspots mutationnels du promoteur du gène *TERT* (g.1,295,228C>T et g.1,295,250C>T) dans 252 méningiomes, a rapportée des mutations dans 16 échantillons (soit 6,4% dans la cohorte). Ces mutations étaient présentes respectivement dans 1,7%, 5,7% et 20,0% des grades I, II et III de l'OMS. [40]

Dernièrement, une étude visant à identifier les altérations oncogéniques, autre que celles déjà décrites, par l'étude de 775 méningiomes, a conduit à la découverte de mutations somatiques récurrentes dans le gène *POLR2A* dans ~ 6 % des tumeurs. Ces mutations de *POLR2A* n'ont pas été retrouvées en association avec les autres mutations précédemment décrites. [41]

b- Emergence de nouvelle voie d'initiation :

Plusieurs voies d'initiation tumorale semblent se dessiner dans la littérature, avec pour certaines la co-occurrence de mutations dans des gènes différents.

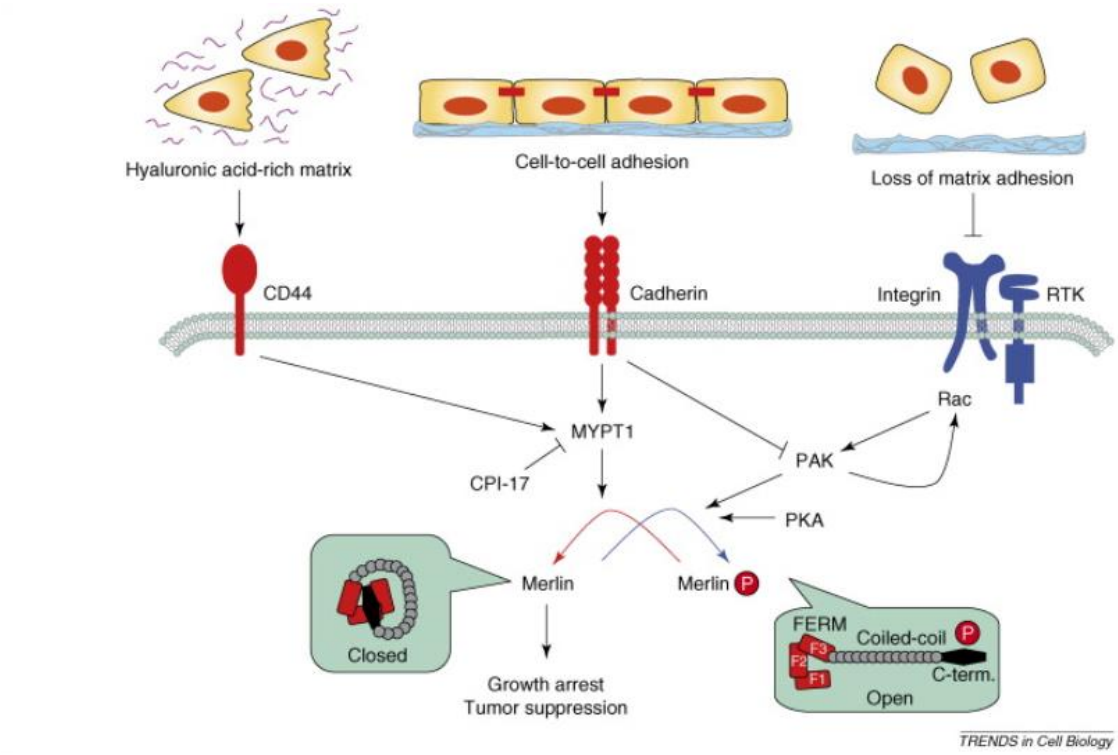
- La première bien documentée, impliquant le gène *NF2*.

Le gène *NF2* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 22, il code pour une protéine de structure du cytosquelette appelée Merlin (Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein), également connue sous le nom de Schwannomin, qui contient un domaine protéique conservé FERM, impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires. Le plus souvent, il s'agit de mutations non-sens, de microdélétions ou d'insertions, ou de mutation au niveau d'un site d'épissage, résultant en une protéine tronquée et non fonctionnelle. Habituellement, l'inactivation du second allèle portant le gène *NF2*, se fait par la perte de tout ou partie du chromosome 22. Rarement l'inactivation des deux allèles peut être due à des mutations du gène sur les deux allèles, ou des délétions d'exons. Une étude s'intéressant aux désordres chromosomiques entre les tumeurs mutées NF2 et les tumeurs non mutées NF2, a conclu à une instabilité chromosomique accrue dans les tumeurs mutées NF2.
Cette protéine localisée à la face interne de la membrane cytoplasmique, appartient à la famille des protéines ezrine-radixine-moezine (ERM), elle ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque, mais agirait comme une protéine de liaison entre les protéines de la membrane plasmique et celles du cytosquelette. Son mode d'action, encore imparfaitement élucidé est complexe, mais elle jouerait un rôle primordiale dans l'inhibition de contact : lorsque la densité cellulaire augmente, la merlin, par l'interaction avec des protéines

transmembranaires, est activée par déphosphorylation. Il en résulte alors une cascade de signaux intracellulaire aboutissant à l'arrêt de la croissance cellulaire. [20] À l'opposé, en situation de faible densité cellulaire, la merlin phosphorylée, forme un complexe permissif pour le signal mitotique. Merlin serait impliquée dans différentes voies de signalisation tel que la voie Hippo, la voie Patched et la voie Notch. Cette protéine serait également impliquée dans la régulation de la voie mTOR via l'inihibition de mTORC1 et l'activation de mTORC2. Enfin, elle serait impliquée dans l'inhibition de la FAK (focal adhesion kinase) et de son activité proliférative via les intégrines.

Des mutations inactivatrices de cette protéine ont été rapportées dans d'autre tumeurs du système nerveux central (schwannomes et épendymome), mais également dans d'autre types de cancers, notamment dans les mésothéliomes, les cancers anaplasiques de la thyroïde, cancers du sein, cancers de l'endomètre et du foie.

Figure 3 : Illustration schématique du rôle de la merlin dans l'inhibition de contact. *Shedding light on Merlin's wizardry. Tomoyo Okada et al. 2007* [24]



- La seconde, de découverte récente, impliquant les gènes *TRAF 7* et/ou *AKT1*, ou *TRAF7/KLF4*, ou *TRAF7*et/ou *PIK3CA*.

Le gène *TRAF7* est un gène situé sur le chromosome 16, il code pour la protéine E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7 qui est une protéine pro-apoptotique membre de la superfamille des TNF récepteur et possède 7 domaines WD40 en C-terminal. C'est une protéine transductrice de signal, elle possède une activité d'ubiquitine ligase permettant son auto ubiquitination après phosphorylation par MAP3K3, et active plusieurs voies dont celle du régulateur de la transcription NF-kappa-B et la voie MAP-Kinase. Elle induit l'apoptose après une surexpression. [45] Il s'agit d'une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme, en oncologie peu de mutation du gène ont été recensées en dehors des méningiomes, une étude retrouve des mutations de ce gène dans 2.3 % des mésothélium. [46] Les mutations du gène *TRAF7* retrouvées dans les méningiomes se situent dans les parties codantes pour les domaines WD 40. Ces mutation ont été retrouvées seules ou en association avec des mutations du gène *KLF4* ou *AKT1*. [49]

Le gène *KLF4* est situé sur le chromosome 9, il code pour une protéine contenant un domaine en doigt de zinc, appartenant à la famille des facteurs de transcription Kruppel. Cette protéine contrôlerait la transition G1-à-S du cycle cellulaire à la suite de l'endommagement de l'ADN par la médiation du gène suppresseur de tumeur p53 et la différenciation dans de nombreux types de cellules. C'est l'un des 4 facteurs permettant la reprogrammation des cellules adultes en cellules souches somatiques pluripotentes. Il s'agit d'une protéine exprimée de façon préférentielle au niveau du colon, de l'estomac et de l'œsophage. Les méningiomes mutés *KLF4* présentent la même mutation K409Q (p.Lys409Gln), situé dans le domaine de liaison de l'ADN, et toujours en association avec une mutation du gène *TRAF7*. En oncologie en dehors des méningiomes, cette mutation n'a jamais été rapportée.

Le gène *AKT1* est situé sur le chromosome 14, il code pour une serine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) et appartient à la voie de signalisation PIK3-AKT -mTOR qui régule de nombreux processus biologiques, y compris la prolifération, la croissance, et l'apoptose. Elle possède un domaine PH (domaines homologues de la pleckstrine) qui se lie aux membranes par l'intermédiaire de son substrat, nécessaire au fonctionnement de l'enzyme. Il s'agit d'une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. Tous les méningiomes AKT1-mutés présentent la même mutation activatrice située dans le domaine PH : AKT1 E17K (p.Glu17Lys). Cette mutation a été découverte par Carpten et al. en 2007 et est retrouvée dans 8% des cancers du sein, 6% des cancers du côlon

et 2% cancers de l'ovaire [47]. Dans les méningiomes, cette mutation a été retrouvée dans plus de la moitié des cas en association à une mutation du gène TRAF7. [49]

Le gène *PIK3CA* est situé sur le chromosome 3, et code pour la sous unité catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase qui appartient à la voie de signalisation PIK3-AKT -mTOR et qui régule de nombreux processus biologiques, y compris la prolifération, la croissance, et l'apoptose. Elle est composée d'un domaine catalytique Kinase, un domaine hélicoïdal, impliqué dans la stabilisation de la protéine, un domaine C2, impliqué dans la liaison membranaire, et un domaine de liaison à Ras, domaine de régulation de la protéine. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et bien connu en oncologie, car de nombreuses mutations ont été rapportées dans divers cancers. [51] Dans les méningiomes, les mutations E545K (p.Glu545Lys : domaine hélicoïdal) et H1047R (p.His1047Arg : domaine catalytique) ont été observées de façon plus fréquente.

- La troisième, de découverte récente, impliquant le gène *SMO*.

Le gène *SMO* est situé sur le chromosome 7, il code pour une protéine transmembranaire de type récepteur couplé aux protéines G, qui appartient à la voie de signalisation Hedgehog, qui joue un rôle clé dans l'embryogenèse et est impliqué dans plusieurs processus incluant la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et l'organisation de la matrice extracellulaire. Il s'agit d'une protéine exprimée de façon préférentielle au niveau de l'endomètre, des ovaires, de la peau, des reins et de la prostate. Un dérèglement de la voie de signalisation Hedgehog est connu pour être impliqué dans plusieurs cancers, en particulier dans les carcinomes basocellulaires et les medulloblastomes [48]. Dans les méningiomes, les mutations du gène *SMO* se situe principalement sur deux hot-spot mutationnels : L412F (p.Leu412Phe) et W535L (p.Trp535Leu), situé dans les domaines transmembranaires. [49]
Il est intéressant de noter que des mutations du gène *SUFU*, impliqué également dans la voie de Hedgehog ont été rapporté au niveau constitutionnel dans une famille présentant de multiples méningiomes [23].

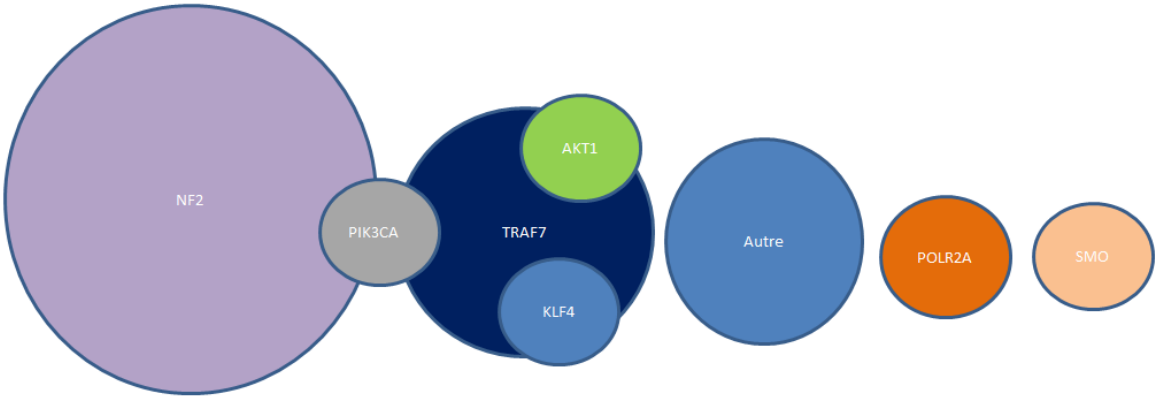
- La quatrième et dernière voie découverte, impliquant le gène *POLR2A*.

Le gène *POLR2A* est situé sur le chromosome 17, il code pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, responsable de la synthèse de l'ARN messager chez les eucaryotes. Il s'agit d'une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. En oncologie, aucune

mutation de ce gène n'avait été encore rapportée. Dans les méningiomes, des mutations somatiques récurrentes p.Gln403Lys ou p.Leu438_His439del ont été décrites. [41]

D'autres voies restent encore à découvrir puisque actuellement, aucune mutation n'a été identifiée dans environ 20 % des méningiomes [49]. On peut résumer ces différentes voies de façon schématique : voir figure 4.

Figure 4 : Représentation schématique des différents gènes impliqués dans l'initiation tumorale de méningiomes sporadiques :



c- Progression tumorales :

Indépendamment des voies d'initiation tumorale, d'autres voies semblent être plutôt impliquées dans la progression tumorale.

- Des mutations du gène *SMARCB1 et* du promoteur du gène *TERT*, ont été rapportées en association avec des mutations du gène *NF2* ou des mutations du gène *TRAF7*, ou n'ont jamais été rapportées seuls. [49]

Le gène *TERT* est situé sur le chromosome 5, et code pour une ribonucléoprotéine polymérase, la télomérase, qui maintient les extrémités des télomères en ajoutant la répétition télomérique TTAGGG. L'expression de la télomérase joue un rôle dans la sénescence cellulaire, car elle est normalement réprimée dans les cellules somatiques postnatales

entraînant un raccourcissement progressif des télomères. La dérégulation de l'expression de la télomérase dans les cellules somatiques peut être impliquée dans l'oncogenèse pour immortalisation des cellules. La présence de mutations somatiques récurrentes dans le promoteur du gène *TERT* a été rapportée dans 43 % des cancers du système nerveux central, dans 59% des cancers de la vessie, dans 10 % des cancers folliculaires de la thyroïde et dans 29 % des mélanomes. [50]

Le gène *SMARCB1* est un gène suppresseur de tumeur, il est situé sur le chromosome 22, et code pour une protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne, elle fait partie d'un complexe qui permet le relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription. Elle exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. Des mutations constitutionnelles de ce gène ont été décrites dans des méningiomes multiples familiaux, dans des schwanomatose et dans le syndrome de Coffin-Siris. Au niveau somatique, en dehors de rares mutations retrouvées dans les méningiomes et toujours en association avec des mutations du gène *NF2*, des mutations de ce gène ont été décrites dans des tumeurs rhabdoïdes.

- Enfin, des anomalies chromosomiques récurrentes ont été décrites pour les grades plus élevés, associées à la progression tumorale, avec pour gènes candidats le gène *PTEN* (10q23.31), le gène *CDKN2A* et *CDKN2B* (9p21.3). [42-43-44]

Le gène *PTEN*, situé sur le chromosome 10 est un gène suppresseur de tumeurs, il code pour une phosphatase, régulatrice de la voie PIK3-AKT-mTOR par antagonisme de la PI3Kinase, et de la voie des MAPKinase. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et bien connu en oncologie, car de nombreuses mutations ont été rapportées dans divers cancers. [51]
Le gène *CDKN2A*, situé sur le chromosome 9, a une organisation génomique inhabituelle et complexe : il code pour deux protéines distinctes dans des cadres de lecture alternatifs, INK4A (aussi appelé p16) et ARF (ou p14), impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) et via la stabilisation de p53, respectivement. Ce gène est fréquemment muté ou délété dans une grande variété de tumeurs, et est connu pour être un important gène suppresseur de tumeur.
Le gène *CDKN2B*, est situé sur le chromosome 9, jouxtant le gène *CDKN2A*. Il code pour une protéine p15, impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6). Ce gène est fréquemment muté ou délété dans une grande variété de tumeurs, et est connu pour être un important gène suppresseur de tumeur.

A ce jour, aucune mutation de ces gènes n'a été rapportée dans les méningiomes.

3- Des anomalies moléculaires vers de nouveaux marqueurs :

Dans la littérature, des premières corrélations génotype-phénotype ont été observées. Ces premières corrélations concernent principalement la localisation et le sous-type histologique, le pronostic a été moins étudié du fait de la complexité à mener ce type d'étude pour des tumeurs à croissance lente et de la découverte récente des différentes voies d'initiation tumorale. Enfin en terme de thérapeutique, de nouvelles drogues pourrait se révélée bénéfique dans le traitement de ces tumeurs en fonction de leur génotype.

a- Corrélations génotype-phénotype : Localisation :

Le génotype NF2 semble prédominer au niveau de la convexité, et au niveau postérieur de la base du crâne. Le génotype PIK3CA est retrouvé préférentiellement au niveau de la base du crâne. On retrouve plus volontiers le génotype TRAF7/AKT1 et SMO au niveau de la partie antérieur de la base du crâne, ou de la partie antérieur de la convexité. Enfin, on peut noter que la localisation au niveau de la convexité est exceptionnel pour le génotype TRAF7 / KLF4. [49] Le génotype POLR2A semble lui prédominer au niveau de la région de la selle turcique. [41]

b- Corrélations génotype-phénotype : Histologie :

Le génotype NF2 semble associé à une histologie de type fibroblastique ou transitionnel, tandis que les génotypes SMO, TRAF7 et/ou AKT1, et POLR2A semblent plutôt être associés au type méningothélial. Le génotype PIK3CA est associé à une histologie de type ménigothéliale ou transitionelle. Enfin, la totalité des tumeurs mutées TRAF7/KLF4 sont de sous type histologique sécrétant. [52]

c- Corrélations génotype-phénotype : Pronostic :

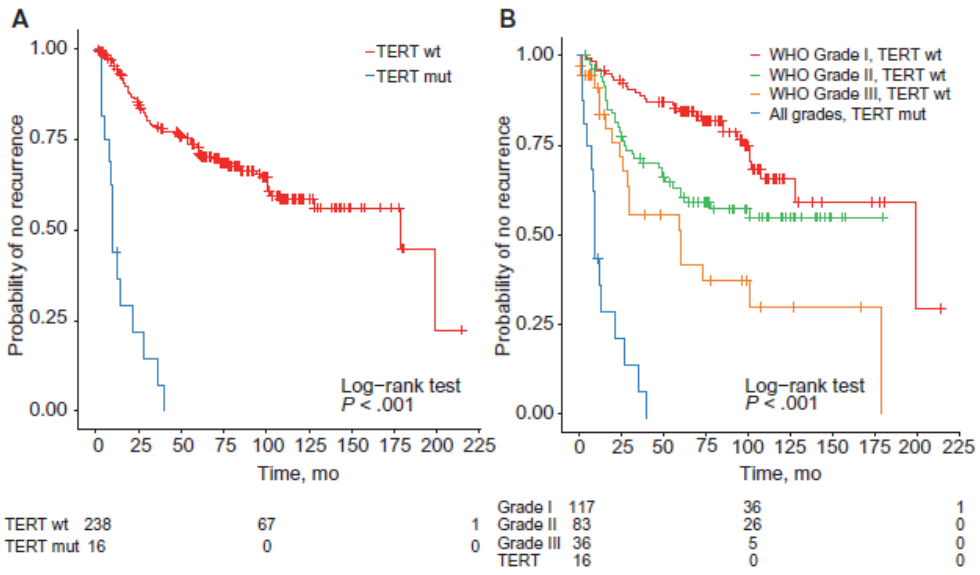
Plusieurs études s'accordent à dire qu'un génotype complexe est associé à un grade tumoral plus élevé et à une plus grande agressivité. [52] Les tumeurs mutées NF2 semblent être plus instable d'un point de vue chromosomique, et une étude retrouve parmi les tumeurs mutées de grade II, 75 % de tumeur mutées NF2. [41]

Une étude retrouve un taux de récidive plus élevé, dans les méningiomes mutés SMO situés au niveau du sillon olfactif, par rapport aux tumeurs non mutées SMO (majoritairement mutées AKT1), indépendamment du grade tumoral et du grade Simpson, sur un suivi de 5 ans. [53]

Une autre étude retrouve un temps de survie sans récidive réduit, significativement associé à la mutation récurrente du gène *AKT1*, dans les méningiomes de la base du crâne. [54]

Enfin, dans l'étude d'une série rétrospective 252 méningiomes, un délai médian de progression de 10,1 mois a été observé chez les patients présentant des mutations du promoteur du gène *TERT* contre 179 mois chez les patients sans mutation du promoteur du gène *TERT*, indépendamment du grade tumoral. [40]

Figure 5 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la progression des méningiomes en fonction de leurs statuts TERT (mutant vs wild type), indépendamment du grade OMS (A) et en fonction du grade OMS (B) – issu de *TERT promoter mutations and risk of recurrence in meningioma. Sahm F et al* [40]



d- Thérapeutique :

La détermination du génotype tumoral pourrait en termes de thérapeutiques permettre de mieux évaluer la nécessité d'une radiothérapie adjuvante, en fonction de l'agressivité de la tumeur. Mais, plus intéressant encore, elle pourrait permettre de proposer un traitement pharmacologique ciblée par inhibition des voies oncogéniques mis en cause. Actuellement des drogues agissant comme inhibiteurs de AKT, inhibiteur de la voie de hedgehog (SMO) ou encore inhibiteur de PIK3, sont en développement dans le traitement de tumeurs solides.

4- Sélection bibliographique de marqueurs génique d'intérêt diagnostique et/ou pronostique

Actuellement, 80% des méningiomes peuvent être caractérisés d'un point de vue moléculaire, par l'étude de mutations d'un nombre restreint de gènes. En pratique celles-ci ne sont pas utilisées en clinique du fait de leur découverte récente et du manque de données sur des corrélations entre génotype et phénotype. Ces dernières années de plus en plus d'études s'intéressent à ces mutations et les premières données de corrélations entre génotype et phénotype semblent très prometteuses.

A partir de cette recherche bibliographique nous avons sélectionné 13 gènes d'intérêts, résumés dans le tableau 5, que nous allons étudier dans une séries de méningiomes. La détermination du génotype de ces tumeurs pourrait permettre d'en préciser les caractéristiques en complément des marqueurs histologiques classiques tels que le nombre de mitose, le Ki 67, la présence d'atypies et la classification OMS.

D'un point de vue diagnostique et pronostique, cela pourrait permettre de mieux préciser l'agressivité tumorale de mieux évaluer le risque de récidive en postopératoire et ainsi adapter la durée et la fréquence du suivi.

D'un point de vue thérapeutique, une connaissance systématique de ces anomalies moléculaires pourrait permettre de développer des stratégies innovantes basées sur l'inhibition potentielle des voies d'initiations tumorales et de proposer un traitement personnalisé.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des gènes sélectionnés pour l'étude d'une série de méningiomes :

Gène	Localisation chromosomique	Référence	Nombre d'exons	Fonction protéique principale	Type de mutation dans les méningiomes	Hot spot mutationnel	Mutation somatique recensée dans d'autre type de cancers
NF2 : NEUROFIBROMIN 2	22q12.2	NM_000268.3	15	Inhibition de contact via régulation voie AKT-PIK3-mTOR,et de la voie Hippo	Constitutionnelle et somatique	Non	Oui (schwannomes et épendymome principalement)
AKT1 : V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	14q32.3	NM_001014431.1	15	Serine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) et appartient à la voie de signalisation PIK3-AKT -mTOR qui régule de nombreux processus biologiques, y compris la prolifération, la croissance, et l'apoptose	Somatique	Oui : E17K	8% des cancers du sein, 6% des cancers du côlon et 2% cancers de l'ovaire
KLF4 : KRUPPEL-LIKE FACTOR 4	9q31.2	NM_004235.4	5	Contrôle de la transition G1-à-S du cycle cellulaire à la suite de l'endommagement de l'ADN par la médiation du gène suppresseur de tumeur p53 et la différenciation dans de nombreux types de cellules	Somatique	Oui : K409Q	Non
SMO : SMOOTHENED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF	7q32.1	NM_005631.4	12	Protéine transmembranaire de type récepteur couplé aux protéines G, qui appartient à la voie de signalisation Hedgehog	Somatique	Oui : L412F et W535L	Carcinomes basocellulaires et medulloblastomes
TRAF7 : TNF RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR 7	16p13.3	NM_032271.2	21	Protéine pro-apoptotique et régulateur de la transcription NF-kappa-B	Somatique	Non	Rare (mésothélium)
PIK3CA : PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA	3q26.3	NM_006218.2	21	Sous unité catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase qui appartient à la voie de signalisation PIK3-AKT -mTOR	Somatique	Oui : E545K et H1047R	Oui nombreux cancers
CDKN2A : CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2A	9p21.3	NM_058195.3	3	Contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) et via la stabilisation de p53	ND	ND	Oui nombreux cancers
CDKN2B : CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2B	9p21.3	NM_004936.3	2	Contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6)	ND	ND	Oui nombreux cancers
TERT : TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE	5p15.3	NM_198253.2	16	Ribonucléoprotéine polymérase, la télomérase, qui maintient les extrémités des télomères en ajoutant la répétition télomérique TTAGGG	Somatique	Promotteur du gène : g.1,295,228C>T g.1,295,250C>T	43 % des cancers du système nerveux central, 59 % des cancers de la vessie, 10 % des cancers folliculaires de la thyroïde et 29 % des mélanomes
SUFU : SUPPRESSOR OF FUSED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF	10q24.3	NM_016169.3	12	Régulation de la voie de signalisation de Hedghog via inhibition du facteur de transcription GLI1	Constitutionnelle	ND	Carcinomes basocellulaires et medulloblastomes
PTEN : PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOG	10q23.3	NM_000314.4	9	Phosphatase, régulatrice de la voie PIK3-AKT-mTOR par antagonisme de la PI3Kinase, et de la voie des MAPKinase	ND	ND	Oui nombreux cancers
SMARCB1 : SWI/SNF-RELATED, MATRIX-ASSOCIATED, ACTIN-DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY B, MEMBER 1	22q11.2	NM_003073.3	9	Protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne, elle fait partie d'un complexe qui permet le relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription	Constitutionnelle et somatique	ND	Tumeurs rhabdoïdes
SMARCE1 : SWI/SNF-RELATED, MATRIX-ASSOCIATED, ACTIN-DEPENDENT REGULATOR OF CHROMATIN, SUBFAMILY E, MEMBER 1	17q21.2	NM_003079.4	11	Protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne, elle fait partie d'un complexe qui permet le relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription	Constitutionnelle	ND	Non

ND : non déterminé

II- Recherche d'une approche innovante par biopsie liquide : ADN circulant et biopsies liquide

La détermination du génotype peut, comme c'est le cas dans les différentes études citées précédemment, se faire par l'étude d'un morceau de la tumeur.

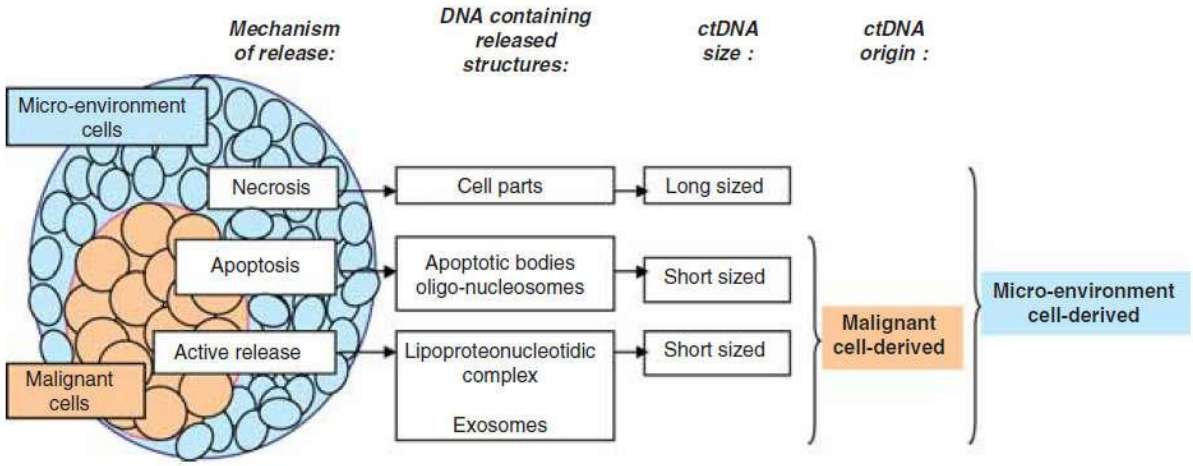
Cependant, la mise en évidence dans le sang circulant de l'ADN issu de la tumeur, comme c'est déjà le cas dans d'autre pathologie tumoral avec la détection de mutation de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (recherche de la mutation T790M de l'EGFR) dans les cancers du poumon lorsque la biopsie tissulaire n'est pas réalisable ou non contributive, est théoriquement possible du fait de leur localisation hors de la barrière hémato-encéphalique.

1- ADN circulant : Généralité

Depuis les travaux de P. Mandel et P. Métais en 1948, il est clairement établi que le sang véhicule une petite quantité d'acides nucléiques extracellulaires provenant de la libération de matériel génétique par les tissus : l'ADN circulant. Ces fragments circulent en partie sous forme de complexes nucléoprotéiques formés d'ADN et d'histones (les nucléosomes) ou adsorbés à la surface des hématies. Il s'agit de petits fragments double-brin d'une taille moyenne de 150 pb, (correspond à la taille d'un fragment d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones formant le nucléosome). La demi-vie de l'ADN circulant est de moins de deux heures avant qu'il soit filtré et éliminé de la circulation sanguine par la rate, le foie et les reins. Son origine n'est pas encore parfaitement élucidés mais serait liés à 3 phénomènes : l'apoptose, la nécrose et dans une moindre mesure la sécrétion active.

Chez les individus sains, la libération d'ADN circulant serait consécutive à l'apoptose cellulaire, tandis que dans les tissus cancéreux, l'activité nécrotique s'ajouterait à ce phénomène et conduit à la présence de fragments de plus grande taille (voir figure 6). [55-56]

Figure 6: Représentation de l'origine de l'ADN circulant chez un individu à partir d'un tissu cancéreux. *Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research, Eleonora Zonta et al. 2015* [59]



Bien qu'il n'existe pas de méthode standardisé pour mesurer la concentration plasmatique en ADN circulant, toutes les études s'accordent à dire que l'on trouve de l'ADN circulant en

moindre quantité chez les individus sains et que son augmentation peut être liée à différentes situations physiologiques ou pathologiques : AVC et infarctus myocardique, exercice musculaire intensif, insuffisance rénale aiguë, cytolyse hépatique, traumatismes, chirurgie, cancer.

Le génotypage tumoral joue aujourd'hui un rôle clé dans la prise en charge des patients atteints de cancers. Il est probable que le développement des méthodes de séquençage haut débit permette d'aller plus loin dans la classification, la définition du pronostic, le suivi et l'identification de cibles thérapeutiques [57]. Une des sources potentielle de cet ADN tumoral peut être l'ADN circulant avec une fraction allélique allant de 0.01% à plus de 50% dans les cancers métastatiques [58].

2- Biopsie liquide

La biopsie liquide désigne toute analyse permettant d'obtenir une information sur une tumeur solide à partir d'un prélèvement liquide. Elle peut être par exemple l'étude du génotype tumoral par une analyse de l'ADN tumoral circulant à partir d'un échantillon plasmatique. Cela présente de nombreux avantages en comparaison avec une biopsie tissulaire classique :

- prélèvements peu invasifs et sans risque
- pouvant être répétés dans le temps
- représentatifs de la tumeur en s'affranchissant de l'hétérogénéité tumorale

Mais l'étude de l'ADN circulant tumoral nécessite une bonne maitrise des facteurs pré-analytiques et des techniques moléculaires ultra-sensibles (voir tableau 6) [55].

Tableau 6 : tableau récapitulatif des différentes technologies moléculaires ultra-sensibles existantes, utilisables pour l'étude de l'ADN circulant tumoral et de leur sensibilité. Modifié de *Circulating Cell-Free DNA: The Blood Biopsy in Cancer Management*, *Jennifer L McLarty et al*. [60]

Technologies	Sensitivity	Principe général de la méthode
ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System)	1 %	Il s'agit d'une technique ciblée, qui utilise des amorces spécifiques pour l'amplification de l'ADN. Chaque amorce est complémentaire d'une séquence localisée à chaque extrémité de la région chromosomique à amplifier. La subtilité de la technique ARMS réside dans le fait qu'elle utilise une amorce dont la dernière base correspond exactement au site de mutation. Si cette dernière base est celle de la séquence normale, la réaction ne surviendra qu'avec un ADN normal ; si la dernière base est celle de la séquence mutée, la réaction ne surviendra que si l'ADN porte cette mutation.
Clamping PCR	0.1–1 %	Il s'agit d'une technique ciblée, qui utilise des PNA (peptide nucleic acid) qui reconnaissent et se lient à leur séquence d'acides nucléiques complémentaire avec une grande stabilité thermique. Au moment de l'amplification par PCR, si la séquence d'ADN est parfaitement homologue au PNA, l'amplification de cette séquence sera bloquée (clamping).
castPCR (Competitive Allele-Specific TaqMan PCR)	0.1–1 %	Il s'agit d'une technique ciblée, qui repose sur le principe de la PCR en temps réel par hydrolyse de sondes, en utilisant une amorce allèle-spécifique pour la détection des allèles mutants et un oligonucléotide bloqueur pour supprimer l'allèle sauvage.
ICE COLD-PCR (Improved & Complete Enrichment CO-amplification at Lower Denaturation temperature)	0.1-1 %	Il s'agit d'une technique d'enrichissement non ciblée, qui utilise la différence de température de fusion entre deux amplicons (Tm). Une variation ou un mésappariement d'un seul nucléotide à n'importe quelle position le long d'une séquence d'ADN double brin fait varier le Tm. Juste en dessous du Tm, il existe une température de dénaturation critique (Tc) dans laquelle l'efficacité de la PCR chute brusquement du fait du nombre limité d' amplicons dénaturés. Cette différence dans l'efficacité de la PCR, à des températures de dénaturation spécifiquement définies, peut être utilisée pour enrichir sélectivement les allèles minoritaires tout au long de la PCR.
BEAMing Digital PCR (Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics)	0.01 %	Il s'agit d'une technique ciblée, qui est réalisée en 4 étapes, pré-amplification, PCR en émulsion, hybridation et cytométrie en flux. Il s'agit d'une technique de PCR sur molécule d'ADN fixée sur bille magnétique sur laquelle se trouve les amorces spécifiques du gène d'intérêt. La PCR est réalisé sur les billes en émulsion, puis des sondes fluorescentes spécifiques de la séquence sauvage ou de la mutation, sont ajoutées et vont s'hybrider à l'ADN amplifié. Le détection de fluorescence et la quantification du nombre de billes contenant l'ADN muté, se fait par cytométrie de flux.
Droplet Digital PCR	< 0.1 %	Il s'agit d'une technique ciblée, ou l'échantillon à analyser est émulsionné en gouttelettes. Chaque molécule d'ADN (mutée et sauvage) est répartie au hasard dans les gouttelettes. Les gouttelettes sont ensuite déposées sur une plaque et l'ADN est amplifié, une sonde fluorescente spécifique de l'allèle sauvage et de l'allèle mutée est ensuite hybridée dans chaque gouttelette. Chaque gouttelette produit un signal fluorescent indiquant si la mutation cible est présente ou non. Un logiciel insère la fraction des gouttelettes positives dans une distribution de Poisson, et détermine la concentration initiale de la cible sous forme de nombre de copies.
NGS (Next-Generation Sequencing)	1-5 %	Il s'agit d'une technique non ciblée. Le NGS repose sur la génération massive de données de séquences obtenues par des cycles successifs d'incorporation de nucléotides, et l'émission de signaux qui sont ensuite convertis en information de séquence.

Actuellement, les biopsies conventionnelles sont encore indispensables pour poser le diagnostic initial d'un cancer, en définir le stade, étudier l'environnement tumoral. Cependant dans le management du patient, la biopsie liquide à partir d'ADN circulant permet de suivre l'efficacité thérapeutique précocement et l'apparition de clones résistants, ainsi que les récidives tumorales. Enfin, chez les patients pour lesquels une biopsie classique ne peut être envisagées, du fait d'un mauvais état général ou d'une localisation tumorale complexe (poumon et os principalement), la biopsie liquide apparaît comme une alternative prometteuse tant au moment du diagnostic que du suivi.

Du fait de la nécessité à réaliser un biopsie pour poser le diagnostic de certitude des méningiomes, et de leur localisation intra crânienne critique imposant un geste biopsique très invasif, nous avons envisagé d'étudier la faisabilité d'une biopsie liquide dans ces tumeurs.

III- Objectifs :

La définition de nouveaux marqueurs biologiques dans les méningiomes serait d'une grande utilité pour préciser les caractéristiques de la tumeur et proposer des options thérapeutiques adaptées. En effet, bien que la majorité de ces tumeurs soit classée de grade I, leurs agressivités demeurent imparfaitement évaluées avec une récidive possible même après résection chirurgicale complète, posant particulièrement problème en cas de découverte fortuite d'un méningiome asymptomatique ; et leur localisation cérébrale impose un suivi grossier par l'imagerie.

Ces dernières années, les connaissances dans les caractéristiques moléculaires des méningiomes ont considérablement progressé notamment par l'utilisation de nouveaux outils technologiques, laissant émerger de potentiels nouveaux marqueurs biologiques.
Cependant, le manque de corrélation génotype phénotype et la nécessite d'accès au tissu tumoral reste un frein à l'utilisation de ces marqueurs.

Dans ce contexte, il nous a donc semblé intéressant d'étudier par séquençage haut débit une cohorte de méningiomes bien caractérisés sur le plan phénotypique et de tester une nouvelle approche non invasive dans l'étude de ces marqueurs.

Notre étude se déroulera en deux temps :

- Dans un premier temps, nous allons caractériser les anomalies moléculaires d'une série de méningiomes bien caractérisés sur le plan phénotypique, dans des gènes d'intérêts précédemment sélectionnés par une analyse bibliographique. Ce travail sera fait sur du tissu congelé puis sur du tissu en paraffine dans l'objectif d'une étude de faisabilité en pratique clinique. Nous tenterons également d'établir des corrélations génotype - phénotype.

- Dans un second temps, nous évaluerons la faisabilité de la biopsie liquide à partir de l'ADN circulant plasmatique issus de patients porteurs de méningiomes, et tenterons d'étudier sa cinétique avant et après chirurgie.

3 ème partie : Matériels et Méthodes

I- Matériel :

1- Patients

L'étude a été menée de façon rétrospective sur 11 patients dont le diagnostic de méningiome avait été posé à l'hôpital de la Timone entre octobre 2010 et mai 2015 avec les différents paramètres cliniques déjà établis. En parallèle, nous avons constitué une cohorte de 27 patients dont le diagnostic de méningiome a été posé à l'hôpital de la Timone entre juin 2016 et février 2017, et pour lesquels nous disposions en parallèle de biopsie liquide (cf ci-dessous). Cette série sera nommée cohorte Timone.
L'étude a également été menée sur une cohorte de 17 patients issus de l'étude clinique CEVOREM (PHRC : étude de phase II), porteur de méningiomes particulièrement agressifs, en échec thérapeutique pour lesquels un traitement par évérolimus et octréotide est testé. Cette série sera nommée cohorte CEVOREM.

2- Recueil de données cliniques

L'ensemble des informations pour les patients diagnostiqués à la Timone, a été obtenu à partir des dossiers médicaux mis à disposition par le service de Neurochirurgie de la Timone, par le serveur Axigate de l'APHM (Assistance publique des hôpitaux de Marseille) et directement par les médecins prenant en charges ces patients (T. Graillon).
Nous avons recueilli pour chaque patient les paramètres cliniques suivants :

- Sexe et âge au diagnostic
- Localisation cérébrale
- Grade OMS
- Sous type histologique
- Valeur du Ki-67
- Nombre de mitoses par champs
- Présence d'atypie cellulaire
- Nécrose
- Envahissement osseux et envahissement du parenchyme cérébral

- Présence d'œdème
- Récidive et localisations multiples

3- Matériel

Nous disposons pour la cohorte Timone de 38 tumeurs qui ont été collectionnées et congelées à – 80°C par l'équipe SIGNET au CRN2M, grâce à une collaboration avec le service de neurochirurgie du Pr DUFOUR.
Nous disposons également pour les 27 patients dont le diagnostic de méningiomes a été posé entre juin 2016 et février 2017, de deux prélèvements sanguins réalisé sur tube Cell-Free DNA Collection Tube de Roche, à J-1 et entre J+4 ou J+5 de la chirurgie, associés à ces tumeurs, dont le plasma et la couche leuco-plaquettaire, ont été congelés à – 80°C, après double centrifugation.
Enfin, grâce à une collaboration avec le Dr Thomas GRAILLON, nous disposons du matériel tumoral fixé en paraffine (2 lames FFPE) pour 17 patients de l'étude clinique CEVOREM (cohorte CEVOREM).

II- Méthodes

Par une étude bibliographique effectuée précédemment, nous avons choisi de séquencer par haut débit un panel de gènes comprenant13 gènes (voir tableau 5 – Partie 2), et de rechercher de large délétion du gène *NF2* par PCR en temps réel en multiplex.

1- Préparation des échantillons :

a- Extraction de l'ADN

A partir des tumeurs congelées : extraction de l'ADN tumoral : par le kit d'extraction manuelle QiaAmp DNA kit, selon les recommandations du fournisseur puis conservation à -80°C avant analyse.

A partir du matériel tumoral fixé en paraffine : extraction de l'ADN tumoral : déparaffinisation des tissus avec la Deparaffinization Solution de QIAgen, puis extraction par

le kit d'extraction manuelle QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, selon les recommandations du fournisseur, puis conservation à -80°C avant analyse.

A partir du sang : double centrifugation (3000 rpm pendant 10 min puis séparation du plasma et de la couche leuco-plaquettaire et centrifugation de plasma à 4500 rpm pendant 10 min). Extraction de l'ADN circulant à partir de 2 ml de plasma : extraction manuelle selon les recommandations du fournisseur avec le kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit de Qiagen puis conservation de l'ADN extrait à -80°C avant analyse.
Extraction de la couche leuco-plaquettaire sur l'automate QIAsymphony de Qiagen avec le protocole DNA_Buffy_Coat_200_V7_DSP, puis conservation à -80°C avant analyse.

b- Quantification et qualification de l'ADN :

Après extraction les ADN sont quantifiés par fluorométrie sur le Qubit à l'aide du Qubit® dsDNA HS Assay Kits, selon les recommandations du fournisseur.

La pureté de tous les ADN est évaluée à l'aide des rapports A260/A280 et A260/230 par spectroscopie UV (Nanodrop).

La qualité de l'ADN tumoral et circulant a été contrôlée à l'aide d'une plateforme microfluidique (2100 Bioanalyzer de Agilent Technologies) avec le kit Agilent High Sensitivity DNA pour l'ADN circulant et l'ADN tumoral de tumeurs fixées en paraffine, et le kit Agilent DNA 1000 pour l'ADN tumoral, selon les recommandations du fournisseur.
Le kit Agilent High Sensitivity DNA permet d'évaluer la qualité des ADN faiblement concentrés (de 5 à 500 pg/µl) et le kit Agilent DNA 1000 permet d'évaluer la qualité des ADN à concentration standard (de 0.1 à 50 ng/µl).
Nous utiliserons cette technologie, avec les kits appropriés, pour :

- évaluer la dégradation (fragmentation de l'ADN) des ADN extraits des tumeurs
- évaluer la pureté (absence d'ADN de haut poids moléculaire) des ADN circulants
- quantifier et qualifier nos librairies de séquençage haut débit.

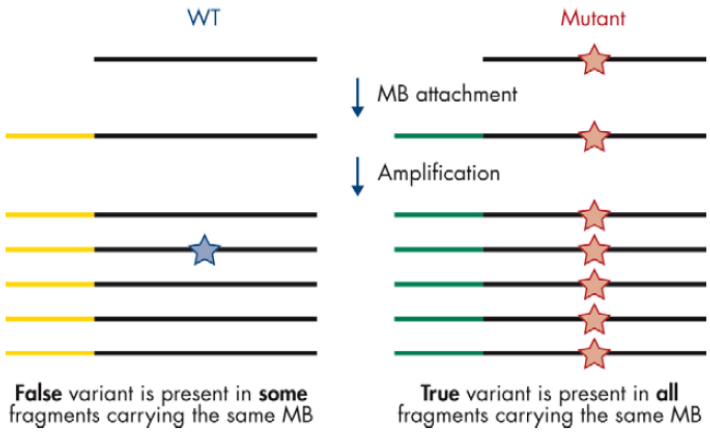
2- Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs et de l'ADN circulant par séquençage haut débit

Nous utiliserons le kit de séquençage haut débit : QIAseq targeted DNA qui permet l'élaboration de librairies ciblées sur un panel de gènes choisi, et marquées par des codes-barres moléculaires.

a- Principe générale de la méthode

Le principe du kit QIAseq targeted DNA est l'introduction de séquences uniques (constitués de 12 nucléotides), appelé code-barres moléculaire, qui vont être attachées à chaque molécule d'ADN originale avant toute amplification. Ainsi des molécules d'ADN de même origine (résultat de l'amplification par PCR) porteront donc le même code-barres.
Ces codes-barres moléculaires vont permettre d'augmenter la sensibilité de détection des variants de séquence en permettant, au moment de l'analyse des séquences, de discriminer des molécules d'ADN d'origines différentes, qui porteront des codes-barres différents. Ils vont également permettre de discriminer un variant artéfactuel qui sera présent sur une partie seulement des séquences portant un même code-barres ; d'un véritable variant de séquence, qui sera présent sur l'ensemble des séquences portant le même code-barres (voir figure 7).

Figure 7 : Schéma illustrant l'intérêt de l'utilisation de codes-barres moléculaires dans les technologies de séquençages haut débit, pour limiter les variants artéfactuels. Modifié de *QIAseq™ Targeted DNA Panel Handbook, Mai 2017.*



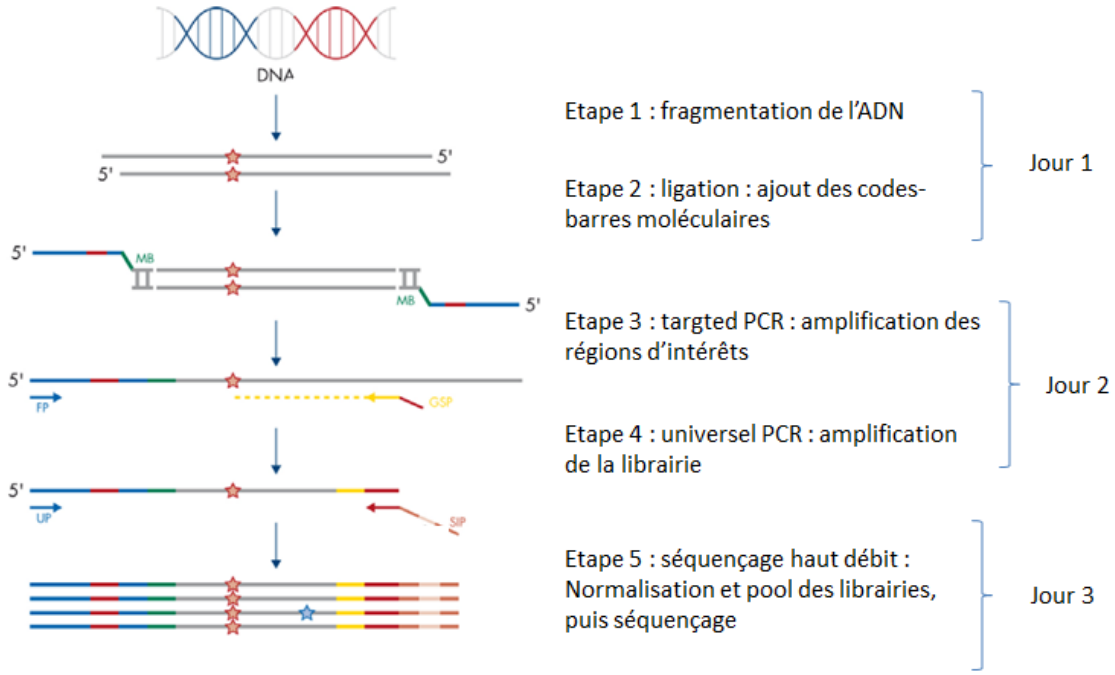
En jaune et en vert : deux codes-barres moléculaires différents
Etoile rouge : variant de séquence
Etoile bleu : variant artéfactuel

b- Préparation des librairies de séquençage haut débit

L'élaboration du design de la librairie se fait en ligne à partir du site internet de Qiagen (https://www.qiagen.com/fr/shop/genes-and-pathways/custom-products/custom-array-products/qiaseq-targeted-dna-panels), à partir du nom des gènes ou des coordonnées génomiques des régions d'intérêts.
Les amorces de séquençage ont été sélectionnées afin de couvrir théoriquement 99% des régions codantes (exons) et des régions introniques flanquantes (30 pb de part et d'autre des exons) des 13 gènes sélectionnés pour notre panel soit un total de 24 486 pb, pour 362 amorces.

La préparation des librairies de séquençage se déroule en cinq grandes étapes réparties sur 3 jours (voir figure 8), à partir d'une prise d'essai maximum de 15µL.

Figure 8 : Illustration des différentes étapes d'élaboration de la librairie de séquençage haut débit avec le kit QIAseq targeted DNA. Modifié de *QIAseq™ Targeted DNA Panel Handbook, Mai 2017.*



Première étape : Fragmentation

Fragmentation de l'ADN de façon aléatoire par des endonucléases fournies dans le kit, à une température de 32°C. Inactivation des endonucléases à 65°C.

Une étape de réparation des extrémités (end-réparation) de l'ADN, et l'incorporation de désoxyadénosine-monophosphate (dAMP) sur l'extrémité 3 ' des fragments d'ADN (A-addition) est réalisé en parallèle afin de préparer l'étape de ligation.

Deuxième étape : Ligation

Avant toute amplification d'ADN, chaque molécule d'ADN originale est attachée en son extrémité 5', à une séquence unique, appelé codes-barres moléculaires, constitué de 12 nucléotides (ou UMI : unique molecular index, en bleu sur la figure 9), à une température de 20°C, grâce à un adaptateur (appelé séquence commune, en jaune sur la figure 9) et une DNA ligase. Ce code-barres moléculaire est attaché à l'amorce de séquençage haut débit Read 2 sequencing primer (Read 2 sequencing primer site en rose sur la figure 1), à l'adaptateur de séquençage haut débit P7, ainsi qu'aux index I7 servant à l'indentification des échantillons pour permettre un multiplexage (voir figure 9).

Une étape de lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisée sur une plaque magnétique pour purifier l'ADN et enlever les dimères d'adaptateurs. L'ADN est ensuite congelé à – 20°C.

Cette étape permet d'intégrer un code-barres moléculaire à chaque molécule d'ADN, et d'intégrer pour chaque échantillon les amorces de séquençage haut débit Read 2 sequencing primer, les adaptateurs de séquençage haut débit P7, ainsi qu'à un premier index I7.

Troisième étape : Targeted PCR :

Les molécules d'ADN sont soumises à plusieurs cycles de PCR en utilisant :

- des amorces spécifiques des régions d'intérêts (GSP : gene specific primer en rouge sur la figure 9) reliées à l'amorce de séquençage haut débit Read 1 sequencing primer,
- et des amorces IL-Forward, complémentaires à l'adaptateur de séquençage haut débit P7.

Une étape de lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisée sur une plaque magnétique pour purifier l'ADN et enlever les dimères d'amorces.

Il s'agit d'une étape d'enrichissement des régions cibles par PCR. Cette étape permet à la fois d'amplifier les régions d'intérêts et d'intégrer la seconde amorce de séquençage haut débit Read 1 sequencing primer, mais aussi d'amplifier les molécules d'ADN ayant intégré un code-barres moléculaire.

Quatrième étape : Universal PCR

Les molécules d'ADN sont soumises à plusieurs cycles de PCR en utilisant

- des amorces complémentaires à l'amorce de séquençage haut débit Read 1 sequencing primer, relié au second adaptateur de séquençage haut débit P5 ainsi qu'aux indexes I5,
- et des amorces complémentaires à l'adaptateur de séquençage haut débit P7.

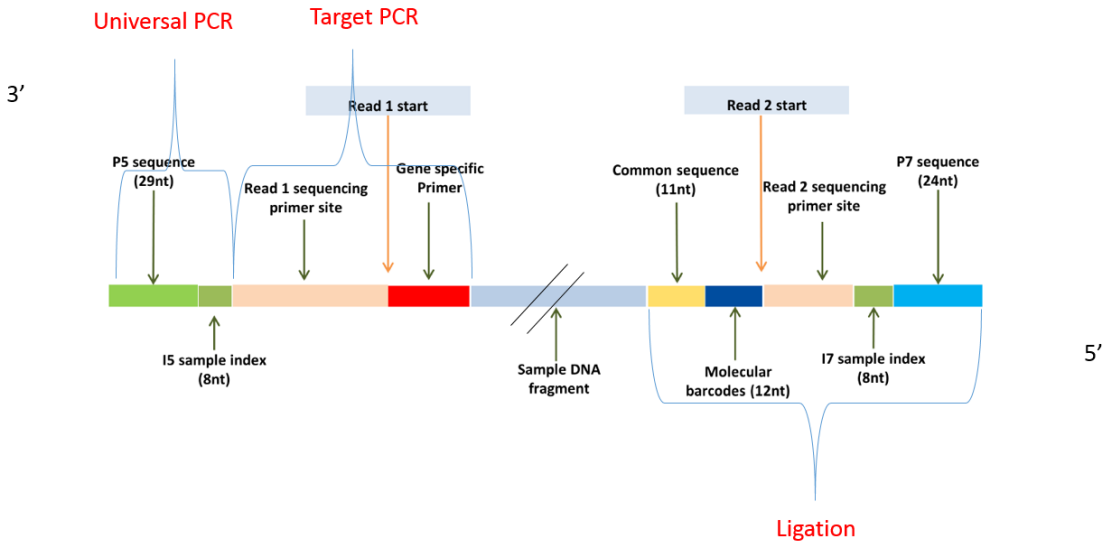
Une étape de lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisée sur une plaque magnétique pour purifier l'ADN et enlever les dimères d'amorces.

Cette étape permet à la fois d'amplifier la librairie, et d'intégrer le second adaptateur de séquençage haut débit P5 et le second index I5 servant à l'indentification des échantillons pour permettre un multiplexage.

Les librairies sont ensuite, après une dilution au dixième, qualifiées, et quantifiées en nM à l'aide du Bioanalyzer 2100 avec le kit Agilent High Sensitivity DNA, par intégration manuelle des pics de l'électrophorégramme.

Figure 9 : Structure d'un fragment issu de la technologie Qiaseq Targeted DNA.

Modifié de *"Detecting very low allele fraction variants using targeted DNA sequencing and a novel molecular barcode-aware variant caller" Xu et al. BMC Genomics (2017)*



Les étapes durant lesquelles sont intégrés les différents éléments constitutifs du fragment sont indiquées en rouge.

Cinquième étape : Séquençage haut débit.

Les librairies sont diluées à 4nM et multiplexées. Ce pool est ensuite dénaturé à la soude 0.2N et dilué à une concentration finale de 8pM et, suivant le protocole d'Illumina : MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide.

Les librairies sont ensuite séquencées en paired-end sur le Miseq d'Illumina, en utilisant la chimie du Miseq-V2 300 cycles, et un adaptateur de séquençage Qiagen fourni dans le kit : QIAseq A Read1 Primer I. Les séquences générées à analyser font 150 nucléotides.

Lors de la préparation des libraires à l'aide du kit Qiaseq targeted DNA, nous avons suivi les recommandations du fournisseur avec quelques ajustements exposé dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Quantité d'ADN et nombre de cycle Universal PCR appliqués pour la préparation des librairies :

Matériel	Quantité d'ADN optimale souhaitée pour la prise d'essai	Nombre de cycles Universal PCR
Tumeur congelée	40 ng	19
Tumeur fixée en paraffine	100 ng	23
Plasma	40 ng	21

c- Outils bio-informatiques :

Génération des données de séquençage haut débit :

Les données brutes issues du Miseq d'Illumina sont des fichiers .fastq. Le format FASTQ est un format de fichier texte permettant de stocker à la fois des séquences nucléiques et les scores de qualité associés. Ces données sont ensuite envoyées sur le pipeline d'analyse en ligne qiaseq-targeted-dna-custom-panels-analysis-center développé par SABiosciences. Ce pipeline travail en 6 étapes à partir des fichiers .fastq (voir figure 10).

Smcounter est un algorithme qui va générer les variants de séquence. Il a été développé pour détecter des variants d'une fréquence allélique de 1 % avec 90% de sensitivité et un taux de faux positifs inférieur à 20 par Mégabases. Pour cela il fonctionne à partir d'un modèle statistique (modèle probabiliste bayésien) et par l'application de différents filtres (qualité et alignement principalement) pour réduire davantage les faux positifs. Dans un premier temps un index de prédiction est calculé à partir du nombre moyen de codes-barres moléculaires intégré à l'échantillon couvrant une base de la région d'intérêt. Dans un second temps à partir du nombre de code-barres moléculaire, un indice de prédiction d'allèle est calculé pour chaque allèle, représentant la probabilité que l'allèle existe dans au moins une molécule d'ADN, en une position de la région d'intérêt. Si l'indice de prédiction d'allèle dépasse l'index de prédiction précédemment calculé, cet allèle est considéré comme un variant candidat. Les variants candidats seront ensuite gardés s'ils passent les filtres de post-traitement.

Figure 10 : Liste des étapes du pipeline bio-informatique pour l'obtention des données de séquençage haut débit

Élagage des lectures de séquence	Alignement	Filtre post alignement	Bare code clustering	Masquage des amorces spécifiques des régions d'intérêts	Variant calling
Sur le read 1 : tous les éléments n'appartenant pas à la séquence d'ADN d'origine sont découpés (UMI, adaptateurs de séquençage non coupé par le logiciel Illumina, séquence commune, adaptateur de la PCR universelle), excepté les amorces spécifiques des régions d'intérêts (GSP : gene specific primer). Sur le read 2 : les adaptateurs de séquençage non coupé par le logiciel Illumina, la séquence commune, ainsi que les adaptateurs de la PCR universelle sont découpés. Les 12 bases de l'UMI sont extraites et ajouter comme information à l'identité du read (la séquence commune qui est exactement identique pour chaque read permet une extraction plus aisée des UMI par le logiciel). Les reads trop courts (<40 nt) sont filtrés à cette étape (il s'agit principalement de dimères d'amorces).	Les reads élagués sont alors alignés sur le génome via l'algorithme BWA-MEM, qui produit un fichier .SAM. Les fichiers .SAM (pour Sequence Alignment/Map) sont des fichiers d'alignements, ils se décomposent en deux parties : l'en-tête et le corps. L'en-tête donne des informations sur le génome ou sur l'alignement, et le corps qui est un format tabulé. L'alignement est affiné et les fichiers .SAM sont convertis en fichier .BAM via samtools. Les fichiers .BAM (pour Binary SAM) sont des fichiers du format SAM, binaire (plus facilement lisible pour une machine), et compressé.	Les reads sont ensuite filtrés par le logiciel selon plusieurs critères : Si le Read 1 ou le Read 2 n'est pas aligné. Si le R1 et le R2 correspondant ne sont pas alignés sur le même chromosome ou sur le même locus. Si le R1 et le R2 correspondant sont alignés suivant la même orientation (forward-forward ou reverse-reverse). Si le score de qualité de l'alignement (MAPQ) de R1 ou R2 est inférieur à 17. Le début de la séquence du R1 est comparé aux séquences des amorces spécifiques des régions d'intérêts (GSP : gene specific primer) attendue en début de read 1. Si ces séquences ne sont pas facilement reconnues, les reads (1 et 2 correspondants) sont filtrés. Enfin les reads dont le R1 et le R2 correspondant se chevauchent de moins de 15 pb sont filtrés.	Les reads qui commencent à la même position, ont le même sens et ont le même UMI sont regroupés. Ils correspondent à de multiples lectures d'une même séquence d'ADN. Seuls ces groupements sont utilisés dans l'analyse en aval.	Modification de fichier .bam pour masquer les séquences d'amorces spécifiques identifiées en début de read 1 et potentiellement en fin de read 2, avant l'annotation des variants.	A partir des fichiers .bam modifiés à l'étape ci-dessus, un fichier .VCF est généré via SmCounter. Les fichiers .VCF (pour Variant Call Format) sont des fichiers de variation de séquence, ils donnent des informations sur les variants trouvés dans un génome par rapport à une référence (ici la version GRCh37/hg19 du génome humain).

A la fin de l'analyse sur ce pipeline, les données sont récupérées sous forme de 5 fichiers :

- .BAM et .BAI (fichier binaire qui indexe un fichier BAM, on peut le voir comme une table des matières, qui servirait aux outils de visualisation afin d'accélérer l'affichage des données contenues dans un fichier BAM), qui regroupe les données d'alignement des séquences par rapport aux séquences de référence,
- .VCF (variant calling format), qui regroupe les données sur les variants de séquence,
- .BEDGRAPH (Browser Extensible Format graph) qui regroupe les données de couverture,
- ainsi qu'un document feuille de calcul qui regroupe les données générales de l'analyse.

Analyse et interprétation des données

L'analyse de couverture des gènes séquencés est faite sur le logiciel VarAFT (Variant annotation and filtering tool). Les données obtenues ont été annotées selon la nomenclature HGVS en utilisant comme référence la version GRCh37/hg19 du génome humain et la base de données de polymorphismes connus dbSNP137, ainsi que la base de données COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) qui recense les mutations somatiques rencontrées en cancérologie. Afin de faciliter l'identification de variants pathogènes, nous avons utilisé le logiciel VariantStudio qui ajoute aux données obtenues, des informations d'annotations supplémentaires comme les prédictions de pathogénicité basé sur les algorithmes SIFT (Sort Intolerant From Tolerant human Protein) et Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) et également la base de données ClinVar (Clinvar est une ressource publique qui contient des informations sur les mutations génétiques des maladies rares provenant de douzaines de bases de données). Ensuite, le programme UMD-predictor a été utilisé pour analyser l'effet potentiellement pathogène des variations et le programme Human Splicing Finder (HSF) a été utilisé pour l'analyse de l'effet potentiellement délétère sur l'épissage. Enfin les variants retenus sont ensuite contrôlés sur Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute of MIT and Harvard), un logiciel permettant la visualisation des fichiers BAM (et la profondeur de lecture du variant), et comparés aux données de la littérature.

3- Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs par analyse du nombre de copie du gène *NF2* par PCR en temps réel.

a- Analyse du nombre de copie du gène *NF2* par PCR en temps réel par hydrolyse de sondes - Taqman assay

L'analyse du nombre de copie du gène *NF2* est effectué à l'aide d'un essai commercial TaqMan® Copy Number Assays (réf : HS00918833-CN) suivant le principe de PCR en temps réel par hydrolyse de sondes en multiplex. La sonde utilisée est conçu pour s'hybrider à la jonction intron 11 et exon 12 du gène *NF2*.
Le gène de référence utilisé est RNAse P, (sonde fournie dans le kit) et un calibrateur (ADN constitutionnel normal) est utilisé à chaque réaction. La réaction de PCR en temps réel est faite sur l'automate ViiA 7 Real-Time PCR System de Applied Biosystems™.

Chaque analyse est réalisée en triplicata, suivant les recommandations du fournisseur. En cas de variation du nombre de copie du gène *NF2*, le caractère somatique sera confirmé par l'étude de l'ADN extrait de la couche leuco-plaquettaire lorsque cela est possible.

b- Outils bio-informatiques :

Les données sont collectées en temps réel par le logiciel Applied Biosystems CopyCaller ™. Chaque réplicat est normalisé par rapport à la référence (RNaseP) pour obtenir un
Δ Ct (FAM dye Ct - VIC dye Ct, avec FAM dye correspondant au gène NF2 et VIC dye au gène de référence RNase P). Puis une moyenne Δ Ct est calculée pour chaque échantillon (à partir des 3 réplicats). Chaque échantillon est ensuite normalisé par rapport au calibrateur pour déterminer ΔΔ Ct (Δ Ct échantillon - Δ Ct calibrateur). La quantité relative (RQ) du gène NF2 par rapport au gène RNaseP est égale à $2^{-\Delta\Delta Ct}$, et le nombre de copies du gène *NF2* est égale à 2 X RQ. Lors de l'interprétation des résultats, un écart maximum de 20 % est toléré, selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 8 : Interprétation du nombre de copie du gène *NF2* en fonction de la valeur des RQ selon les recommandations du fournisseur.

RQ	Nombre de copie du gène NF2	Interprétation
0,3 – 0,7	1	Délétion
0,8 – 1,2	2	Normal
1,3 – 1,7	3	Duplication

4- Corrélation génotype-phénotype : Outils statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Pour l'analyse clinico-moléculaire statistique de notre cohorte nous avons utilisé un test d'indépendance du χ^2 adapté aux petites séries. Les p values inférieures à 0.05 étaient considérées comme significatives.

4 eme partie : Résultat

I- Présentation des cohortes de patients :

Les données cliniques, biologiques et anatomopathologiques, sont exposées dans les tableaux 9 et 10.

La cohorte de patients dont le diagnostic a été porté à l'hôpital de la Timone (cohorte Timone) est constituée de 33 femmes pour 5 hommes, soit 87%, avec un âge moyen au diagnostic de 55 ans. Cette cohorte comprend 24 tumeurs de grade I (63%), 14 tumeurs de garde II (37%) et aucune tumeur de grade III.

La cohorte de patients issus de l'étude clinique CEVOREM (cohorte CEVOREM), est constituée de 9 femmes pour 8 hommes. Cette cohorte comprend 2 tumeur de grade I (12%), 9 tumeurs de grade II (53%) et 6 tumeur de grade III (35%).

Tableau 9 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques de la cohorte Timone :

Numéro de la tumeur	Numéro d'ADN circulant associé	Date de réception de la tumeur	Grade OMS	Données histologique	Anti Ki-67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Mitose	Sexe	Oedeme/ effet de masse	Commentaire
M 22		04/10/2010	II	Atypique	20	Occipital	70	Osseux massif	Non	inflexion lymphocytoide à haut rapport N/C	> 6 pour 10	M	NR	
M 24		07/10/2010	I	Meningothélial	3	Base du crane	36	non	Non	Non	Non	F	NR	
M 25		07/10/2010	I	Meningothélial	7	Inter orbitaire	51	?	Non	Non	Non	F	NR	Indice de prolifération éléve pour un grade I
M 55		31/03/2011	II	Atypique + qq rares psammomes	7	Frontal gauche	37	Musculaire	Non	inflexion lymphocytoide, nucléoles marqués	< 4 pour 10	F	N	
M 58		15/04/2011	II	Atypique	20	Sinus caverneux	44	Parenchyme	Non	inflexion lymphocytoide, nucléoles marqués	< 4 pour 10	F	O	
M 74		08/07/2011	II	Atypique	8	Convexité coté droit	29	?	à l'emporte pièce	Non	5 pour 10	M	O	
M 86		30/09/2011	I	Transitionnel (aspect sécrétoire)	15	Frontal gauche	60	Dure mère feuillet interne	Non	?	< 4 pour 10	F	O	Indice de prolifération éléve pour un grade I
M 163		31/03/2014	I	Fibroblastique avec qq caractérisque atypique	7	Supra sellaire	40	?	Non	Nuclèole	< 1 pour 10	F	NR	Indice de prolifération éléve pour un grade I
M 164		16/04/2014	II	Atypique + nbx psammomes	15	Frontal	51	non	Rare foyer	Non	4 pour 10	F	NR	
M 165		11/05/2014	I	Fibroblastique	6	Faux	40	?	Non	Non	Non	F	NR	Indice de prolifération éléve pour un grade I
M 189		26/05/2015	II	Atypique	20	Frontal	36	?	Micro foyer	Aspect lymphocytoide, perte de diférenciation focale	8 pour 10	F	NR	Neurofibromatose de type 2
M 244		27/06/2016	I	Fibrobalstique + qq psammomes	7	Fosse postérieure	70	?	Non	Non	Non	F	Odème seul	
M 245		28/06/2016	II	Atypique	4	Arrête sphénoïdale gauche	53	Parenchyme + os	Micro foyer		4 pour 10	F	NR	
M 246		12/07/2016	I	Fibrobalstique	3	Fosse postérieure	51	?	Non	Non	Non	F	NR	
M 251	Mc 1	30/08/2016	I	Fibrobalstique	4	Supra sellaire	36	?	Non	Non	Non	F	NR	
M 252	Mc 2	01/09/2016	II	Atypique	10	Sphénoïdo-caverneux droit	69	Os	oui	Non	5 pour 10	F	NR	
M 253	Mc 3	05/09/2016	I et I	Meningothélial et meningothélial psammomateux	6 et 1	Supra sellaire	73	?				F	NR	Méningiomes multiples (2)
M 254	Mc 4	14/09/2016	I	Meningothélial + qq atypie	5	Pariétal	69	Os	Non	Aspect lymphocytoide, perte de diférenciation focale + nucléole	< 2 pour 10	F	O	
M 255	Mc 5	15/09/2016	I	Meningothélial	4	Pariétal	40	?	Non			F	Odème seul	

M 256	Mc 6	16/09/2016	I	Meningothélial + nbx psammomes	6	Sphénoïde droit	80	?	Non	?	< 1 pour 10	F	O	
M 257	Mc 7	20/09/2016	II	Atypique	10	Occipital	77	Dure-mère	Non	Non	5 pour 10	F	NR	
M 258	Mc 9	07/10/2016	I	Méningothélial	3	Supra sellaire	46	?	Non	Non	Non	M	NR	
M 260	Mc 11	07/10/2016	I	Méningothélial + qq psammomes	2	Inter optique	86	?	Non	Non	Non	F	NR	
M 261	Mc 12	10/10/2016	I	Méningothélial + qq atypie	7	Toit de l'orbite	57	Dure-mère	Non	inflexion lymphocytoide, nucléoles marqués	< 2 pour 10	F	NR	
M 263	Mc 10	13/10/2016	I	Méningothélial	3	Canal optique	52	?	Non	Non	< 1 pour 10	F	NR	
M 264	Mc 14	24/10/2016	I	Angiomateux	1	Temporal gauche	74	?	Non	Non	Non	F	O	
M 265	Mc 15	25/10/2016	I	Méningothélial et qq atypie	6	Para sagittal frontal gauche	46	Dure-mère	Non	inflexion lymphocytoide, nucléoles marqués	3 pour 10	F	N	
M 266	Mc 19	03/11/2016	I	Transitionnel	3	Angle ponto-cérébelleux droit	61	?	Non	Non	1 pour 10	F	O	
M 267	Mc 16	28/10/2016	II	Atypique	15-20	Pariétal parasagittal	72	Dure-mère et épicrane	Oui	inflexion lymphocytoide à haut rapport N/C	8 pour 10	F	NR	
M 269	Mc 20	08/11/2016	I	Fibroblastique	4	Frontal	48	Dure mère	Non	Non	Non	F	N	
M 270	Mc 21	14/11/2016	II	Atypique	7	Pariétal droit	70	Dure mère	Non	Element mononucléé inflamatoire et foyer hyper cellulaire + différenciation mauvaise par place	< 3 pour 10	M	NR	
M 272	Mc 23	17/11/2016	I et I	qq atypie et transitionnel	7-8 et 2	Tubercule et antérieur frontal	31	?	Non	Qq atypie mais différenciation bonne	< 2 pour 10	F	NR	Méningiomes multiples (2)
M 273	Mc 22	14/11/2016	II	Atypique	20	Temporal gauche	84	Non	Non	inflexion lymphocytoide, nucléoles marqués	10 pour 10	F	N	Récidive (premier diagnostic 2014)
M 275	Mc 24	24/11/2016	I	Méningothélial et qq atypie	7	Sphéno orbitaire gch	54	?	Non	Non	Non	F	NR	
M 278	Mc 26	01/12/2016	II	Atypique	10	Temporal droit	49	Parenchyme et dure mère	?	inflexion lymphocytoide	4 pour 10	M	O	
M 279	Mc 27	01/12/2016	I	qq atypie	5	Faux	63	?	qq foyer de nécrose	non	< 2 pour 10	F	Odème seul	
M 280	Mc 28	06/12/2016	II	Atypique	10	Angle ponto-cérébelleux gch	47	?	Non	Non	5 pour 10	F	NR	
M 295	Mc 30	08/02/2017	I	Méningothélial	5	Frontal	52	?	Non	Remaniment oedemateux + extravasation sanguine	non	F	NR	

NR : Non renseigné / O : oui / N : non

Tableau 10 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques de la cohorte CEVOREM :

Numéro de la tumeur	Grade OMS	Données histologique	Anti Ki-67 %	Localisation	Sexe
101	II	Atypique	10%	Convexité	F
104	II	Méningothélial - atypique	20%	Convexité	F
105	III	Rhabdoide	25%	Convexité et faux	M
106	I	Atypique	5%	Convexité	F
107	I	Méningithélial	5%	Petroclival	F
108	II	Méningothélial - atypique	20%	Convexité et base du crane	F
109	II	Psammomateux	20%	Convexité et intra-ventriculaire	F
110	II	Atypique	30%	Convexité et base du crane	F
301	II	Atypique	15%	Convexité et fosse postérieur	M
302	II	Atypique	30%	Fosse postérieur	M
304	III	Atypique	30%	Convexité	M
305	III	Anaplasique	30%	Convexité et fosse postérieur	M
306	III	Anaplasique	30%	Convexité	M
307	II	Atypique	10%	Convexité	M
308	III	Anaplasique	30%	Convexité	F
309	II	Atypique	15%	Convexité	M
310	III	Atypique	25%	Convexité	F

II- Validation technique des séquençages haut débit :

Au cours de l'étude nous avons réalisé six séquençages hauts débit pour analyser 38 tumeurs congelées, 17 tumeurs fixées en paraffine et 8 ADN circulants. L'analyse des données de séquençage haut débit nécessite une validation technique préalable afin d'évaluer la qualité du séquençage et la qualité des séquences produites.

1- Evaluation de la qualité des séquençages haut débit à partir des données brutes :

Les paramètres de validation technique des données brutes (dont les valeurs sont recommandées par Illumina) des cinq séquençages haut débit, sont listés dans le tableau 11.

Elles sont fournies directement après le fin du séquençage par l'automate Miseq lui-même et visualisable par le logiciel Miseq reporter.

Tableau 11 : Paramètres de validation technique de l'analyse primaire des données NGS issu du Miseq d'Illumina

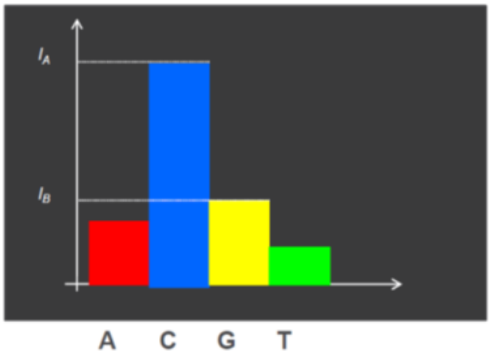
PARAMETRES	Seq 1	Seq 2	Seq 3	Seq 4 ADN circulant	Seq 5 : FFPE	Valeurs attendues recommandées par Illumina
% de clusters passant le filtre (PF)	88,09	82,11	96,18	97,97	97	*Supérieur à 87 %*
Densité de clusters	1441	1527	793	518	673	*900 k/mm2 +/-300 k/mm2*
% >= Q30 Read 1	93,21	93,01	97,49	98,3	97,38	*supérieur à 90 %*
% >= Q30 Read 4	88,07	86,4	94	96,19	94,73	*supérieur à 85 %*
Score qualité moyen sur le séquençage (%)	90,8	89,7	95,7	97,2	96	*supérieur à 87 %*
Nombre d'échantillons	15	16	14	8	15	

Définition d'un cluster : environ 1000 copies d'un même brin d'ADN sur 1 micron de la flowcell, équivaut à une seule séquence.

PF : filtre de chasteté, appliqué aux 25 premiers cycles (= 25 premières bases lues), correspond au rapport (C) entre l'intensité de la base la plus forte et la somme des deux intensités des bases les plus fortes. Si C < 0,6 pour plus de une base au cours des 25 premiers cycles alors le cluster est filtré et ne sera donc pas analyser par la suite.

$$C = \frac{I_A}{I_A + I_B}$$

CHASTITY formula



Les deux premiers séquençages que nous avons effectués présentent une densité de clusters élevée, associée à une baisse du score de qualité (Q30) du a une trop grande quantité d'ADN initiale, cependant le score qualité moyen des séquences de chaque échantillons effectuée à l'aide du logiciel FASTQC, permet l'analyse secondaire des données.

2- Evaluation de la qualité des séquences produites à partir des données brutes : analyse du score de qualité des séquences :

L'analyse du score de qualité des séquences est effectuée à l'aide du logiciel FASTQC (voir figure 11) pour chaque échantillon à partir des fichiers .fastq produit par l'automate Miseq. Toutes les séquences que nous avons obtenues, présentent une médiane supérieure à un score de 30 (bonne qualité).

3- Evaluation de la qualité des séquences produites après analyse par le pipeline d'analyse bio-informatique :

Le pipeline d'analyse fourni des informations quant à la qualité de séquence, notamment sur la profondeur de lecture moyenne et le nombre de codes-barres moléculaires intégré par l'échantillon qui dépendent de la qualité et de la quantité d'ADN initial. Ces 2 paramètres permettent d'avoir une vision générale de la qualité des différentes manipulations, de comparer les manipulations entre elles et de comparer les manipulations sur les différents types de matériels utilisés.
La profondeur de lecture moyenne pour chaque échantillon est de 4519 x (de 735 x à 11169 x) pour les tumeurs congelées, de 2 922 x (de 951,91 x à 6 938,91 x) pour les tumeurs fixées en paraffine et de 2 283 x (de 1 623,72 x à 3 559,13 x) pour les ADN circulants.
Le nombre de codes-barres moléculaires intégrés pour chaque échantillon est en moyenne de 330 972 (de 960 447 à 60 888) pour les tumeurs fraiches congelées, de 31 013 (de 71 081 à 877) pour les tumeurs fixées en paraffine et de 91 195 (de 15 556 à 267 701) pour les ADN circulants.

Le pipeline d'analyse fourni également le nombre moyen de codes-barres moléculaires intégré à l'échantillon couvrant une base de la région d'intérêt. Ce paramètre rend compte directement de la sensibilité de la technique et de la capacité à détecter des variants de faible fréquence allélique, car il rentre dans le calcul de l'estimation de la fraction allèlique minimale détectable. Le nombre moyen de codes-barres moléculaires intégré à l'échantillon par base situé dans une région d'intérêt est en moyenne de 1035,53 (208,79 à 2815,57) pour les tumeurs congelées, de 205,96 (16,56 à 702,92) pour les tumeurs fixées en paraffine et de 112,91 (54,4 à 215,19) pour les ADN circulants (l'ADN Mc2, ayant une valeur de 3.12, a été exclu). Selon les recommandations du fournisseur, un nombre moyen de codes-barres de 589 assure une sensibilité de 90 % pour la détection de variants de fréquence allélique de 5 %, et 2167 pour la détection de variants de fréquence allélique de 1 % (voir annexe).

L'ensemble des données de l'analyse primaire fournie par le pipeline bio-informatique issues des différents séquençages par échantillon est disponible en annexe.

III- Etude de la cohorte Timone :

1- Analyse du nombre de copie du gène *NF2* :

Par PCR en temps réel, une délétion du gène *NF2* a été mise en évidence dans 14 tumeurs et une duplication dans une tumeur, soit au total 39 % des échantillons examinés (15/38). L'ADN constitutionnel issu des globules blancs de 9 tumeurs a également été étudié afin de vérifier le caractère somatique de ces délétions et de la duplication (voir tableau 12).
Parmi les 14 tumeurs présentant une délétion du nombre de copie du gène *NF2*, il est intéressant de noter qu'il y a autant de tumeurs de grade I (7/24 tumeurs) que de grade II (7/14 tumeurs), la tumeur présentant une duplication est une tumeur de grade I. Au total, après l'analyse par séquençage haut débit, 7 tumeurs (18%) n'avaient qu'une délétion du gène *NF2* sans mutation associée.

Tableau 12 : Résultat de l'analyse du nombre de copie du gène *NF2* de la cohorte Timone :

Sample Name	RQ	Interprétation	Numéro ADN constitutionel associé	RQ ADN constitutionnel associé
Calibrateur	1.00	Normal		
M22	0.63	Délétion		
M24	0.93	Normal		
M25	0.96	Normal		
M 55	0.51	Délétion		
M58	0.98	Normal		
M74	1.04	Normal		
M86	1.04	Normal		
M163	0.97	Normal		
M164	0.93	Normal		
M165	0.72	Délétion		
M189	0.61	Délétion		
M244	0.62	Délétion		
M245	1.06	Normal		
M246	0.76	Délétion		
M251	0.68	Délétion	Gb 1	0,97
M252	0.66	Délétion	Gb 2	0.92
M253	0.92	Normal	Gb 3	NR
M254	0.95	Normal	Gb 4	NR
M255	1.51	Duplication	Gb 5	0.93
M256	0.64	Délétion	Gb 6	0.94
M257	0.59	Délétion	Gb 7	0.96
M258	0.91	Normal	Gb 9	NR
M260	0.94	Normal	Gb 11	NR
M261	0.84	Normal	Gb 12	NR
M263	0.98	Normal	Gb 10	NR
M264	0.87	Normal	Gb14	NR
M265	0.75	Délétion	Gb 15	0.92
M266	0.88	Normal	Gb 19	NR
M267	0.94	Normal	Gb 16	NR
M269	0.49	Délétion	Gb 20	0.86
M270	0.72	Délétion	Gb 21	0.87
M272	1.01	Normal	Gb 23	NR
M273	1.01	Normal	Gb 22	NR
M275	0.93	Normal	Gb 24	NR
M278	1.02	Normal	Gb 26	NR
M279	0.99	Normal	Gb 27	NR
M280	0.66	Délétion	Gb 28	0.91
M 295	0.98	Normal	Gb 30	NR

NR : non réalisé

L'EMT (écart maximal toléré) recommandé par le fournisseur : 20 %, compte tenu de la nature des prélèvements (tissue) nous avons choisi d'appliquer un EMT de 25 % pour les délétions.

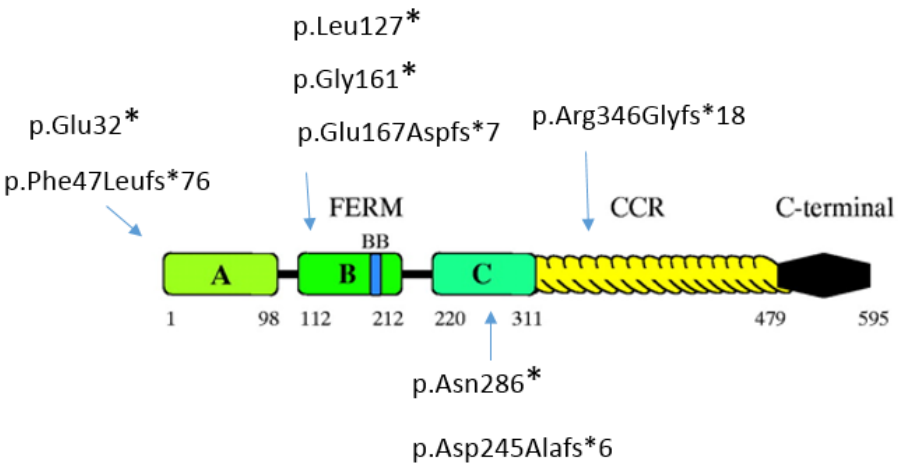
2- Profil mutationnel des tumeurs obtenu par séquençage haut débit du panel de gènes :

En séquençage haut débit, après analyse in silico des variants obtenus, à l'aide de différents algorithmes nous avons pu mettre en évidence, parmi les 38 tumeurs analysées une mutation ponctuelle dans 23 tumeurs (60.5%). Ces mutations ont une fraction allèlique en moyenne de 36.70 % (de 3.62 % à 82.50 %). Parmi les 13 gènes testés de notre panel, nous n'avons pas retrouvé de mutation pour 5 d'entre eux (*TERT, SMARCE1, PTEN, SUFU, CDKN2B*).

a- Mutation du gène *NF2*

Les mutations ponctuelles portant sur le gène *NF2* ont été retrouvées dans 26 % des tumeurs examinées (10 tumeurs : 4 grades I et 6 grades II), associées dans 80 % des cas à une délétion du gène NF2 (8/10), voir tableau 13. Dans la moitié des cas, il s'agit de mutations de types substitution. Dans l'autre moitié des cas, il y a 5 micro-délétions et une duplication d'une base. Dans tous les cas ces mutations conduisent à une protéine tronquée, soit par l'apparition d'un codon stop prématuré (dans 7 tumeurs) soit par la mutation d'un site d'épissage (dans 3 tumeurs de grade II). Quatre de ces mutations sont référencées dans la data base COSMIC.
La grande majorité de ces mutations (10/11) sont situées dans la partie codante du domaine FERM de la protéine NF2 (voir figure 12).

Figure 12 : Représentation des localisations des mutations sur les domaines protéiques de NF2



Les mutations portant sur les sites d'épissage ne sont pas représentées sur la figure.

Modifié de : "Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation"
Chun-Xiao Sun et al. Journal of Cell Science 2002

Tableau 13 : Résumé des variants pathogènes retenus pour le gène *NF2* :

Patient	Sexe	CNV NF2	NF2	Variant retrouvé dans la littérature	UMD-predictor	(Prédiction d'épissage) HSF	Fréquence GNOMAD	Variant décrit comme pathogène (COSMIC)	Mutation associéé
GRADE I									
M 244	F	del	c.380_388delTAGATGAAA p.Leu127*	Non	NA	NR	A		
M 246	F	del	c.94G>T p.Glu32*	Oui	Pathogène	NR	A	COSM 22326	PIK3CA : c.1633G>A p.Glu545Lys
M 251	F	del	c.481G>T p.Gly161*	Oui	Pathogène	NR	A	COSM 22260	CDKN2A : c.308G>A p.Arg103Lys
			c.1036delA p.Arg346Glyfs*18	Non	NA	NR	A		
M 256	F	del	c.141delT p.Phe47*	Non		NR	A		
GRADE II									
M 189	F	del	c.517-2A>G	Non	NA	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing.	A		
M 252	F	del	c.501delA p.Glu167Aspfs*7	Non	NA	NR	A		
M 267	F	N	c.855dupT p.Asn286*	Non	NA	NR	A		
M 270	M	del	c.734delA p.Asp245Alafs*6	Non	NA	NR	A		
M 273	F	N	c.448-1G>A	Oui	NA	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing.	A	COSM 22446	
M 280	F	del	c.447+1G>T	Oui	NA	Alteration of the WT donor site, most probably affecting splicing.	A	COSM 23850	SMARCB1 : c.1157G>A p.Arg386His

NA : Non applicable : Compte tenu de la nature des variants, les algorithmes UMD-predictor, SIFT et Poly Phen ne sont pas utilisable, cependant il y a un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré.
A : absent de la base de donnée GNOMAD (Anciennement Exome Aggregation Consortium (ExAC), the Genome Aggregation Database est une base de données qui récence 123.136 exomes et 15.496 génomes).
NR : non réalisé.
N : normal.

b- Mutation du gène *TRAF7*

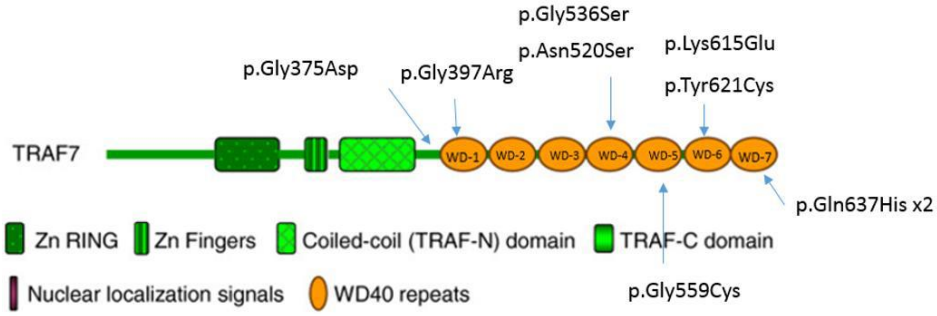
Les mutations ponctuelles portant sur le gène *TRAF7* ont été retrouvées dans 24% des tumeurs examinées (9 tumeurs : 7 gardes I et 2 gardes II). Il s'agit dans tous les cas de mutations de type faux-sens par substitution d'un nucléotide (voir tableau 14). On retrouve dans 6 cas une autre mutation associée portant soit sur le gène *KLF4* (3 tumeurs), soit sur le gène *AKT1* (2 tumeurs), soit sur le gène *PIK3CA* (1 tumeur). La majorité des mutations (8/9) sont situées dans les domaines fonctionnels de type WD-40 (WD-1, WD-4, WD-5, WD-6 et WD-7), une seule mutation a été retrouvée en amont du domaine WD-1 (voir figure 13).

Tableau 14 : Résumé des variants pathogènes retenus pour le gène *TRAF7* :

Patient	Sexe	Variant retrouvé dans la littérature	UMD-predictor	SIFT	Poly-Phen 2	Fréquence GNOMAD	Variant décrit comme pathogène (COSMIC)	TRAF 7	Mutation associée
GRADE I									
M 24	F	Oui	Pathogène	Délétère	Porbablement délétère	A	NON	c.1862A>G p.Tyr621Cys	
M 86	F	Oui	Pathogène	Délétère	Potentiellement délétère	A	NON	c.1189G>C p.Gly397Arg	KLF4 : c.1225A>C p.Lys409Gln
M 260	F	Oui	Pathogène	Délétère	Potentiellement délétère	A	NON	c.1606G>A p.Gly536Ser	
M 261	F	Non	Pathogène	Toléré	Potentiellement délétère	A	NON	c.1675G>T p.Gly559Cys	KLF4 : c.1225A>C p.Lys409Gln
M 263	F	Oui	Pathogène	Délétère	Potentiellement délétère	A	NON	c.1911G>C p.Gln637His	
M 266	F	Oui	Pathogène	Toléré	Potentiellement délétère	A	NON	c.1559A>G p.Asn520Ser	KLF4 : c.1225A>C p.Lys409Gln
M 272	F	Oui	Pathogène	Délétère	Potentiellement délétère	A	NON	c.1911G>C p.Gln637His	AKT1 : c.49G>A p.Glu17Lys
GRADE II									
M 164	F	Oui	Pathogène	Toléré	Potentiellement délétère	A	NON	c.1843A>G p.Lys615Glu	AKT1 : c.49G>A p.Glu17Lys
M 245	F	Non	Pathogène	Toléré	Porbablement délétère	A	NON	c.1124G>A p.Gly375Asp	PIK3CA : c.1633G>A p.Glu545Lys

A : absent de la base de donnée GNOMAD (Anciennement Exome Aggregation Consortium (ExAC), the Genome Aggregation Database est une base de données qui récence 123.136 exomes et 15.496 génomes).

Figure 4 : Représentation des localisations des mutations sur les domaines protéiques de TRAF7

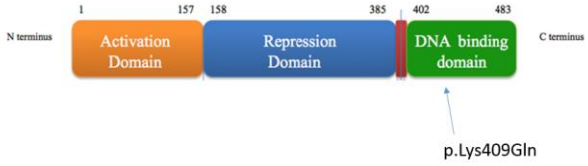


Modifié de : "TRAF molecules in cell signaling and in human diseases". Xie et al, J Mol Signal. 2013 Jun

c- Mutation du gène *KLF4*

Les mutations ponctuelles portant sur le gène *KLF4* ont été retrouvées dans 3 tumeurs de grade I, toujours en association avec une mutation du gène *TRAF7*. Il s'agit de la même mutation faux-sens qui entraine le remplacement d'une lysine en position 409 par une glutamine (K409Q), situé dans le domaine de liaison de l'ADN (voir figure 14).

Figure 14 : Représentation de la localisation de la mutation récurrente K409Q sur les domaines protéiques de KLF4



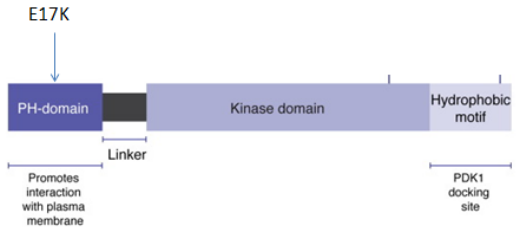
Modifié de : "Kruppel like factor 4 (KLF4): A transcription factor with diverse context-dependent functions". Hima Vangapandu et al. Jan 2009 · Gene therapy & molecular biology

d- Mutation du gène *AKT1*

Les mutations ponctuelles portant sur le gène *AKT1* ont été retrouvées dans 3 tumeurs, dont 2 en association avec une mutation du gène *TRAF7* et une sans autre mutation associée. La tumeur présentant uniquement une mutation *d'AKT1* est une tumeur de grade I. Les tumeurs

présentant à la fois une mutation de *TRAF7* et *d'AKT1*, sont une tumeur de grade I et une tumeur de garde II. Il s'agit dans tous les cas de la même mutation activatrice faux-sens qui entraine le remplacement d'un acide glutamique en position 17 par une lysine (E17K), situé dans le domaine PH (pleckstrin homology domain) de la protéine, nécessaire à son adhésion à la membrane.

Figure 15 : Représentation de la localisation de la mutation récurrente E17K sur les domaines protéiques du gène AKT1

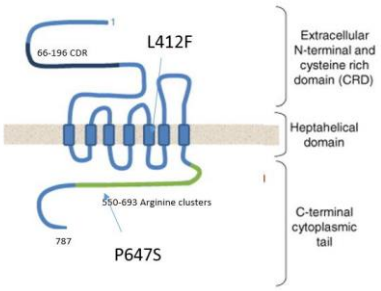


Modifié de : "*Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments*" S.Brown et al. pharmthera.2016.12.001

e- Mutation du gène *SMO*

Les mutations ponctuelles portant sur le gène *SMO* ont été retrouvées dans 2 tumeurs, sans autre mutation associée. Il s'agit dans ces deux cas (une tumeur de grade I et une tumeur de garde II) de la même mutation activatrice faux-sens qui entraine le remplacement d'une leucine en position 412 par une phénylalanine située dans le domaine transmembranaire de la protéine (voir figure 16). Un variant du gène *SMO* a également été mis en évidence dans une tumeur de grade I, il s'agit du variant de signification inconnue Pro647Ser, situé dans la partie cytoplasmique de la protéine, déjà mis en évidence dans d'autres études sur le génotypage de méningiomes.

Figure 16 : Représentation des localisations des mutations sur les domaines protéiques de SMO



Modifié de: "Evaluating Smoothened as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signaling". Katie L. Ayers et al. Trends in cell biology, may 2010

f- Mutation des autres gènes

Deux tumeurs présentent une mutation ponctuelle du gène *NF2* et une délétion du gène *NF2* associée à une mutation de *PIK3CA*, ou *SMARCB1*. Une tumeur présente, associé à deux mutations ponctuelles du gène *NF2* et une délétion du gène *NF2*, un variant de signification inconnue sur le gène *CDKN2A*. Enfin une quatrième tumeur présente une mutation portant sur le gène *TRAF7* et sur le gène *PIK3CA* (voir tableau 15).

Tableau 15 : Résumé des variants pathogènes retenus pour les gènes *PIK3CA* et *SMARCB1* :

Patient	Grade OMS	Sexe	CNV NF2	Gène/Mutation	SIFT	Poly-phen	UMD-predictor	Fréquence GNOMAD	N° dbSNP	Variant décrit comme pathogène (COSMIC)	Mutation associéé
GRADE I											
M 246	I	F	del	PIK3CA : c.1633G>A p.Glu545Lys	Délétère	Potentiellement délétère	Pathogène	1/244778	rs104886003 With Pathogenic allele	COSM763	NF2 : c.94G>T p.Glu32*
GRADE II											
M 280	II	F	del	SMARCB1 : c.1157G>A p.Arg386His	Pathogène	Porbablement délétère	Pathogène	A	rs387906812 With Pathogenic allele	COSM1578803 COSM989	NF2 : c.447+1G>T
M 245	II	F	N	PIK3CA : c.1633G>A p.Glu545Lys	Délétère	Potentiellement délétère	Pathogène	1/244778	rs104886003 With Pathogenic allele	COSM763	TRAF 7 : c.1124G>A p.Gly375Asp

A : absent de la base de données GNOMAD

N : normal

Le variant retrouvé sur le gène *SMARCB1* est un variant de type faux sens, qui résulte en un changement d'acide aminé en position 386 dans la protéine avec une arginine (R) remplacée par une histidine (H). Ce variant est différent des mutations familiales retrouvées dans la littérature, et a déjà été retrouvée dans des cancers (recensée 8 fois dans COSMIC, tractus digestif principalement et un méningiome sporadique). Les deux mutations, associée à *TRAF7* et à *NF2*, retrouvées sur le gène *PIK3CA* sont identiques, il s'agit de la mutation

p.Glu545Lys, qui correspond à un changement d'acide aminé en position 545 dans la protéine avec un glutamate (E) remplacé par une lysine (K). Cette mutation se produit au sein du domaine hélicoïdal de la protéine, et a déjà été retrouvée dans de nombreux cancers (recensée 1650 fois dans COSMIC).
Pour le variant de signification inconnue du gène *CDKN2A* (p.Arg103Lys), les analyses in silico du variant sont en faveur du caractère bénin, mais ce variant n'a jamais été recensé dans la littérature ni dans la base de données GNOMAD.

Enfin pour 8 tumeurs (6 grades I et 2 grades II) aucune mutation sur le panel de gène de notre étude, ni altération du nombre de copies du gène NF2 n'ont été retrouvées. Ainsi par notre approche panel de gènes + analyse du nombre de copies de gène NF2, nous avons été capables d'identifier une altération dans 79 % des tumeurs analysées.

3- Analyse clinicopathologique :

Les données cliniques, biologiques et anatomopathologique étaient disponibles pour 36 tumeurs. Ces données sont présentées en fonction du génotype tumoral dans le tableau 16. Le génotype tumoral est divisé en six sous-groupes :
NF2 : regroupe l'ensemble des altérations du gène *NF2* (mutation et/ou altération du nombre de copie, associé ou non à une mutation autre que *NF2*). TRAF7 : regroupe l'ensemble des mutations du gène *TRAF7* et uniquement *TRAF7*. TRAF7-KLF4 : regroupe l'ensemble des mutations associées *TRAF7-KLF4*. SMO : regroupe les mutations p.Leu412Phe du gène *SMO*. Autre : regroupe toutes les autres mutations (*TRAF7-AKT1, AKT1, TRAF7-PIK3CA, SMO* p.Pro647Ser). Pas de mutation : regroupe les tumeurs ou aucune mutation n'a été retrouvée pour le panel testé.

Tableau 16 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques en fonction du génotype tumoral

	Total	NF2	TRAF7	TRAF7-KLF4	SMO	Autre	Pas de mutation
Sexe							
M	5 (14%)	2	0	0	1	0	2
F	31 (86%)	15	3	3	1	4	5
Total	36	17 (47%)	3 (8%)	3 (8%)	2 (6%)	4 (11%)	7 (19%)
Age							
Moyenne	55	57	58	59	51	60	46
Rang	29-86	36-84	36-86	57-61	54-49	51-74	29-63
Localisation tumorale							
Occipital	6 (17%)	5	0	1	0	0	0
Frontal	7 (19%)	4	0	1	0	1	1
Pariétal	5 (14%)	3	0	0	0	1	1
Temporal	3 (8%)	1	0	0	1	1	0
Sphénoide	13 (36%)	3	3	1	1	1	4
Faux	2 (6%)	1	0	0	0	0	1
Histologie							
Grade I							
Fibroblastique	6 (17%)	5	0	0	0	0	1
Méningothélial	12 (33%)	3	3	1	1	1	3
Transitionnel	2 (6%)	0	0	2	0	0	0
Angiomateux	1 (3%)	0	0	0	0	1	0
Indéterminé	1 (3%)	0	0	0	0	0	1
Total	22 (61%)	8	3	3	1	2	5
Grade II							
Atypique	14 (39%)	9	0	0	1	2	2
Ki-67							
Moyenne		7	3	8	8,5	6,2	7,8
Rang		3-20	2-3	3-15	7-10	1-15	3-20
Envahissement							
Oui	14 (39%)	8	0	2	1	2	1
Non	3 (8%)	1	1	0	0	1	0
NR	19	8	2	1	2	0	6
Nécrose							
Oui	7 (19%)	3	0	0	0	2	2
Non	28 (78%)	14	3	3	2	1	5
NR	1	0	0	0	1	0	0
Atypie cellulaire							
Oui	13 (36%)	7	0	1	1	1	3
Non	19 (53%)	8	3	1	2	1	4
NR	4	2	0	1	0	1	0
Odeme/ effet de masse							
Oui	11 (30,5%)	3	0	2	2	1	3
Non	4(11%)	4	0	0	0	0	0
NR	21	10	3	1	1	2	4
Mitose							
< 4 pour 10	23 (64%)	10	3	3	2	0	5
> 4 pour 10	11 (30,5%)	7	0	0	1	2	1
NR	2	1	0	0	0	0	1

NR : Non renseigné

Nous avons réalisé une analyse clinoco-moléculaire de nos résultats :

- En fonction du grade OMS :

Nous avons retrouvé, parmi les tumeurs de grade II, plus de tumeurs mutées NF2 (65 % contre 36% des grades I), et plus de mutation (14% contre 23 % des grades I) mais sans atteindre le seuil de significativité.

Parmi les tumeurs de grade I nous avons retrouvé 28 % de tumeurs mutées TRAF7 ou TRAF7-KLF4, contre 0% pour les tumeurs de grade II (p=0.0625) à la limite de la significativité. En ne considérant que les délétions du gène NF2, nous avons observé 50 % des tumeurs de grade II délètées, contre 30 % des grades I.

- En fonction de l'histologique :

Parmi les sous types histologiques représentés majoritairement au sein de notre cohorte (fibroblastique et méningothélial), la quasi-totalité des tumeurs fibroblastique sont mutées NF2 (5/6), (p=0.0086). Tandis que pour le sous type méningothélial une hétérogénéité des mutations est retrouvées (3 NF2, 1 SMO, 1 TRAF7-KLF4, 3 TRAF7 et 1 AKT1 et 3 tumeurs sans mutation retrouvée /12). Il est intéressant de noter que parmi toutes ces tumeurs méningothéliales, celles mutées TRAF7 uniquement, ont un Ki-67 bas (< 4%), tandis que les autres ont un Ki-67 élevé (> 4%), (p= 0.0045).

Aucune mutation ne semble être corrélée avec le nombre de mitoses, la présence de nécrose ou d'atypie cellulaire, ou encore un envahissement des structures voisines.

- En fonction des caractéristiques cliniques proprement dites :

La présence d'œdème semble être corrélée avec l'absence de mutation du gène NF2 (p=0.0256).

IV- Etude de l'ADN circulant tumoral :

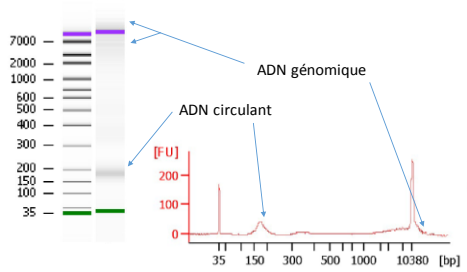
1- Mise au point de l'extraction d'ADN circulant et qualification:

Une mise au point de la préparation des échantillons d'ADN circulant a été nécessaire. Nous avons dans un premier temps testé une extraction manuelle d'ADN circulant sur plasma recueillie sur tube EDTA après double centrifugation, d'après les profils obtenus sur le bioanalyzer (voir figure 17), nous avons été en mesure d'isoler de l'ADN circulant (taille attendu 150-300-450 pdb). Par contre nous avons observé des contaminations par de l'ADN

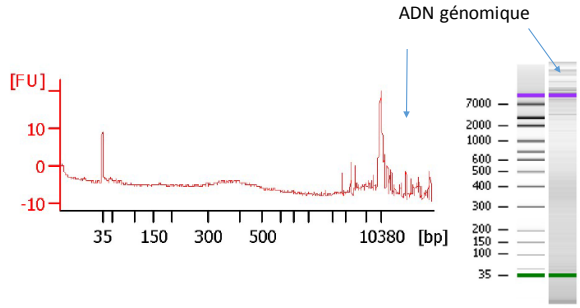
génomique limitées lorsque la double centrifugation est réalisée dans les 2h suivant le prélèvement. Dans un contexte hospitalier il est difficile d'assurer des temps de transports aussi courts. Afin de limiter cette contamination, nous avons décidé d'utiliser des tubes Cell-Free DNA Collection Tube de Roche optimisé pour la conservation des ADNs circulants. Nous avons réalisé une extraction automatisée d'ADN circulant sur Chemagic™ 360 instrument de Perkinelmer, à partir de plasma après double centrifugation. D'après les profils obtenu sur le bioanalyzer (voir figure 17), nous n'avons pas été en mesure d'isoler d'ADN circulant (taille attendu 150-300-450 pdb), et les échantillons présentent des pics de hauts poids moléculaires pouvant correspondre à de l'ADN génomique. Nous avons donc réalisé une extraction manuelle d'ADN circulant à partir de plasma recueillie sur tube Cell-Free DNA Collection Tube de Roche après double centrifugation. D'après les profils obtenus sur le bioanalyzer (voir figure 17), nous avons isolé et purifié l'ADN circulant. Ainsi pour la suite de notre étude nous avons donc collecté le sang sur tube Cell-Free DNA Collection Tube de Roche, et extrait par une méthode manuelle.

Figure 17 : Profil obtenu au bioanalyzer des ADN circulants extraits de façon automatique et de façon manuelle à partir de plasma recueillie sur tube EDTA et sur tube Cell-Free DNA Collection Tube de Roche.

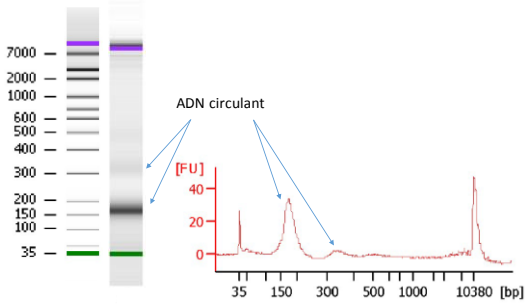
Extraction manuelle sur tube EDTA (patient sain)



Extraction automatique sur tube Cell-Free DNA Collection (méningiome)



Extraction manuelle sur tube Cell-Free DNA Collection (méningiome)



2- Quantification de l'ADN circulant de méningiomes

Nous avons extrait 21 ADN circulant pré-opératoire et 14 ADN circulant post-opératoire. En utilisant ce protocole d'extraction strictement identique, nous avons pu observer des différences de concentration entre les différents patients, mais également entre les prélèvements pré-chirurgicaux et post-chirurgicaux pour un même patient.

En effet dans la majorité dans cas (12/14), les prélèvements post-chirurgicaux contenaient plus d'ADN circulant (voir Tableau 17). Cette augmentation d'ADN circulant entre les deux prélèvements pré-chirurgicaux et post-chirurgicaux peut s'expliquer par le délabrement des tissus lors de l'intervention chirurgicale entrainant par nécrose de plus grande quantité d'ADN circulant plasmatique toujours présent lors du prélèvement post opératoire.

Tableau 16 : Concentration plasmatique en ADN circulant (après extraction manuelle) et mutation de la tumeur associée :

n° Tumeur	n°ADNccf	Concentration ng/ml pré-op	Concentration ng/ml post-op	Mutation de la tumeur associées
251	1	45	30,83	NF2
252	2	27,17	29,5	NF2
256	6	28,5	340	NF2
267	16	50,67	580	NF2
270	21	7,93	NR	NF2
273	22	13,17	NR	NF2
280	28	10,1	NR	NF2 + SMARCB1
263	10	21,17	64,3	TRAF7
260	11	9,67	31	TRAF7
261	12	21,3	50,5	TRAF7 + KLF4
266	19	18,67	200	TRAF7 + KLF4
272	23	8,8	NR	TRAF7 + AKT1
254	4	72	117,33	AKT1
264	14	17,17	69,3	SMO
275	24	6,03	NR	SMO
278	26	13,1	NR	SMO
253	3	14,53	24,67	Pas de mutation
257	7	203,33	5,47	Pas de mutation
258	9	19,67	95,3	Pas de mutation
269	20	13,37	63	Pas de mutation
279	27	10,13	NR	Pas de mutation
	Moyenne	30,1	121,5	
	Max	203,33	580	
	Min	6,03	5,47	
	Médiane	17,17	63,65	
	Ecart type	42,91	158,6	

NR : non réalisé

La concentration en ADN circulant préopératoire ne semble pas corrélée au génotype de la tumeur, mais nécessite d'être évaluer sur une plus large série.

3- Analyse du profil mutationnel de l'ADN circulant obtenu par séquençage haut débit

Nous disposions de 15 ADN circulant pour lesquels une mutation au niveau tumoral a été identifiée par séquençage haut débit.

Nous avons sélectionné en vue d'un séquençage haut débit, 8 de ces ADN circulants. Quatre étaient associés à des tumeurs invasives (envahissement et/ou nombre de mitose élevée) et donc les plus susceptibles de relarguer de l'ADN circulant tumoral. Et quatre associés à des tumeurs localisées à proximité d'une importante structure vasculaire du cerveau (polygone de Willis) (voir tableau 18).

Tableau 18 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques pour les 8 patients sélectionnés pour l'analyse de l'ADN circulant.

N° de la tumeur	N° ADN circulant associé	Concentration en ADN circulant plasmatique en ng/ml pré-op	Données histologique	anti Ki-67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Mitose	Sexe	CNV NF2	Mutation somatique attendue
Grade I												
M 260	11	9,67	Méningothélial et psammomateux	2	Inter optique	86	NR	Non	Non	F	ok	TRAF7 : c.1606G>A p.Gly536Ser
M 261	12	21,3	Méningothélial + qq atypie	7	Toit de l'orbite	57	Dure mère	Non	< 2 pour 10	F	ok	KLF4 : c.1225A>C p.Lys409Gln TRAF7 : c.1675G>T p.Gly559Cys
M 275	24	6,03	Méningothélial et qq atypie	7	Sphéno orbitaire gch	54	NR	Non	Non	F	ok	SMO : c.1234C>T p.Leu412Phe
M 272	23	8,8	qq atypie et transitionnel	7-8 et 2	Tubercule et antérieur frontal	31	NR	Non	< 2 pour 10	F	ok	AKT1 : c.49G>A p.Glu17Lys TRAF7 : c.1911G>C p.Gln637His
Grade II												
M 252	2	27,17	Atypique	10	Sphénoïdo-caverneux droit	69	Os	Oui	5 pour 10	F	del	NF2 : c.501delA p.Glu167fs
M 267	16	50,67	Atypique	15-20	Pariétal parasagittal	72	Dure mère et épicrane	Oui	8 pour 10	F	ok	NF2 : c.855dupT p.Asn286fs
M 270	21	7,93	Atypique	7	Parietal droit	70	Dure mère	Non	< 3 pour 10	M	del	NF2 : c.734delA p.Asp245fs
M 273	22	13,17	Atypique	20	Temporal gauche	84	Non	Non	10 pour 10	F	ok	NF2 : c.448-1G>A

Après préparation des librairies d'ADN circulant, selon les recommandations du fournisseur, et séquençage, les outils bio-informatiques à notre disposition n'ont pas mis en évidence les mutations somatiques attendues dans l'ADN circulant.

Le nombre de codes-barres moléculaires couvrant la position génomique de la mutation somatique attendue, pour chaque ADN circulant est présenté dans le tableau 19. Le nombre de code-barres moléculaires intégrés est insuffisant, selon les recommandations du fournisseur, pour obtenir une sensibilité de détection de 1 %.

Tableau 19 : Nombre de codes-barres moléculaires couvrant la position génomique de la mutation somatique attendue, pour chaque ADN circulant

Numéro ADN circulant	Gène muté (tumeur)	Nombre de code-barres moléculaires à la position de la mutation somatique	Profondeur de lecture à la position de la mutation somatique	Read pairs/UMI	Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable
Mc 2	NF2	45	5273	58	1
Mc 11	TRAF7	221	3586	8	0,1243
Mc 12	TRAF7	587	5595	4,8	0,0799
	KLF4	374	4212	5,6	
Mc 16	NF2	773	3437	2	0,0345
Mc 21	NF2	340	4800	7	0,0919
Mc 22	NF2	365	3259	4,5	0,0367
Mc 23	AKT1	227	2594	5,7	0,0813
	TRAF7	533	5201	4,8	
Mc 24	SMO	459	7881	8,6	0,0735

V- **Etude de la cohorte CEVOREM :**

Nous avons analysé 17 tumeurs fixées en paraffine, pour évaluer la faisabilité de notre méthode en pratique clinique, le matériel fixé en paraffine étant plus proche de la réalité des pratiques de laboratoire de routine. Seule la tumeur 306 n'a pas pu être analysée compte tenu de sa dégradation.

1- Analyse du nombre de copie du gène *NF2* :

Par PCR en temps réel, une délétion du gène *NF2* a été mise en évidence dans 6 tumeurs, 2 tumeurs présentées un nombre de copie normal du gène *NF2*, et pour 7 tumeurs le nombre de copie du gène *NF2* n'a pas pu être déterminé par manque d'amplification de l'échantillon.
On ne considérant que les 8 tumeurs pour lesquelles le nombre de copie du gène *NF2* a été déterminé, on retrouve une délétion du gène *NF2* dans 75 % des tumeurs de cette cohorte contre 40 % pour la cohorte de patient dont le diagnostic a été posé à l'hôpital de la Timone.

Tableau 20 : Résultat de l'analyse du nombre de copie du gène *NF2* de la cohorte CEVOREM :

Sample Name	RQ	Interprétation
101		Indéterminé
104		Indéterminé
105		Indéterminé
106	0.53	Délétion
107	0.95	Normal
108	0.35	Délétion
109	0.21	Indéterminé
110	0.34	Délétion
301	0.44	Délétion
302	0.77	Indéterminé
304	0.41	Délétion
305	0.81	Normal
307	0.33	Délétion
308	0.76	Indéterminé
309	0.18	Indéterminé
310	0.60	Délétion

2- Profil mutationnel des tumeurs obtenu par séquençage haut débit :

Malgré la fragmentation des ADN extraits de ces tumeurs, visible sur les profils du Bioanalyzer, nous avons été en mesure d'obtenir des librairies pouvant être séquencées.

Après analyse in silico des variants obtenus, nous avons ainsi identifié une mutation sur le gène *NF2* dans 67 % des tumeurs (10/17) et nous avons également retrouvé le variant Pro647Ser situé sur le gène *SMO* dans une tumeur. Aucune autre anomalie portant sur les autres gènes du panel n'a été identifiées (voir tableau 20). Trois variants ont été confirmés par une seconde préparation de librairie et un séquençage indépendant.

Tableau 21 : Résumé des variants pathogènes retenus pour les tumeurs FFPE

Patient	CNV NF2	Gène/Mutation	(Prédiction d'épissage) HSF	SIFT	Poly-phen	UMD-predictor	Fréquence GNOMAD	Variant décrit comme pathogène (COSMIC)	Comentaire
101	Ind	NF2 : c.1341-2A>C	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing	NA	NA	NA	A	COSM1415654 COSM24552	
104	Ind	NF2 : c.1080delG p.Leu361fs	NR	NA	NA	NA	A	COSM22451	Confirmé sur une 2eme manipulation
105	Ind	NF2 : c.134_135delAC p.Asp45fs	NR	NA	NA	NA	A		
106	Del	NF2 : c.592C>T p.Arg198*	NR	NA	NA	Pathogène	A	COSM22432	
		NF2 : c.134_135delAC p.Asp45fs	NR	NA	NA	NA	A		
108	Del	NF2 : c.517-2A>G	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing	NA	NA	NA	A		Patient M189
109	Ind	NF2 : c.364-2A>G	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing	NA	NA	NA	A	COSM1415571 COSM23985	
301	Del	SMO : c.1939C>T p.Pro647Ser	NR	Toléré	Probablement pathogène	Probablement bénin	0,0051 (dont 4 homozygote)		Confirmé sur une 2eme manipulation
302	Ind	NF2 : c.784C>T p.Arg262*	NR	NA	NA	Pathogène	A	COSM22000	Confirmé sur une 2eme manipulation
304	Del	NF2 : c.1340+1G>A	Alteration of the WT donor site, most probably affecting splicing.	NA	NA	NA	A	COSM22301 COSM34046	
305	N	NF2 : c.1317delG p.Met440fs	NR	NA	NA	NA	A		
307	Del	NF2 : c.1128delG p.Ser377fs	NR	NA	NA	NA	A		
310	N	NF2 : c.143_147delATTTG p.Asp48fs	NR	NA	NA	NA	A		
107	N	Pas de mutation retrouvée							
110	Del								
306	?								
308	Ind								
309	Ind								

NA : Non applicable : Compte tenu de la nature des variants, les algorithmes UMD-predictor, SIFT et Poly Phen ne sont pas utilisable, cependant il y a un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré.
NR : non réalisé.
A : absent de la base de donnée GNOMAD (Anciennement Exome Aggregation Consortium (ExAC), the Genome Aggregation Database est une base de données qui récence 123.136 exomes et 15.496 génomes).
Ind : statut du gène NF2 non déterminé compte tenu de la dégradation de l'ADN
Del : délétion du gène NF2
N : normal

5 ème partie : Discussion

Méthode : choix approche de séquençage

Le choix de la technologie de séquençage devait répondre à plusieurs critères :

- Capacité de travailler sur de l'ADN de différentes qualités issu de différents types de matériels (ADN circulant, ADN tumoral, ADN tumoral issu de tumeurs fixées en paraffine)
- Capacité de travailler sur de l'ADN en faible quantité (ADN circulant, et ADN tumoral issu de tumeurs fixées en paraffine)
- Capacité de détection de variation de faible fréquence allèlique (ADN circulant)
- Compatibilité avec le séquenceur MiSeq d'Illumina

Il était donc indispensable de travailler avec une méthode robuste présentant un enrichissement efficace.

Dans les technologies de séquençage haut débit, les méthodes d'enrichissement des régions d'intérêts se font principalement soit par amplification au moyen d'amorce sélectionnées, soit par capture. Nous avons choisi de travailler avec le kit de Qiagen : QIAseq targeted DNA Kit, dont la méthode d'enrichissement se fait par amplification.

Par amplification non uniforme, présence de duplicats de PCR et par l'introduction de variants artéfactuels liés à des erreurs de réplications de la Taq polymérase, les méthodes d'enrichissement par amplification peuvent induire des biais de séquençage et la présence de faux positif (présence de variant de séquence non présent dans l'échantillon initial), limitant la sensibilité de la technique. De plus des erreurs intrinsèques de séquençage liées au séquenceur haut débit peuvent s'ajouter à ces biais de séquençage en y limitant encore la sensibilité. On estime que ce taux d'erreurs est de l'ordre de 1 à 0.05% avec les appareils de séquençage d'Illumina, en fonction de la longueur des fragments de lecture, de l'algorithme d'appel de base utilisé, et du type de variants détectés. [62]
De plus la fixation en paraffine des tumeurs, induit par le biais du formol, une fragmentation de l'ADN et des artefacts de séquençage non reproductibles après amplification PCR. Pour notre étude, il était indispensable de discriminer efficacement ces artefacts, compte tenu de notre volonté à détecter des variants de faible fréquence allélique dans l'ADN circulant et à travailler sur du matériel issu de tumeurs fixées en paraffine.

L'utilisation de codes-barres moléculaires permet de résonner en termes de nombre de copie d'ADN, un code-barres moléculaire équivaut à une copie d'ADN qui sera ensuite amplifiée. La discrimination des variants est donc plus aisée et plus vrai, par rapport à l'étude de la profondeur des variants seule, et la sensibilité de la technique améliorée. Mais l'intégration des codes-barres moléculaires dépend de la quantité d'ADN initiale mais également de sa qualité. Nous avons pu observer que les ADN issus de tumeurs congelées ont intégré plus de codes-barres moléculaires que les ADN issus de tumeurs fixées, pour lesquelles l'ADN était fragmenté, et que les ADN circulant, pour lesquelles la quantité d'ADN était limitée. Par conséquent la sensibilité de la technique est la meilleure pour les ADN issus de tumeurs congelées.

Résultats

Nous avons effectué par séquençage haut débit l'analyse d'un panel de 13 gènes sur 38 méningiomes congelés ainsi qu'une analyse du nombre de copie du gène *NF2*, et nous avons relevé des altérations génétiques dans 79 % des cas. Nous avons également effectué le même type d'analyse sur 17 méningiomes fixés en paraffine, ou nous avons identifié des altérations génétiques dans 67 % des cas.

- Analyse du nombre de copie du gène *NF2* :

39 % des tumeurs de la cohorte Timone, présentent une altération du nombre de copie du gène NF2 (associé dans 53 % des cas à une mutation du gène *NF2*). Dans la littérature, la fréquence d'altération du nombre de copie du gène *NF2* est plutôt de l'ordre de 60% [49]. Cependant nous avons utilisé un gène de référence (RNAse P) situé sur le chromosome 14 (14q11.2), une monosomie de ce chromosome a été rapporté par plusieurs études [21]. Il serait intéressant de re-tester les tumeurs ne portant pas d'altération en utilisant un autre gène de référence, ou de déterminé le statut du gène *NF2* de ces tumeurs par l'analyse du nombre de copies du gène *NF2* à partir des données de séquençage haut débit, en utilisant de nouveau outils bio-informatiques tels que Exome depth ou Read depth [63]. Cela présenterait en plus l'avantage d'étudier l'ensemble des régions couvertes par notre panel de gènes, et de ne pas se limiter au gène *NF2*.

Pour la cohorte CEVOREM, 75 % des tumeurs analysables présentent une délétion du gène *NF2*. Le nombre de copies du gène *NF2* n'a pu être déterminé pour 7 tumeurs, par manque d'amplification de l'ADN. De même que pour les tumeurs congelées, on pourrait envisager de

déterminé le statut du gène *NF2* de ces tumeurs par l'analyse du nombre de copies du gène *NF2* à partir des données de séquençage haut débit.

- Séquençage haut débit :

60.5 % des tumeurs issues de la cohorte Timone présentent une mutation pathogène ponctuelle. Cependant nous n'avons pas étudié le gène *POLR2A* (codant pour la sous-unité RPB1 de l'ARN polymérase II) qui a été identifié après le design de notre panel de gènes. [41] Ainsi il serait intéressant de re-séquencer les tumeurs en particulier celles pour lesquelles aucune mutation n'a été retrouvée, en étudiant ce gène.

Pour les tumeurs de la cohorte CEVOREM, nous avons identifié par séquençage haut débit, des mutations du gène *NF2* dans 67 % des cas, malgré une sensibilité de la technique plus limitée par rapport aux tumeurs congelées avec la présence d'artéfact de séquençage. En effet le pipeline d'analyse bio-informatique a identifié pour deux prélèvements, l'un congelé et l'autre fixé en paraffine, issus d'une même tumeur 7 variants pour le prélèvement congelé (M189) contre 77 variants pour le prélèvement fixé en paraffine (108). La présence des codes-barres moléculaires a clairement permis d'optimiser l'analyse bioinformatique par élimination de ces artefacts.

En vue d'une optimisation, un re-séquençage haut débit après traitement des ADN par une solution de réparation de l'ADN (type NEBNext FFPE DNA Repair Mix de New Englans Biolabs) a été effectué pour 8 tumeurs fixées en paraffine (105, 106, 107, 110, 306, 308, 309, 310). L'intégration des codes-barres moléculaires n'a pas été optimal après ce traitement et la sensibilité de la technique très diminuée, rendant la détection de variant presque impossible.

Une optimisation du pipeline d'analyse pourrait nous apporter des informations complémentaires, mais la sensibilité de l'analyse est dépendante du nombre de code-barres moléculaires intégrés, limité par la qualité des ADN mais aussi par leurs quantités. Une optimisation du rendement de l'extraction de ces ADN pourrait être bénéfique, ainsi qu'une extraction à partir d'une quantité initiale de prélèvement plus importante.

- Classification des variants :

A l'instar des recommandations de l'ACMG (ACMG Standards and Guidelines, janvier 2015), pour l'étude des variants constitutionnels, il existe des recommandations pour la classification des variants somatiques, publié en janvier 2017 [64]. Cependant compte tenu de la nature même des variants que nous avons identifié et du nombre restreint d'études sur

l'analyse des variants somatiques de méningiomes du fait de leurs découverte récentes, nous n'avons pas jugé utile d'utiliser cette classification et nous avons classé nos variant en nous appuyant sur les analyse in silico ainsi que la littérature. Seul deux variant demeurent de signification inconnue, le variant p.Pro647Ser du gène *SMO*, et le variant p.Arg103Lys du gène *CDKN2A*. Le variant p.Pro647Ser du gène *SMO* est décrit comme pathogène dans la littérature mais les analyses in silico sont en faveur du caractère bénin, et la fréquence est de 0,0051% dans GNOMAD dont 4 homozygotes. Aucune étude fonctionnelle n'a été effectuée. Cependant nous avons retrouvé 2 fois ce variant (3.78%) dans l'ensemble de nos tumeurs séquencées (seul et en association avec une délétion du gène NF2). Ce variant rare dans la population générale pose la question d'un variant de susceptibilité plutôt que d'un variant pathogène. Le caractère somatique de ce variant a pu être confirmé pour la tumeur (M264) ou il a été retrouvé seul, cependant une analyse fonctionnel de ce variant reste nécessaire à sa classification.
Les analyses in silico du variant p.Arg103Lys du gène *CDKN2A* sont en faveur du caractère bénin, mais ce variant n'a jamais été recensé dans la littérature ni dans la base de données GNOMAD. Il a été retrouvé en association avec une délétion et deux mutations du gène NF2, dans une tumeur de garde I fibroblastique. La détermination du caractère somatique et une étude fonctionnelle de ce variant est nécessaire à sa classification.

<u>Corrélation génotype – phénotype :</u>

Malgré le nombre restreint de notre cohorte Timone nous avons pu identifier des premières corrélations génotype phénotypes. Notamment la présence d'œdème qui semble être corrélée avec l'absence de mutation du gène *NF2* et la présence de mutations de *TRAF7* seul, qui semble être corrélé avec un Ki-67 bas pour les tumeurs méningothéliales. Ces deux observations n'ont à ce jour pas été décrites dans la littérature et nécessite d'être étudié sur une plus large série de tumeur.

Il est claire que, comme cela est déjà décrit dans la littérature, le caractère délétère de NF2 n'est plus à prouver puisque seules des altérations du gène *NF2* ont été retrouvées par l'analyse des tumeurs CEVOREM issus d'une cohorte de patients qui présentent des méningiomes particulièrement agressifs. Cependant certains patients de la cohorte Timone présente également des altérations de ce gène avec un caractère tumoral bénin.

Ainsi les altérations de NF2 seules ne sont pas suffisantes pour expliquer le phénotype, et d'autres marqueurs génétiques potentiels sont à envisager.

Autres marqueurs génétiques potentiels :

- Cytogénétique :

Outre la perte du chromosome 22, d'autres altérations cytogénétiques sont décrites dans les méningiomes : par la technique d'hybridation génomique comparative (CGH), Weber et al. ont quantifié le nombre moyen d'aberrations génomiques détectées dans les méningiomes : 3 dans les grades I, 9 dans les grades II, et 13 dans les grades III. [21] La plupart de ces autres altérations génétiques sont des délétions chromosomiques récurrentes : les plus fréquentes, après la délétion du chromosome 22, sont des délétions des chromosomes 1p, 10q, 14q. De façon moins fréquente, d'autres altérations (perte des chromosomes 6p, 9q, 18q, gains des chromosomes 1q, 9q, 12q, 15q, 17q et 20q) ont été rapportées. Ces altérations se rencontrent principalement dans les grades II et III. Mis à part la perte du chromosome 22, peu de variations du nombre de copies dans les méningiomes de garde I ont été observé, à l'exception du sous-type angiomateux, qui peut exprimer des gains chromosomiques (chromosome 5). [21]

Indépendamment des voies d'initiation tumorale, l'accumulation d'altérations cytogénétiques, conduit généralement à une maladie plus agressive et un grade tumoral plus élevé qui pourrait expliquer les différences phénotypiques observées. [22] En pratique malgré la corrélation de ces altérations cytogénétiques et du grade histologique, elles ne sont pas étudiées en routine lors du diagnostic.

- Méthylation de l'ADN :

Une autre explication de ces variations phénotypiques pourrait s'expliquer par l'épigénétique

Récemment une équipe a étudié les profils de méthylation à l'échelle du génome d'une série de 806 tumeurs cérébrales extra-parenchymateuses dont 497 méningiomes. Il a été observé clairement, par clustering non supervisé, des profils de méthylation différent entre les méningiomes et les autres tumeurs extra-parenchymateuses. De plus l'analyse non supervisée des méningiomes seuls a identifié deux sous-groupes épigénétiques différents. Le groupe A, lui même subdivisé en 4 classes (3 classes bégnines et une classe intermédiaire) et le groupe B, subdivisé en 2 classes (une classe intermédiaire et une classe maligne). Ces six classes

présentaient des profils cytogénétique, moléculaire et histologique bien distincts. Les tumeurs de grade I ségrégaient dans le groupe A, au sein des 3 classes bégnines, les tumeurs de grade III ségrégaient dans le groupe B au sein de la classe maligne, tandis, que les tumeurs de grade II étaient distribuées au sein de toutes les classes. En termes de pronostic, 228 tumeurs ont pu être analysées, il a été observé que la survie sans progression à 10 ans était mieux définie par l'analyse des classes de méthylation par rapport à la classification OMS. Plus intéressant encore, en se focalisant sur 52 tumeurs pour lesquelles l'analyse de classe de méthylation et le grade OMS étaient très divergent, l'étude a montré que le devenir des patients de grade I ayant une classe de méthylation intermédiaire était le même que des patient présentant une tumeur de grade II, et inversement, le devenir des patient de haut grade ayant une classe de méthylation bégnine, était le même que des patients de grade I. [66]

ADN circulant et autre approche innovante

Nous n'avons pas été en mesure de détecter de l'ADN circulant tumoral plasmatique au sein de notre cohorte, cela peut s'expliquer de plusieurs façons.

Nous avons été limités en termes de sensibilité par la méthode, du fait de la quantité insuffisante de codes-barres moléculaires intégrés liée à la faible quantité d'ADN circulant. En multipliant le nombre de librairie, en utilisant la totalité de l'échantillon, puis en analysant simultanément, à l'aide des outils bio-informatiques les données de séquençage, nous pouvons espérer à une plus grande quantité de codes-barres moléculaires intégrés à l'échantillon et à une meilleur sensibilité.

Cela peut aussi s'expliquer par une fraction tumorale très faible (< 1%) au sein de l'ADN circulant et il faudra alors envisager une autre technique plus sensible, telle que la PCR digitale (sensibilité < 0.01%). Cependant compte tenu de l'hétérogénéité des mutations pour certains gènes (NF2 et TRAF7 particulièrement), il semble difficilement envisageable de mettre au point une technique de détection d'ADN circulant tumoral dans un cadre de routine de laboratoire par cette technique. Toutefois, dans le cadre de la recherche, dans une optique de preuve de concept, il serait très intéressant de mettre au point cette technique.

Enfin nous pouvons également supposer que l'ADN circulant tumoral ne passe pas dans la circulation sanguine et il est alors impossible de le détecter dans le plasma. Les concentrations en ADN circulant préopératoire vont plutôt dans le sens de l'absence de passage dans la circulation sanguine de l'ADN tumoral, car les concentrations obtenues sont proches de celle d'un sujet sain. En effet une revue de la littérature, incluant des articles publiés entre 1998 et 2008 s'intéressant à l'ADN circulant plasmatique retrouve des concentration en ADN

circulant plasmatique comprise entre 0 et 128 ng / mL avec une moyenne de 15 ng / mL isolée chez des individus en bonne santé et entre 0 et 4738 ng / mL avec une moyenne de 137 ng / mL pour les patients atteints de cancer (cependant en l'absence de standardisation dans l'extraction de l'ADN circulant plasmatique et dans la mesure de ces concentrations, il est difficile de se comparer à d'autres études) [58]. Un article publié récemment qui a analysé l'ADN tumoral de gliomes et de médulloblastomes dans le LCR, a pu détecter l'ADN tumoral dans 75 % des cas [65]. Il faudrait alors envisager de rechercher l'ADN circulant tumoral de méningiome dans le LCR. En effet bien qu'une ponction lombaire soit un geste invasif, il demeure cependant un geste moins contraignant qu'une biopsie cérébrale.

6 ème partie : Conclusion et perspective

Notre objectif était d'étudier sur le plan moléculaire une série de méningiomes afin d'en dégager de nouveaux marqueurs biologiques et de tester une nouvelle approche non invasive dans l'étude de ces marqueurs par séquençage haut débit.
Dans un premier temps, nous avons étudié une série de tumeurs congelées issues d'une cohorte de patients diagnostiqués à l'hôpital de la Timone, pour laquelle nous avons pu observer des premières corrélations génotype-phénotype.
Dans un second temps, nous avons étudié une série de tumeurs fixées en paraffine particulièrement agressives, issues d'un essaies clinique CEVOREM, qui nous a permis, en plus de confirmer le caractère délétère d'une altération du gène *NF2*, de tester notre méthode sur du matériel de qualité et de quantité moindre.
Enfin nous avons, pour la première fois étudié l'ADN circulant dans cette pathologie.

Le système de code barre moléculaire nous a permis d'obtenir de bon résultats y compris pour des tumeurs fixées en paraffine. Pour les tumeurs congelées, nous avons relevé des altérations génétiques dans 79 % des cas. 39 % des tumeurs présentent une altération du nombre de copie du gène *NF2* (associé dans 53 % des cas à une mutation du gène *NF2*) et 60.5 % des tumeurs présentent une mutation pathogène ponctuelle. De plus nous avons pu établir des premières corrélations génotype-phénotype comme celle des mutations de *TRAF7* avec un Ki-67 bas ou celles de *NF2* avec l'œdème cérébral. Pour les tumeurs fixées en paraffine, nous avons relevé des altérations génétiques dans 67 % des cas, malgré la dégradation des ADN et de la présence d'artéfacts de séquençage. Enfin si nous avons bien isolé de l'ADN circulant du plasma de patients porteurs de méningiomes nous n'avons pu identifier de mutation, cependant notre technique manquait de sensibilité.

Ce travail ouvre des perspectives prometteuses mais doit être poursuivies sur une plus large série de tumeurs pour valider et étendre les premières corrélations génotype-phénotype identifiées dans un but diagnostic et pronostic. L'analyse du nombre de copie des gènes de notre panel à partir des données de séquençage haut débit, pourrait nous apporter encore plus d'élément de réponse quant à la variabilité phénotypique de ces tumeurs. Dans un but thérapeutique, même si des études cliniques sont nécessaires, l'étude moléculaire de ces tumeurs ouvre la voie aux traitements personnalisés, notamment en cas de mutation sur les gènes *AKT1, SMO* ou encore *PIK3CA*, pour lesquels il existe des inhibiteurs ciblés. Enfin la

piste de l'ADN circulant même si les premiers résultats sont négatifs n'est pas finie d'être explorée, notamment par l'étude dans le LCR de l'ADN circulant. Le séquençage haut débit pourrait donc se révéler un atout précieux dans la prise en charge de ces tumeurs.

Bibliographie :

[1] Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM et al. Epidemiology of intracranial meningioma. Neurosurgery 2005;57: 1088–1095.

[2] Gao X, Zhang R, Mao Y, Wang Y: Childhood and juvenile meningiomas. Childs Nerv Syst 2009, 25(12):1571-1580.

[3] Zülch KJ (ed) (1979) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva

[4] Louis DN, S.B., Budka H, von Deimling A, Kepes JJ, Meningiomas. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics. Tumour of the nervous system 2000. 175-184.

[5] Louis DN et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016

[6] I. Baldia et al, Epidemiology of meningiomas. J.neuchi.2014.05.006

[7] N'Dri D., Ben Ismail M., François P., Jan M. Analyse du devenir post-opératoire des méningiomes intracrâniens. http://campus.neurochirurgie.fr/spip.php?article850

[8] S. Zouaoui et al. Recensement National histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : Résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. Neurochirurgie 2012 ; 58 : 4–13

[9] Ruiz J, Martinez A, Hernandez S et al. Clinicopathological variables, immune phenotype, chromosome 1p36 loss and tumour recurrence of 247 meningiomas grade I and II. Histol Histopathol 2010;25:341–349.

[10] Adeberg S, Hartmann C, Welzel T et al. Long-term outcome after radiotherapy in patients with atypical and malignant meningiomas–clinical results in 85 patients treated in a single institution leading to optimized guidelines for early radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2012;83:859–864.

[11] Roland Goldbrunner et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. Lancet Oncol 2016; 17: e383–91

[12] Les méningiomes Extrait du Campus de Neurochirurgie http://campus.neurochirurgie.fr /spip.php?article367

[13] Whittle, I.R., et al., Meningiomas. Lancet, 2004. 363(9420): p. 1535-43.

[14] Vargas, M.I., et al, Les méningiomes rachidiens extraduraux : données IRM à propos de deux observations. Journal of Neuroradiology, 2004. 31(3) : p.214-219

[15] Alexey Surovet al. Distant metastases in meningioma: an underestimated problem Journal of Neuro-Oncology May 2013, 112: p. 323–327

[16] S. Ather Enam et al. Metastasis in meningioma. Acta Neurochirurgica October 1996, Volume 138, Issue 10, pp 1172–1178

[17] F. Gray, J. Poirier. Neuropathologies des tumeurs intra-crâniennes http://campus.neurochirurgie.fr/spip.php?article378

[18] Renate Lüllmann-Rauch – Histologie ; De Boeck Supérieur - 2008

[19] M. Sanson et al. Données générales de neuro-oncogenèse ; EMC-Neurologie1(2004) 75–89

[20] Zankl H, Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. Humangenetik 1972;14: 167–169.

[21] Bi WL et al. Meningioma Genomics: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. Front. Surg (2016). 3:40.

[22] Weber RG et al. Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. Proc Natl Acad Sci 1997, 94(26):14719-14724.

[23] Peyre M, Kalamarides M. Molecular genetics of meningiomas: Building the roadmap towards personalized therapy. Neurochirurgie (2014),

[24] Tomoyo Okada et al. Shedding light on Merlin's wizardry; TRENDS in Cell Biology 2007; Vol.17 No.5

[25] Rockhill J, Mrugala M, Chamberlain MC: Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. Neurosurg Focus 2007, 23(4):E1.

[26] D. Saloner et al. Modern meningioma imaging techniques. J Neurooncol. 2010 Sep; 99(3): 333–340.

[27] YS. Ding et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human meningiomas and peritumoral brain areas. Ann Clin Lab Sci. 2008 Autumn;38(4):344-51.

[28] T. Graillon et al. Octreotide therapy in meningiomas: in vitro study, clinical correlation, and literature review. J Neurosurg. 2017 Sep;127(3):660-669.

[29] Bruna, J., et al., Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. Neuropathology, 2007. 27(2): p. 114-20.

[30] Irradiation intracrânienne en conditions stéréotaxiques : les méningiomes – Rapport d'évaluation : Tome I. Haute Autorité de Santé / SEAP – SEESP / novembre 2011

[31] M. Preusser et al. Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. Nat Rev Neurol. 2018 Jan.

[32] Smith MJ, O'Sullivan J, Bhaskar SS, Hadfield KD, Poke G, Caird J, et al. Loss of function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinalmeningiomas. Nat Genet 2013;45(3):295–8.

[33] Aavikko M, Li SP, Saarinen S, Alhopuro P, Kaasinen E, Morgunova E, et al.Loss of SUFU function in familial multiple meningioma. Am J Hum Genet2012;91(3):520–6.

[34] Christiaans I, Kenter SB, Brink HC, van Os TA, Baas F, van den Munckhof P, et al.Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. J Med Genet 2011;48(2):93–7.

[35] Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA et al. « Neurofibromatosis type 2 » Lancet 2009;373:1974-1986

[36] Peyre M, Kalamarides M. Molecular genetics of meningiomas: Building the roadmap towards personalized therapy. Neurochirurgie (2014)

[37] Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. Nat Genet 2013;45: 285–289

[38] Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. Science 2013;339: 1077–1080.

[39] Abedalthagafi M, Bi WL, Aizer AA et al. Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma. Neuro Oncol 2016

[40] Sahm F, Schrimpf D, Olar A et al. TERT promoter mutations and risk of recurrence in meningioma. J Natl Cancer Inst 2016;108.

[41] Clark, V. E. et al. Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. Nat. Genet. 48, 1253–1259 (2016).

[42] Rempel SA, Schwechheimer K, Davis RL, et al. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. Cancer Res 1993;53:2386e2392.

[43] Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, et al. Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. Neuropathol Appl Neurobiol 1998;24:3e8.

[44] Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. J Neurooncol 2004;70:183e202.

[45] Xu LG, Li LY, Shu HB. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. J Biol Chem 2004;279:17278.

[46] Tiziana Zotti et al. The Emerging Role of TRAF7 in Tumor Development. J Cell Physiol. 2017 Jun; 232(6): 1233–1238..

[47] Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature2007;448(7152):439–44.

[48] Ng JM, Curran T. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting can-cer. Nat Rev Cancer 2011;11(7):493–501.

[49] Sayaka Yuzawa et al. Genetic landscape of meningioma. Brain Tumor Pathol (2016) 33:237–247

[50] Vinagre J et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. Nat Commun. 2013;4:2185

[51] Nader Chalhoub et al. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. Annu Rev Pathol. 2009; 4: 127–150.

[52] Matthias Preusser et al. Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. Nature reviews | neurology : doi:10.1038/nrneurol.2017.168 Published online 5 Jan 2017

[53] Boetto J et al. SMO mutation status defines a distinct and frequent molecular subgroup in olfactory groove meningiomas. Neuro Oncol. 2017 Mar 1;19(3):345-351

[54] Yesilöz Ü et al. Frequent AKT1E17K mutations in skull base meningiomas are associated with mTOR and ERK1/2 activation and reduced time to tumor recurrence. Neuro Oncol. 2017 Aug 1;19(8):1088-1096

[55] Klaus Jung, Michael Fleischhacker, Anja Rabien. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. Clinica Chimica Acta 411 (2010) 1611–1624

[56] D. Pietrasz, N. Pécuchet, E. Fabre, H. Blons, L. Chevalier, V. Taly, et al. Quel avenir pour l'ADN tumoral circulant ? État des lieux et perspectives dans les cancers colorectaux, pulmonaires non à petites cellules et pancréatiques. Bulletin du cancer tome 103 > n81 > janvier 2016

[57] Tissot C, et al. Intérêts de l'ADN circulant pour la prise en charge du cancer bronchopulmonaire. Rev Pneumol Clin (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.pneumo.2015.05.001

[58] Van der Vaart et al. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? Clin Biochem. 2010 Jan;43(1-2):26-36

[59] Eleonora Zonta et al. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research, Adv Clin Chem. 2015;70:197-246

[60] Jennifer L McLarty et al. Circulating Cell-Free DNA: The Blood Biopsy in Cancer Management, MOJ Cell Sci Rep 2015, 2.

[61] Kock et al. High-sensitivity sequencing reveals multi-organ somatic mosaicism causing DICER1 syndrome. J. Med. Genet. 2016

[62] Kinde et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 7;108(23):9530-5.

[63] Min Zhao et al. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. BMC Bioinformatics 2013 14 (Suppl 11)

[64] Marilyn M.Li et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. The Journal of Molecular Diagnostics - Volume 19, Issue 1, January 2017, Pages 4-23

[65] Yuxuan Wang et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. PNAS 2015 vol. 112 no. 31.

[66] Felix Sahm et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. Lancet Oncol 2017- Published Online : March 14, 2017

Annexes:

Données de l'analyse primaire fournie par le pipeline bio-informatique issues des différents séquençages.

Run 1	M86	M254	M256	M260	M261	M263	M264	M265
% dans le RUN (normalisation)	1,5252	3,046	2,704	15,3672	1,3872	0,8563	4,0407	2,8066
Nombre de lectures totales	365 600	730 154	648 173	3 683 609	332 522	205 252	968 574	672 762
Nombre de lectures filtrées	278281 (87,17%)	539713 (85,54%)	473918 (84,72%)	2416719 (80,46%)	232204 (81,40%)	146999 (84,37%)	668459 (82,58%)	449314 (86,33%)
Profondeur moyenne de lecture	1 392,40	2 751,65	2 434,56	11 169,94	1 175,27	735,31	3 093,97	2 223,63
Nombre de codes bares moléculaires integrés	218 655	386 190	340 464	960 447	183 609	134 590	270 678	177 687
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	1,3	1,4	1,4	2,5	1,3	1,1	2,5	2,5
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	621,37	1 191,62	1 066,00	2 490,54	551,85	398,97	744,14	533,18
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,0388	0,0222	0,0238	0,0174	0,0380	0,0496	0,0326	0,0400
Nombre de variants trouvés par smCounter	5	7	8	7	7	5	7	4
Nombre de variants retenus comme pathogène	2	1	1	1	2	1	1	0
% de couverture à 200X	89%	98%	98%	99%	84%	56%	98%	98%

Run 2	M58	M163	M164	M189	M244	M245	M246	M251	M252	M266	M267	M269	M270	M272	M273	M275
% dans le RUN (normalisation)	4,6745	4,3891	2,3814	8,3147	9,6422	2,3233	7,9869	4,2261	6,4916	3,7555	4,3324	9,9711	5,6881	4,8829	4,3006	4,4433
Nombre de lectures totales	1 087 584	1 021 178	554 049	1 934 506	2 243 360	540 544	1 858 244	983 254	1 510 334	873 750	1 007 988	2 319 894	1 323 394	1 136 071	1 000 582	1 033 787
Nombre de lectures filtrées	390039 (83,51%)	810531 (87,01%)	428548 (87,72%)	1590571 (90,89%)	1867234 (91,85%)	422979 (85,86%)	1435862 (87,29%)	764873 (86,77%)	1170725 (84,84%)	676759 (85,70%)	803476 (86,80%)	1796531 (84,33%)	1034129 (86,58%)	889242 (85,72%)	754061 (85,22%)	799375 (85,10%)
Profondeur moyenne de lecture	1 897,15	4 644,95	2 360,16	8 717,61	10 650,61	2 483,43	7 660,49	4 025,89	7 203,04	4 040,48	5 068,15	11 139,00	6 247,07	5 311,14	4 690,52	4 856,77
Nombre de codes bares moléculaires integrés	340 484	277 923	315 938	848 887	778 640	259 851	682 867	199 034	223 502	210 889	229 223	207 928	125 940	173 532	60 888	212 896
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	1,1	2,9	1,4	1,9	2,4	1,6	2,1	3,8	5,2	3,2	3,5	8,6	8,2	5,1	12,4	3,8
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	911,91	1 015,87	979,96	2 815,57	2 510,62	892,50	2 125,23	632,18	746,91	750,21	820,02	710,85	415,94	578,12	208,79	706,62
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,0311	0,0211	0,0338	0,0516	0,0182	0,0266	0,0156	0,0355	0,0295	0,0267	0,0312	0,0339	0,0481	0,0321	0,0792	0,0295
Nombre de variants trouvés par smCounter	10	4	8	7	5	7	11	8	5	7	4	3	4	7	10	6
Nombre de variants retenus comme pathogène	0	0	2	1	1	2	2	3	1	2	1	0	1	2	1	1
% de couverture à 200X	94%	98%	96%	98%	99%	98%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	99%

Run 3	M22	M24	M25	M55	M74	M165	M253	M255	M257	M258	M278	M279	M280	M295
% dans le RUN (normalisation)	6,147	6,3809	5,8614	10,0681	13,6713	8,2325	7,9516	10,7529	3,5479	1,3502	4,5619	9,9078	3,7357	1,7856
Nombre de lectures totales	907 033	941 556	864 892	1 485 632	2 017 314	1 214 779	1 173 331	1 586 674	523 529	199 233	673 149	1 461 983	551 231	263 481
Nombre de lectures filtrées	681753 (85,53%)	717730 (84,17%)	599997 (81,27%)	1122120 (84,30%)	1531554 (84,84%)	963424 (88,98%)	857253 (84,30%)	1182463 (84,33%)	415721 (85,99%)	153481 (85,53%)	504096 (83,39%)	1104296 (83,59%)	418508 (84,44%)	200046 (82,72%)
Profondeur moyenne de lecture	3 701,40	3 848,73	3 804,48	5 964,97	7 894,31	4 979,45	4 126,32	5 989,00	2 338,78	837,66	2 774,72	5 976,54	2 324,85	1 208,24
Nombre de codes bares moléculaires integrés	292 224	265 048	477 855	326 332	929 024	547 199	360 610	385 097	245 743	121 969	239 350	323 778	145 598	96 384
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	2,3	2,7	1,3	3,4	1,6	1,8	2,4	3,1	1,7	1,3	2,1	3,4	2,9	2,1
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	1 009,36	788,76	1 819,13	955,75	2 630,71	1 542,57	939,76	1 066,75	891,02	410,63	891,61	1 121,99	497,48	365,51
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,0225	0,0284	0,0155	0,0319	0,0165	0,0447	0,0297	0,0250	0,0260	0,0442	0,0251	0,0210	0,0378	0,0545
Nombre de variants trouvés par smCounter	6	5	6	3	7	6	10	6	5	5	2	4	9	4
Nombre de variants retenus comme pathogène	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
% de couverture à 200X	99%	98%	98%	98%	99%	97%	99%	99%	98%	81%	98%	99%	98%	96%

Run 4 : ADN circulant	MC11	MC12	MC16	MC21	MC22	MC23	MC24	MC2
% dans le RUN (normalisation)	7,7506	7,9612	9,6948	7,109	14,8635	8,2498	12,7249	12,1705
Nombre de lectures totales	769 991	790 913	963 140	706 255	1 476 635	819 592	1 264 171	1 209 096
Nombre de lectures filtrées	278947 (85,44%)	302675 (85,75%)	394591 (87,69%)	293014 (88,01%)	630343 (88,09%)	334235 (87,88%)	530520 (87,87%)	434245 (83,78%)
Profondeur moyenne de lecture	1 623,72	1 738,06	2 247,23	1 679,02	3 559,13	1 935,22	2 961,28	2 524,14
Nombre de codes bares moléculaires integrés	16 888	26 945	71 081	19 510	58 073	26 058	28 674	877
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	17,7	11,7	5,7	15,6	11,0	12,9	18,9	501,5
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	54,42	85,82	215,19	67,93	189,39	83,84	93,80	3,12
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,1243	0,0799	0,0345	0,0919	0,0367	0,0813	0,0735	1,0000
Nombre de variants trouvés par smCounter	5	3	2	1	3	2	4	0
% de couverture à 200X	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	73%

Run 5 : FFPE	101	104	105	106	107	108	109	110	301	302	304	305	307	308	309
% dans le RUN (normalisation)	4,2253	1,932	5,3025	12,1697	7,8203	4,6763	6,4174	2,928	7,2728	10,6636	8,0158	3,6778	5,5437	3,9733	2,436
Nombre de lectures totales	536 860	245 482	673 734	1 546 277	993 642	594 169	815 391	372 254	924 078	1 354 915	1 018 488	467 295	704 376	504 842	309 523
Nombre de lectures filtrées	312738 (83,32%)	185405 (85,06%)	545026 (88,26%)	1257253 (88,07%)	691824 (82,85%)	474644 (86,29%)	621683 (84,70%)	283374 (84,98%)	707018 (83,36%)	1045824 (85,25%)	731555 (81,91%)	366416 (85,64%)	508522 (84,14%)	397961 (85,37%)	243425 (85,58%)
Profondeur moyenne de lecture	1 141,09	951,91	2 920,13	6 938,91	3 310,28	2 603,59	3 277,59	1 363,09	3 957,10	5 735,43	3 590,59	2 035,81	2 365,67	2 272,07	1 373,18
Nombre de codes bares moléculaires integrés	57 108	24 640	177 890	267 701	113 146	198 253	56 885	87 509	63 562	15 556	15 752	46 600	90 693	75 397	77 226
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	5,5	7,5	3,1	4,7	6,1	2,4	10,9	3,2	11,1	67,2	46,4	7,9	5,6	5,3	3,2
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	89,17	54,07	471,48	702,92	229,82	583,65	143,00	199,12	174,57	41,05	31,43	122,09	179,63	205,48	228,14
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,4606	0,4191	0,0630	0,0486	0,1920	0,0490	0,1485	0,1675	0,1194	0,4010	0,6965	0,2049	0,2305	0,1179	0,1010
Nombre de variants trouvés par smCounter	158	20	281	1 399	274	77	123	69	18	3	12	19	20	28	6
Nombre de variants retenus comme pathogène	1	1	1	2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
% de couverture à 200X	16%	33%	95%	98%	62%	95%	95%	43%	96%	97%	72%	77%	49%	87%	74%

Run 6 : FFPE ADN repair et FFPE	105R	106R	107R	110R	306R	306	308R	309R	310R	310
% dans le RUN (normalisation)	7,6391	6,5099	6,2734	10,2527	14,1698	4,5409	4,5774	4,3882	7,0898	8,5346
Nombre de lectures totales	1 484 082	1 264 707	1 218 753	1 991 844	2 752 831	882 188	889 266	852 507	1 377 373	1 658 056
Nombre de lectures filtrées	423579 (28,5%)	228072 (18%)	514193 (42,2%)	692349 (34,75%)	1167686 (42,4%)	361394 (41%)	513504 (57,7%)	472088 (55,4%)	490151 (35,6%)	886932 (53,5%)
Profondeur moyenne de lecture	1 887,34	963,92	1 784,19	2 779,35	5 264,48	1 675,91	2 375,31	2 227,34	2 193,68	4 391,70
Nombre de codes bares moléculaires integrés	11 043	1 762	2 130	4 255	3 369	13 881	3 253	11 375	4 069	7 084
Nombre moyen de read par UMI (2-5)	38,4	129,4	241,4	162,7	346,6	26,0	157,9	41,5	120,5	125,2
Nombre moyen d'umi associé à chaque base	24,35	3,66	4,82	8,84	8,19	29,09	8,23	28,92	9,71	16,56
Estimation au 90e percentile de la fraction allèlique minimale détectable	0,7486	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6502	1,0000	0,6091	1,0000	0,8712
Nombre de variants trouvés par smCounter	4	0	0	3	2	5	1	3	2	3
Nombre de variants retenus comme pathogène	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
% de couverture à 200X	52%	15%	10%	39%	76%	60%	60%	66%	74%	87%

Sensibilité de détection des variants estimée avec différents nombres de code-barres moléculaires à différentes profondeurs de lecture selon Qiagen.

Allele frequency	Mean UMI	1.1 read pairs/UMI	2.0 read pairs/UMI	4.0 read pairs/UMI	8.6 read pairs/UMI
5%	589	0.618	0.944	0.935	0.949
5%	1178	0.855	0.963	0.960	0.965
5%	2355	0.946	0.966	0.962	0.965
5%	3533	0.952	0.965	0.966	0.967
1%	722	0.318	0.565	0.619	0.628
1%	1445	0.498	0.812	0.848	0.848
1%	2167	0.668	0.852	0.906	0.915
1%	3612	0.843	0.928	0.933	0.933

1 read pairs équivaut à une profondeur de 2 x.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*

- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*

- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*

- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.