



HAL
open science

Corrélation génotype-phénotype sur une série de 83 méningiomes : intérêt clinique ?

Florent Darriet-Giudicelli

► **To cite this version:**

Florent Darriet-Giudicelli. Corrélation génotype-phénotype sur une série de 83 méningiomes : intérêt clinique ?. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02933362

HAL Id: dumas-02933362

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02933362>

Submitted on 8 Sep 2020

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 14 mai 2020

Par M. DARRIET-GIUDICELLI Florent
Né le 16/06/1983

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 : CORRELATION GENOTYPE-PHENOTYPE SUR UNE SERIE DE 83
MENINGIOMES : INTERET CLINIQUE ?**

---oOo---

JURY :

Président : Mme le Professeur BADENS Catherine

Membres : Mme le Professeur BARLIER Anne (Directrice de Thèse)

Mme le Professeur FIGARELLA-BRANGER Dominique

M le Docteur GRAILLON Thomas

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, 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
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

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.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

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-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

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 Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
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	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	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

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
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-LEDDER 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. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO,
Pharmacien-Praticien hospitalier Mme

Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien
Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET,
Pharmacien titulaire

Mme Florence
LEANDRO, Pharmacien
adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM
de l'Assurance Maladie Mme Clémence TABELLE,
Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

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, ma directrice de thèse, je vous remercie pour la grande qualité de votre encadrement. Vous avez su allier la pertinence scientifique des propos avec une disponibilité et une amabilité constantes.

A Madame le Professeur Dominique FIGARELLA-BRANGER, vous qui me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

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 vous donnera entière satisfaction.

Je remercie également l'ensemble du laboratoire de Biologie Moléculaire de la Conception pour leur aide et leur accueil dans le service.

-Un grand merci à Cathy, qui m'a appris à faire de la biologie moléculaire. Tu as passé de nombreuses heures à la paillasse à me former à des techniques complexes, merci pour ta patience et tes lumières.

-Arnaud tu m'as également donné de bons conseils lorsque j'étais un peu perdu à la paillasse, sois-en remercié.

-Amira, je te suis très reconnaissant, de m'avoir aidé à comprendre la partie informatique de mon travail et à la structurer pour ma thèse.

-Je salue également Pauline, Alexandru et Morgane qui ont contribué à m'expliquer les tenants et aboutissants de la génétique moléculaire, dans une ambiance sereine et détendue. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

-Merci à l'ensemble des techniciens et secrétaires pour leur disponibilité et leur aide.

Théo mon ami et ancien co-interne merci de l'aide pour la récupération des données cliniques et bonne chance à toi pour la suite.

Je remercie mes parents pour leur soutien, ma famille.

Samantha, ma future épouse, merci pour ta présence de tous les instants et ton affection.

Enfin je terminerai en remerciant les Professeurs Jean COSTA et Alain MUSELLI de l'Université de Corse Pascal Paoli, qui, il y a maintenant une dizaine d'année, furent les directeurs de ma thèse de Sciences en chimie. Par la qualité de leur encadrement, ils contribuèrent à forger mon esprit scientifique et à me donner une capacité de travail, sans laquelle je n'aurais pas le cursus que j'ai aujourd'hui.

« 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. »

Table des matières

<i>Introduction et objectifs</i>	1
<i>Première partie : étude bibliographique et méthodologie d'analyse</i>	3
I- Les méningiomes : description et prise en charge	3
1) Origine.....	3
2) Localisation	4
3) Classification histologique	5
4) Epidémiologie	8
5) Symptomatologie.....	10
6) Diagnostic.....	11
7) Traitements.....	13
II-Anomalies génétiques des méningiomes	17
1) Cas particuliers : pathologies familiales et mutations constitutionnelles	17
2) Anomalies chromosomiques	18
3) <i>NF2</i> et la protéine merlin.....	19
4) <i>TRAF7</i> , <i>KLF4</i> et gènes de la voie PI3K/AKT/mTOR : <i>AKT1</i> , <i>PIK3CA</i> et <i>PTEN</i>	20
5) Les gènes de la voie de signalisation hedgehog : <i>SMO</i> , <i>SUFU</i> et <i>PTCH1</i>	23
6) Gènes impliqués dans la progression tumorale	25
7) Autres anomalies du génome	26
8) Anomalies épigénétiques.....	27
III-Matériel et méthode	27
1) Matériel	28
2) Méthode.....	29
a) Choix du panel de gènes.....	29
b) Préparation de l'ADN : extraction, quantification et qualification de l'ADN	30
c) Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs par NGS.....	30
d) Outils bio-informatiques	35
e) Technique d'analyse du nombre de copies du gène <i>NF2</i> par PCR en temps réel.	36
f) Corrélation génotype-phénotype : outils statistiques.....	37
<i>Deuxième partie : résultats de la cohorte et comparaison avec les travaux des pairs</i>	38
I-Résultats des analyses génétiques de la cohorte	38
1) Validation technique des séquençages haut-débit	38

2) Présentation de la cohorte de patients	40
3) Présentation des anomalies génétiques retrouvées dans la cohorte	46
II-Corrélation génotype-phénotype	49
III-Comparaison avec les travaux des pairs	52
1) Répartition des mutations et corrélation avec la nature des patients	53
2) Corrélations mutations / grade, récurrence et pronostic	54
3) Corrélations mutations / type histologique et localisation.....	57
IV-Vers d'autres horizons en génétique moléculaire	58
1) Recherche de nouvelles mutations impliquant de nouveaux gènes.....	58
2) Le méthylome.....	59
3) La biopsie liquide	61
<i>Conclusion et perspectives</i>	<i>63</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>65</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>74</i>

Introduction et objectifs

Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes issues du feuillet arachnoïdien des méninges. Ils touchent environ 4000 patients en France et près d'un demi-million d'individus de par le monde. Ils sont probablement la cause la plus répandue de tumeurs cérébrales. Les méningiomes sont généralement traités par chirurgie et classiquement considérés comme bénins et de bon pronostic. Cependant, environ 8 % de ces méningiomes sont agressifs et récidivants. Cela implique souvent de nouvelles chirurgies ainsi qu'une radiothérapie adjuvante. L'impact sur la morbidité et la mortalité est souvent important avec des séquelles post-opératoires fréquentes et un taux de survie à 10 ans inférieur à 50 %, voire à 10 % pour les types histologiques les plus nocifs.

Pour ces tumeurs au pronostic péjoratif, les ressources thérapeutiques sont modestes, d'autant plus qu'il n'y a pour l'instant aucune ligne de chimiothérapie faisant consensus. Néanmoins, avec l'identification à l'aide de l'outil génétique de nouvelles voies de signalisation cellulaire, plusieurs cibles potentielles pour de futurs traitements médicamenteux semblent se dévoiler.

Notre unité de recherche l'UMR 1251 MMG, étudie depuis quelques années les méningiomes. Nos investigations sur ces tumeurs couvrent un champ assez large, abordant tout à la fois la connaissance de la génomique et des voies de signalisation, les études de modèles in-vitro et les essais cliniques. Les objectifs sont doubles : ils visent tout aussi bien à accroître notre connaissance fondamentale des méningiomes, qu'à proposer des solutions viables aux cliniciens pour la prise en charge des patients. En effet l'idéal à moyen terme serait d'être en mesure de fournir aux cliniciens, via le génotypage des méningiomes, une information prompte à répondre aux problématiques suivantes : quel traitement utiliser selon les gènes affectés ? Quel est le pronostic ? Quelles modalités de surveillance appliquer ?

Au sein des travaux réalisés récemment dans notre laboratoire, le Docteur Basset au cours de sa thèse a contribué à mettre au point une méthode viable de séquençage haut débit par NGS, en vue d'étudier le profil mutationnel des méningiomes humains. Ce travail a été effectué sur 38 tumeurs, opérées dans le service du Professeur Dufour à l'AP-HM. A l'issue de ces investigations, la mise au point de la méthode de séquençage a été jugée satisfaisante,

mais la taille insuffisante de la cohorte, n'a pas permis de tirer d'autres conclusions que celles purement liées à la représentation génétique de la pathologie.

Afin d'atteindre les objectifs théoriques et pratiques évoqués supra, nous avons décidé de (i) séquencer 45 nouveaux méningiomes ; (ii) compiler les données génétiques et cliniques ainsi obtenues, avec les données de la thèse du Docteur Basset ; (iii) examiner les corrélations statistiques génotype-phénotype de cette nouvelle cohorte de 83 tumeurs et d'en tirer les conclusions qui s'imposent. Ce sont ces nouveaux travaux de recherche qui sont présentés au sein de cette thèse d'exercice en pharmacie réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Professeur Barlier. Nous espérons au décours de cet ouvrage, démontrer l'intérêt clinique que le clinicien peut tirer du génotypage des méningiomes et secondairement parfaire notre connaissance du paysage mutationnel de ces tumeurs.

Cet ouvrage comporte 2 parties présentant l'état bibliographique de la question, la méthodologie, les résultats d'analyses et les discussions.

La **première partie** propose un état des lieux des connaissances et de la prise en charge des méningiomes humains, suivie d'une revue du profil mutationnel de ces tumeurs selon la littérature. Enfin, nous y présentons les matériels et méthodes mis en œuvre durant nos travaux.

La **seconde partie** expose tout d'abord les résultats bruts de nos travaux, suivie des résultats statistiques que nous avons établis entre le phénotype des patients et le génotype de leurs tumeurs. Ensuite, nous confrontons nos conclusions statistiques aux données de la littérature, puis nous terminons cette partie de l'ouvrage en abordant les différentes investigations génétiques envisageables pour le futur.

Suite à la conclusion de l'ouvrage, sont donnés en annexe un certain nombre d'éléments intéressants mais qui, à notre sens, auraient rendu la lecture moins aisée s'ils avaient été insérés dans le manuscrit.

Première partie : étude bibliographique et méthodologie d'analyse

I- Les méningiomes : description et prise en charge

Le Docteur Harvey Cushing fut le premier praticien à employer le terme méningiome en 1922. Cependant la chirurgie et la description de tumeurs pouvant être assimilées à des méningiomes est plus ancienne. Les premiers cas décrits d'excroissance de l'arachnoïde, matrice d'origine de la tumeur, remontent au dix-huitième siècle. Le Docteur Cushing lui-même commença à opérer ce type de tumeurs dès 1908, et obtint en 1910 un de ces succès les plus célèbres avec la rémission du chef d'état-major de l'armée américaine le général Wood.

Les tumeurs cérébrales sont des pathologies relativement rares, cependant les méningiomes, représentent actuellement les tumeurs cérébrales les plus répandues. Leur classification a été révisée en 2016 et les traitements toujours centrés sur la chirurgie, permettent régulièrement une guérison ou, à tout le moins, une rémission.

1) Origine

L'arachnoïde est un feuillet leptoméningé délicat, avasculaire et non innervé compris entre la dure-mère et la pie-mère. Elle tapisse la face interne de la dure-mère y compris au niveau de ses expansions. Elle est formée de cellules arachnoïdiennes, de fibres collagènes et de fibres élastiques. Les méningiomes ont pour matrice d'origine les cellules arachnoïdiennes. Ces cellules forment des lamelles de cellules épithélioïdes aplaties qui sont en fait des fibroblastes modifiés¹. Les méningiomes se développent principalement aux dépens 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 crâne).

Ces tumeurs se présentent la plupart du temps sous la forme dite "en masse", plus ou moins arrondie, parfois polylobée, dont la forme est sous la dépendance des structures de voisinage, en général bien limitée. Plus rarement le méningiome peut se présenter sous la forme "en plaque", qui est un épaissement tumoral de la méninge entraînant une réaction osseuse de voisinage. Quelques formes kystiques ont été décrites².

Les méningiomes sont généralement uniques, les cas de méningiomes multiples sont souvent liés à des cas de méningiomatose familiale. La taille des méningiomes est très variable : de quelques millimètres de diamètre pour certains méningiomes très vite symptomatiques et rapidement diagnostiqués, à plusieurs centimètres de diamètre pour certains méningiomes frontaux longtemps asymptomatiques. Certaines observations font état d'une croissance de 2 à 4 mm par an pour les méningiomes les moins agressifs³.

Les méningiomes peuvent présenter 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 souvent les manifestations cliniques (déficits neurologiques focaux) mais ne modifie pas le pronostic.

Ce sont des tumeurs fréquemment calcifiées car capables, quel que soit leur grade, de provoquer une réaction osseuse au niveau de leur base d'implantation, particulièrement les méningiomes en « plaques ». Généralement il s'agit d'un épaissement de l'os en regard de la tumeur, par un processus hyperostéotique, allant parfois jusqu'à former un véritable ostéome.

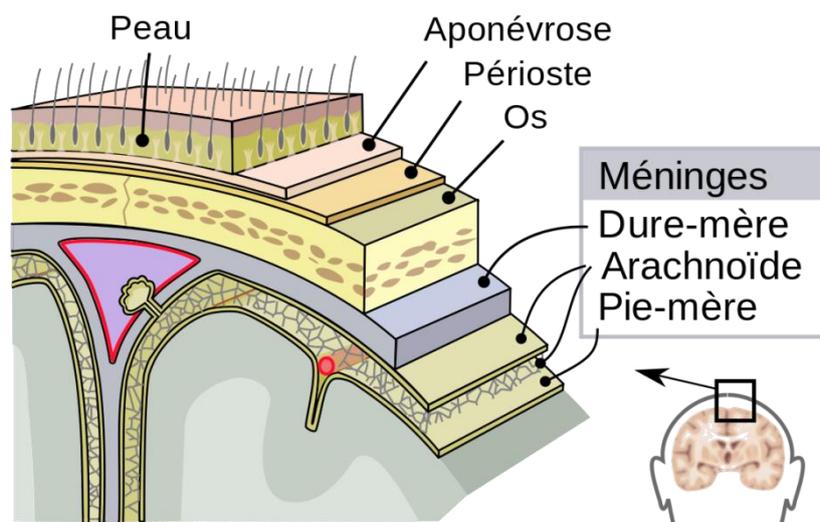


Figure 1 : coupe frontale du crâne montrant les méninges.

2) Localisation

Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes dans 90% des cas, pouvant se développer à partir de n'importe quelle structure sous arachnoïdienne. On distingue ainsi par une subdivision anatomique à 6 emplacements les méningiomes (Cf **figure 2**) :

-De la convexité hémisphérique

- De la base du crâne
- Parasagittaux
- De la faux du cerveau
- De la fosse cérébrale postérieure
- Intraventriculaires

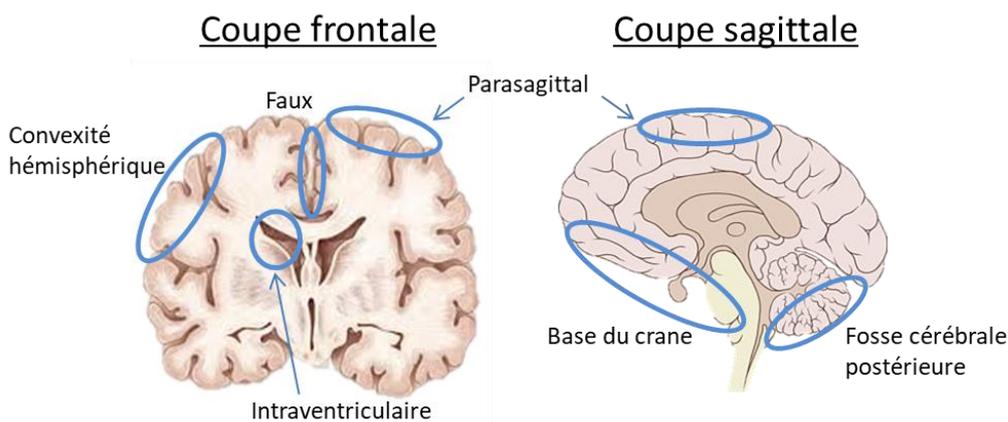


Figure 2 : coupe frontale et sagittale du cerveau et territoires anatomiques des méningiomes.

Ces localisations sont affinées dans leur dénomination par la structure anatomique la plus proche (par exemple sinus caverneux, suprasellaire...)².

Les tumeurs se développent le plus fréquemment au niveau de la convexité hémisphérique (35 %), de la base du crâne (30 %), des sinus parasagittaux et de la faux (25 %)⁴. Les localisations intraventriculaires sont exceptionnelles.

Les méningiomes extracrâniens situés au niveau du canal rachidien ne représentent que 5 à 10 % des cas de méningiomes. Ces tumeurs s'observent dans 90 à 95 %⁵ des cas chez la femme de plus de 40 ans avec une localisation thoracique dans 70 % des cas, cervicale dans 25 % des cas, lombaire dans 5 % des cas et exceptionnellement lombo-sacrée. Notons par ailleurs que les méningiomes représentent 30 % des tumeurs intra-canales.

3) Classification histologique

La classification histologique des méningiomes s'appuie sur la classification des tumeurs du système nerveux central de l'organisation mondiale de la santé (OMS) remaniée en 2016⁶. Les bases histologiques de cette classification reposent sur des critères reconnus

d'agressivité tels que : l'envahissement des tissus adjacents, la présence de nécrose, une activité mitotique importante, une forte densité cellulaire de la population tumorale, des structures architecturales reconnues comme atypiques pour le tissu étudié (cellule claire, éosinophile, en nappe,...) et enfin des anomalies cytologiques (rapport nucléo-cytoplasmique élevé, nucléoles proéminents,...).

Sur ces bases histologiques les méningiomes sont classés en trois grades, chaque grade étant corrélé à une probabilité de croissance, de dissémination métastatique et de récurrence allant crescendo. Le pronostic est d'autant moins favorable que le grade est élevé. Au sein de chaque grade tumoral, plusieurs types histologiques sont recensés et possèdent des caractères cytologiques spécifiques.

- Grade I

Ces tumeurs sont les plus fréquentes et confèrent au méningiome sa réputation relativement bénigne. Le nombre de mitose, moins de 4 mitoses pour 10 champs est systématiquement faible. Neuf types architecturaux sont définis dans ce groupe. Les plus fréquents sont les méningiomes méningothéliaux, fibroblastiques et transitionnels.

- Méningiome méningothélial : ils sont constitués de plages de cellules méningothéliales. La présence fréquente de cellules pléomorphiques avec un noyau unique géant ou multiple ne sous-tend pas nécessairement une 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 semblables aux fibroblastes. Le mésenchyme est souvent riche en collagène et réticuline.

- Méningiome transitionnel : ce type de tumeurs a un profil histologique présentant une association des caractères des méningiomes méningothéliaux et fibroblastiques.

- Méningiome psammomateux : la richesse en corps psammeux caractérise ces tumeurs. Le stroma peut contenir une substance amyloïde.

- Méningiome angiomateux : ils sont formés de plages méningiomateuses entre lesquelles on trouve de très nombreux vaisseaux.

- Méningiome microkystique : les comptes rendus d'exérèse chirurgicale décrivent fréquemment une surface luisante pour ce type de tumeur. Des formations kystiques peuvent être retrouvées. Le cytoplasme est éosinophile, vacuolisé. Les cellules tumorales sont étoilées

avec de longs filaments délimitant des espaces clairs et formant des microkystes intercellulaires.

- Méningiome sécrétant : cette forme est rare, caractérisée par une différenciation pseudo épithéliale avec des cellules contenant du matériel sécrétoire éosinophile, au sein d'un méningiome de type méningothélial ou transitionnel.
- Méningiome riche en lymphoplasmocytes : ce sont des tumeurs proches des méningiomes méningothéliaux, fibroblastiques ou transitionnels avec en sus la présence de lymphocytes et de cellules plasmocytaires.
- Méningiomes métaplasiques : il s'agit d'un des types histologiques de méningiomes de type I associés à des transformations métaplasiques (cartilage, os, lobules adipeux).

- Grade II

Cette catégorie de grade tumoral regroupe trois types architecturaux. Elle est la seule à avoir été remaniée lors de la nouvelle classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Il a été admis que les tumeurs envahissant les tissus adjacents peuvent être directement classées en grade II⁷.

- Méningiome atypique : ces tumeurs dérivent des types architecturaux décrits ci-dessus. Mais en plus et ce quel que soit leur type histologique, un méningiome est dit atypique si on retrouve une invasion du parenchyme cérébral ou, entre 4 et 19 mitoses pour 10 champs ou 3 des 5 critères suivants : cellularité augmentée, nucléoles proéminents, nécrose, perte de l'organisation de l'architecture tissulaire et rapport nucléo cytoplasmique élevé.
- Méningiome à cellules claires : ces tumeurs sont constituées par des empilements de cellules polygonales au cytoplasme optiquement vide. Le cytoplasme très clair des cellules est lié à une accumulation de glycogène.
- Méningiome chordoïde : ces méningiomes renferment des foyers d'aspect histologique similaire à ceux d'un chordome (tumeur osseuse). 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.

- Grade III

Ce grade est rare et peut apparaître de novo ou lors d'une récurrence. Cette catégorie de grade tumoral regroupe trois types architecturaux.

- Méningiome anaplasique : il s'agit de tumeurs malignes ayant une anaplasie cellulaire marquée. Les critères d'inclusion de l'OMS sont des caractéristiques histologiques malignes avec des caractères similaires aux sarcomes, carcinomes, ou mélanomes ou au moins 20 mitoses pour 10 champs.

- Méningiome papillaire : l'aspect clonal de cellules méningothéliales pourvues d'un noyau plus rond et uniforme avec une disposition péri vasculaire, pseudo-papillaire ou en rosettes, est caractéristique.

- Méningiome rhabdoïde : les cellules ont un volumineux noyau excentré avec un nucléole proéminent et un cytoplasme éosinophile abondant. Le méningiome rhabdoïde est rarissime.

Quelques auteurs font une critique modérée de ce système de classification. Ils déplorent le fait que le marqueur Ki-67 ne soit pas pris en compte dans cette classification⁸. Ils critiquent également la classification des méningiomes papillaires qui semblent moins agressifs que leur grade le laisse entendre⁹.

4) Epidémiologie

- Généralités

Les connaissances épidémiologiques concernant les méningiomes se sont enrichies ces dernières années avec des données statistiques récentes concernant plusieurs pays dont la France, l'Angleterre et les États-Unis.

On estime l'incidence moyenne annuelle de l'ensemble des méningiomes à environ 6/100 000 habitants (1,28-7,80/100 000 pour les méningiomes intracrâniens). Ils représentent environ 30% des tumeurs intracrâniennes primitives.

S'agissant de la France, 25737 méningiomes ont été opérés sur le territoire entre 2008 et 2016 avec une incidence de 4,51 méningiomes opérés pour 100 000 habitants¹⁰. Les méningiomes de grade I représentaient 91,3 % des méningiomes, ceux de grade II 6,2 % et ceux de grade III 2,5 %. In fine les données françaises sont du même ordre que les données mondiales. Toutes les statistiques font état d'une augmentation sensible de la prévalence de la

maladie. Cette hausse serait surtout liée à l'augmentation de la durée de vie et à l'amélioration des moyens diagnostiques.

- Facteurs de risques

Le plus ancien facteur de risque connu faisant l'unanimité est le sexe avec environ 75 % de femmes pour 25 % d'hommes atteints de la pathologie. Cette différence s'estompe dès lors que le grade tumoral augmente. L'âge est également un facteur de risque avec un pic d'incidence entre 60 et 80 ans (Cf **figure3**). Enfin, concernant les facteurs intrinsèques, de récentes publications américaines font état de disparités raciales entre les populations blanches, noires et hispaniques, impliquant la variabilité génétique inter-ethnique¹¹.

Concernant les facteurs extrinsèques, la prise d'hormone analogue à la progestérone et les rayonnements ionisants même faibles, sont des facteurs de risque connus¹². Les traumatismes crâniens impliquant un remodelage des méninges ne semblent pas modifier le risque contrairement à ce que Cushing avait pressenti. Enfin les maladies auto-immunes semblent être un facteur protecteur.

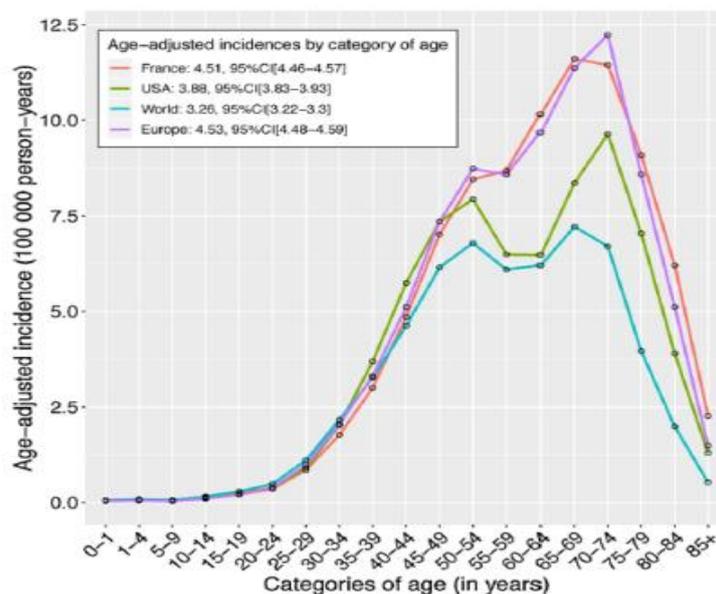


Figure 3 : incidence des méningiomes selon l'âge et le pays¹⁰.

- Récidives

Les méningiomes selon leur nature et la qualité de l'exérèse chirurgicale peuvent récidiver. Un méningiome récidivera généralement avec le même grade tumoral, bien qu'une

progression vers un grade tumoral supérieur soit possible. Si les récurrences doivent se répéter elles seront de plus en plus rapprochées.

Le taux est variable selon l'étude, pour les méningiomes de grade I, à 10 ans, le taux de récurrence après résection totale est de 15 à 20 %. Pour les méningiomes de grade II et III, à 5 ans, le taux de récurrence est respectivement de 50 % et de 90 %¹³.

- Mortalité

Parmi les principaux facteurs influençant la mortalité nous citerons l'âge, le grade du méningiome, l'exérèse chirurgicale incomplète et paradoxalement le sexe masculin comme facteur péjoratif¹⁴. Le taux de survie à 10 ans est de 80 % pour les méningiomes de grade I, 50 % pour le grade II et varie de 0 à 10 % pour le grade III selon l'étude (Cf **figure 4**)⁵.

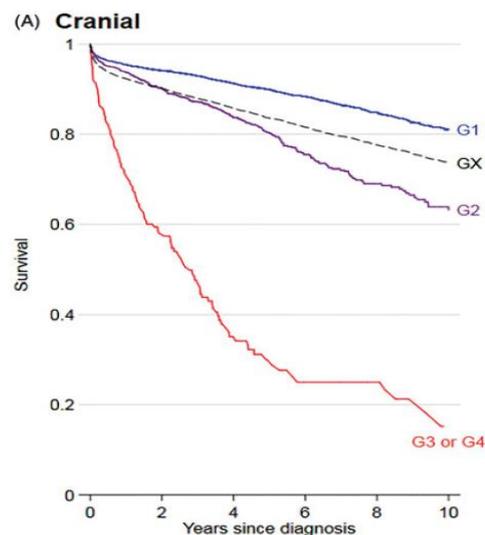


Figure 4 : courbe de Kaplan-Meier selon le grade des méningiomes crâniens en Angleterre⁵.

5) Symptomatologie

Les signes cliniques engendrés par les méningiomes comme par la plupart des tumeurs crâniennes dépendent essentiellement de leur localisation et de l'effet de masse provoqué par la tumeur à partir d'une certaine taille. De ce fait ils peuvent rester longtemps asymptomatiques et être découverts fortuitement au décours d'un examen radiologique de routine, donner des signes très discrets et une sémiologie trompeuse, ou bien avoir assez rapidement une clinique bruyante. Les symptômes les plus fréquents sont¹⁵ :

- Céphalée (35 %)

- Déficit neurologique focal (30 %)
- Epilepsie (15 %)
- Trouble de la concentration (15 %)
- Trouble de la personnalité (10 %)
- Vertiges (10%)
- Plus rarement apparaissent des troubles ataxiques, douleurs diffuses et syncopes.

Enfin notons qu'il existe des cas rares de métastase dans environ 0,1 % des méningiomes¹⁶. Le risque de métastase croît avec le grade du méningiome. Le poumon est la localisation préférentielle des métastases (60 %) suivi du foie, des ganglions lymphatiques, des os et de la peau.

6) Diagnostic

L'imagerie permet d'objectiver la présence du méningiome, l'histologie et le Ki-67 permettent d'en déterminer la nature et l'agressivité¹⁷. Ces dernières années, des approches alternatives par Maldi-tof ou par spectroscopie infrarouge¹⁸ ont été tentées avec un certain succès sur des biopsies, afin de déterminer le grade OMS.

- Imagerie

Devant le nombre non négligeable de méningiomes asymptomatiques, les découvertes fortuites par IRM ou tomodensitométrie sont assez fréquentes. En cas de sémiologie fonctionnelle imposant une imagerie cérébrale, le diagnostic repose sur la présence de données d'imagerie avec et sans injection de produit de contraste. Les méningiomes apparaissent comme des tumeurs rondes, isolées, étroitement liées à la dure-mère avec un renforcement après injection de produit de contraste. L'imagerie n'est pas en mesure de déterminer le grade tumoral et le type histologique. L'IRM est l'examen de première intention, permettant de localiser l'expansion tumorale (sus-tentorial, sous-tentorial, intra- ou extra-parenchymateux, uni- ou multifocal), de préciser ses caractéristiques (présence d'œdème péri-lésionnel, de calcifications ou de nécrose), de diagnostiquer certaines complications évolutives de la tumeur (hémorragie, hydrocéphalie), d'orienter la suite de la stratégie diagnostique (biopsie, exérèse), ou le cas échéant de préciser le diagnostic

différentiel¹⁹. La tomodensitométrie est indiquée en cas de contre-indication à l'IRM et elle permet une analyse plus précise des anomalies osseuses et des calcifications intra tumorales.

- Marqueurs histologiques et biologiques

Les marqueurs histologiques n'ont pas leur place dans la classification OMS, que ce soit pour le diagnostic ou le pronostic, à l'exception du marqueur Ki-67 qui conserve une place importante dans l'appréciation de l'agressivité de la tumeur. 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 d'apprécier le taux de prolifération des cellules tumorales. L'index Ki-67 est déterminé 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 exprimé en pourcentage est un marqueur supplémentaire d'activité donnant une vue d'ensemble du processus néoplasique. Des taux plus élevés tendent à être corrélés à un grade tumoral plus élevé, à une extension plus grande et à un risque de récurrence accru. Des valeurs moyennes de Ki-67 selon les grades de la tumeur ont été définies. Les valeurs moyennes estimées sont de 3,8 % pour les méningiomes de grade I, de 7,2 % pour les méningiomes de grade II et de 14,7 % pour les méningiomes de grade III^{20,21}. La majorité des méningiomes fixe également les anticorps anti-EMA (Antigène Epithélial Membranaire) avec perte d'expression pour les grades plus élevés.

Plusieurs récepteurs peuvent être exprimés dans les méningiomes. Le plus connu est le récepteur à la progestérone présent dans 70 % des méningiomes, il tendrait à expliquer la prévalence 3 fois supérieure de la maladie chez la femme. Des récepteurs aux œstrogènes, androgènes et somatostatine²² sont aussi souvent retrouvés. Bien que non utilisés en routine, ces derniers représentent de potentielles cibles pour les traitements. Certaines équipes explorent également la possibilité d'un immuno-marquage fluorescent des tumeurs exprimant ces récepteurs afin de guider l'acte chirurgical²³.

Plus rarement les facteurs de croissance et leurs récepteurs VEGF, PDGF, EGF, VGF peuvent être exprimés. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) et ses récepteurs participent à la formation des œdèmes péri-tumoraux²⁴.

Parmi les marqueurs biologiques non spécifiques inconstamment augmentés en cas de méningiomes on peut citer : le marqueur ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) pour les méningiomes sécrétant et la phosphatase alcaline pour les méningiomes de grade II et III.

Leur consultation peut fournir une aide à la décision aux anatomo-pathologistes en cas de pièce opératoire difficile à classer au sein des grades OMS.

7) Traitements

Actuellement la chirurgie reste la pierre angulaire du traitement des méningiomes. Selon les cas, la radiothérapie et la radiochirurgie sont également indiquées. En revanche, les chimiothérapies classiques ou ciblées n'ont pas encore leur place dans les protocoles de routine.

- Chirurgie

Cet acte neurochirurgical reste le traitement curatif par excellence des méningiomes. Il peut être extrêmement délicat à réaliser, l'exérèse peut être pour tout ou partie limitée par des paramètres tels que : la taille de la tumeur, sa localisation (la base du crâne est plus difficile d'accès), l'adhésion à des structures vitales (englobement d'artères majeures et de nerfs crâniens), ou l'invasion extensive des structures adjacentes (envahissement osseux, du sinus veineux,...)²⁵.

Le neurochirurgien va évaluer la qualité de l'exérèse chirurgicale de la tumeur à l'aide de la classification de SIMPSON (SIMPSON, 1957) selon 5 grades qui conditionnent la prise en charge et le pronostic²⁶ :

- Grade I : exérèse macroscopiquement complète avec dégagement de l'attache durale, des sinus et de l'envahissement osseux éventuel (9 % de rechute à 10 ans en moyenne).
- Grade II : exérèse macroscopiquement complète avec coagulation de l'insertion durale (19 % de rechute à 10 ans en moyenne).
- Grade III : exérèse macroscopiquement complète sans coagulation de l'insertion durale et sans résection de l'envahissement osseux éventuel (29 % de rechute à 10 ans en moyenne).
- Grade IV : exérèse incomplète (40 % de rechute à 10 ans en moyenne).
- Grade V : biopsie.

Le degré de résection sera confirmé par IRM, les grades de résection I-III correspondant à une résection jugée complète.

Les chirurgies de méningiomes impliquent des risques importants (épilepsie, ischémie, œdème,...) avec une hausse manifeste de la morbidité. Les formes récidivantes avec des zones adhérentes et remaniées sont complexes à opérer. Le temps entre chaque rechute à tendance à diminuer entre chaque nouvelle chirurgie ce qui, dans le cas des rechutes multiples, impose une évaluation fine du rapport bénéfice risque entre chaque opération²⁷.

- Radiochirurgie

La radiochirurgie, ou radiothérapie stéréotaxique est une technique de radiothérapie non invasive. Elle nécessite une contention (un cadre de stéréotaxie implanté dans la table externe osseuse du crâne ou un masque thermoformé repositionnable), un système d'imagerie médicale (IRM ou tomodensitométrie) pour extraire la position en trois dimensions dans l'espace et un système d'irradiation spécifique (soit un Gammaknife® avec sources de Cobalt, soit un Novalis® accélérateur de photons).

L'irradiation est réalisée en une séance unique le plus souvent. C'est une technique de très haute précision grâce à l'acquisition de la position tridimensionnelle de la tumeur, qui permet de diminuer les marges d'incertitude et de limiter le volume sain irradié. La concentration d'un faisceau très énergétique en un point précis d'un volume permet d'aboutir à une nécrose des cellules tumorales ciblées.

La radiochirurgie est une option thérapeutique pour les petites tumeurs ou résidu de tumeur (moins de 3 cm généralement) aux contours bien définis, située dans des zones difficiles d'accès en chirurgie classique²⁸.

- Radiothérapie

Il s'agit d'une méthode d'irradiation externe, les rayons sont produits par un accélérateur linéaire de particules. La dose totale d'irradiation est délivrée en plusieurs fractions sur plusieurs jours. Les doses fractionnées vont permettre entre les séances, un processus de réparation cellulaire, pour le tissu sain. Cette méthode utilise la capture par IRM des zones à irradier. Des logiciels permettent ensuite de simuler, en 3D, la forme des faisceaux d'irradiation et la distribution des doses de rayons. La radiothérapie est indiquée pour les méningiomes malins mal délimités, avec possible envahissement du parenchyme cérébral, ou en cas de récurrence pour un méningiome déjà traité par radiochirurgie²⁸.

- Chimiothérapies et thérapies ciblées

Actuellement, les traitements médicamenteux pour la prise en charge des méningiomes ne sont pas standardisés et sont vus comme un dernier recours en cas de tumeurs récurrentes ou inopérables, souvent dans le cadre d'essais thérapeutiques protocolaires. Ces essais sont nombreux, un aperçu en est donné dans le **tableau 1**²⁹.

La survie sans progression à 6 mois (PFS-6) est le marqueur de l'efficacité du traitement de référence pour les essais cliniques. Une PFS-6 supérieure à 40 % pour les tumeurs de grade I et supérieure à 30 % pour les grades II et III indique une efficacité du traitement. En 2020 malgré des essais thérapeutiques prometteurs, aucune ligne de traitement pharmacologique n'a pu émerger de la multitude d'essais en cours. Ce constat vient notamment de la faiblesse statistique de la plupart des études (nombre de patients limité, études rétrospectives, biais de sélection, ...).

Les agents classiques de chimiothérapies : interféron alpha, irinotécan, témozolomide, hydroxyurée,... sont jugés statistiquement inefficaces³⁰.

Les anti-angiogéniques (bevacizumab, sunitinib, vatalanib,...) ont des effets intéressants mais inconstants selon les études. Ils stoppent la progression tumorale et permettent la stabilisation des patients pendant plusieurs mois²⁶.

Les essais sur les agonistes de la somatostatine (octréotide, pasireotide³²,...) restent prometteurs mais non utilisés en routine. La mifepristone³³ est parfois utilisée.

Dans les méningiomes de haut-grade, l'observation d'une surexpression de PD-L1 et PD-1 qui sont des immunosuppresseurs de la réponse cytotoxique du système immunitaire, a amené au développement de drogues (nivolumab, pembrolizumab) ciblant ces récepteurs³⁴.

Terminons ce tour d'horizon des molécules en cours d'essai par les inhibiteurs des voies de signalisations intracellulaires, mis en évidence par les progrès du génotypage des méningiomes. Les cibles prioritaires sont celles de l'axe PI3K/AKT/mTOR³⁵ et également la voie sonic hedgehog. La tendance est également à l'utilisation de deux molécules simultanément, par exemple dans l'étude CEVOREM réalisée à Marseille : un inhibiteur de mTOR et un agoniste des récepteurs à la somatostatine l'octréotide³⁶.

Voie ciblée	Drogue	Phase de l'étude	Identifiant de l'étude
<i>SMO</i>	Vismodegib	II	NCT02523014
FAK	GSK2256098	II	NCT02523014
mTORC1/2	AZD2014	II	NCT02831257
mTOR	Everolimus	I	NCT01880749
Somatostatin + radionucléotide	90-YDOTA tyr3-Octreotide	II	NCT03273712
PD-1	Nivolumab	II	NCT02648997
PDL-1	Pembrolizumab	II	NCT03279692
PDL-1 + proton radiation	Avelumab	II	NCT03267836
MEK1/2	Selumetinib	II	NCT03095248
Histone Deacetylase	AR-42	I	NCT02282917
CDK4/6	Ribociclib	I	NCT02933736

Tableau 1 : exemple d'essai clinique récent pour la prise en charge des méningiomes.

- Recommandations pour le traitement et le suivi des méningiomes

Ces recommandations sont énoncées par l'Association Européenne de Neuro-Oncology (EANO). Les méningiomes asymptomatiques nécessitent une abstention thérapeutique avec une simple surveillance par imagerie médicale. Dès lors que le méningiome est symptomatique, la chirurgie doit être envisagée comme principal moyen de traitement. Elle peut être assortie selon le grade et la qualité de la résection de la masse tumorale, d'une radiothérapie ou d'une radiochirurgie. Chez les patients inopérables ou en mauvais état général, les traitements radio interventionnels seuls peuvent également être utilisés.

Le traitement pharmacologique expérimental dans le cadre d'un protocole intervient en dernier recours, chez les patients non opérables et contre indiqués pour les méthodes de radiochirurgie et radiothérapie. L'ensemble de la prise en charge des méningiomes symptomatiques est résumé dans la **figure 5**.

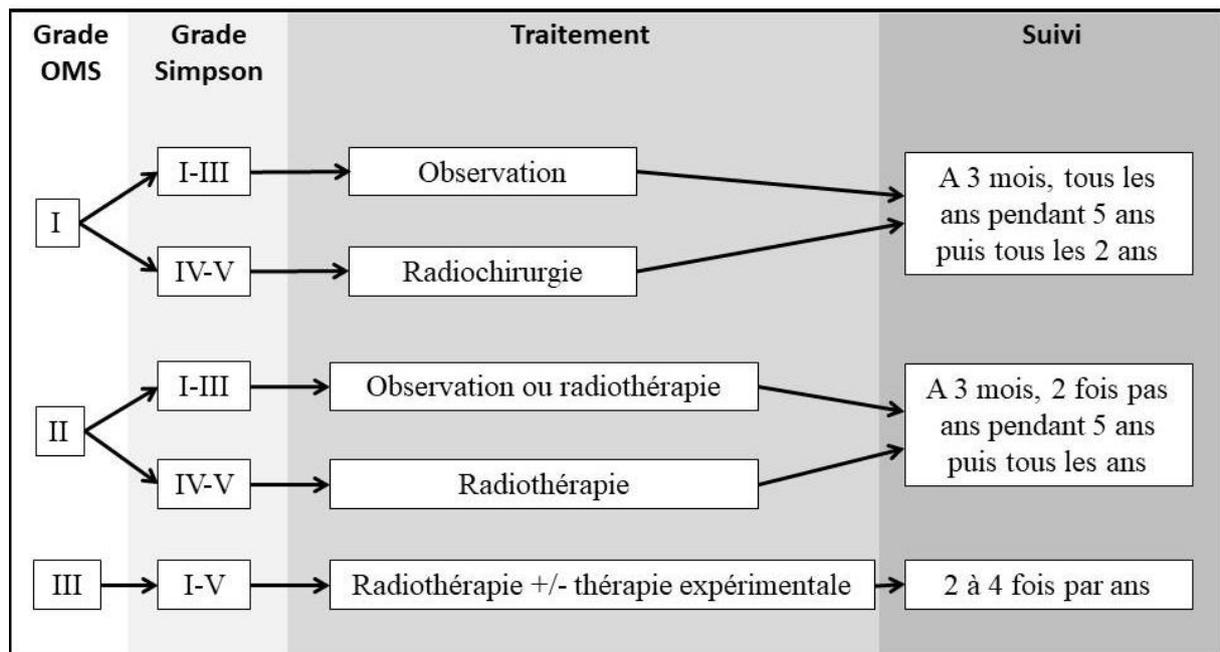


Figure 5 : prise en charge des méningiomes symptomatiques.

II-Anomalies génétiques des méningiomes

Les anomalies cytogénétiques principales des méningiomes ont été mises en évidence depuis les années 70. La recherche des mutations des méningiomes par génétique moléculaire a commencé à la fin du vingtième siècle et a permis de repérer les principaux gènes incriminés dans ces tumeurs. Enfin ces dernières années, le saut technologique des techniques NGS a permis le séquençage d'un grand nombre de méningiomes afin de mieux cerner le paysage mutationnel de cette affection. Les constats de cytogénétique et l'arrivée du séquençage génétique des méningiomes, ont permis d'identifier les principaux gènes responsables de cette pathologie.

1) Cas particuliers : pathologies familiales et mutations constitutionnelles

Parmi les pathologies familiales pouvant provoquer des méningiomes, la neurofibromatose de type 2 est le syndrome le plus fréquent avec une incidence de 1 pour 33 000-40 000. Cette pathologie autosomique dominante est liée à la mutation du gène *NF2* sur le chromosome 22q12. Les atteintes sont neurologiques, cutanées et oculaires avec

l'apparition de schwannomes et de méningiomes. La pénétrance à 60 ans est quasiment complète et la moitié des patients auront au moins un méningiome au cours de leur existence³⁷.

Les mutations germinales du gène *SMARCE1* situé sur le chromosome 17q21 ont été identifiées dans plusieurs familles présentant une méningiomatose multiple de la moelle épinière et du crâne³⁸. Des mutations constitutionnelles du gène *SMARCB1* ont également été décrites dans des familles de patients associant de multiples méningiomes associés ou non à des schwannomes³⁹.

Le syndrome de Cowden⁴⁰ maladie autosomique dominante induit chez les patients plusieurs hamartomes issus des trois feuilletts embryonnaires. Ces tumeurs normalement bénignes ont une propension à engendrer chez les patients présentant ce syndrome des tumeurs malignes cérébrales, mammaires et thyroïdiennes. Ces patients présentent généralement une mutation sur le gène *PTEN*.

La prédisposition aux tumeurs mutées *BAP1*⁴¹ se traduit par un risque plus élevé de développer des mélanomes et tumeurs cérébrales agressives, dont des méningiomes exclusivement rhabdoïdes (grade III).

Enfin citons le syndrome de Gorlin qui engendre des carcinomes névoïdes basaux et des méningiomes multiples. Ce syndrome a pour origine, les mutations des gènes *PTCH1* et *SUFU* impliqués dans la voie hedgehog⁴².

Des méningiomes sont également décrits de façon plus anecdotique dans les néoplasies endocrines multiples de type 1, la maladie de Von Hippel Lindau, le syndrome de Li Fraumeni et le syndrome de Werner (syndrome proche de la progéria).

2) Anomalies chromosomiques

Les anomalies cytogénétiques et particulièrement les délétions sont fréquentes dans les méningiomes. La délétion du chromosome 22q est la plus anciennement connue (1972) et la plus répandue car on la trouve dans la moitié des méningiomes. Il s'agit également de la seule anomalie cytogénétique que l'on trouve fréquemment dans les méningiomes de grade I⁴³.

Les méningiomes de haut grade peuvent comporter des anomalies additionnelles notamment, la disparition des chromosomes 1p et 14p assez fréquente puis 6q, 10q et 18q moins fréquente au grade II et enfin la disparition du chromosome 9p retrouvé pour les méningiomes de grade III. De façon moins fréquente on recense le gain des bras chromosomiques 1q, 9q, 12q, 15q, 17q et 20q dans les méningiomes de haut grade. Les

anomalies cytogénétiques sont davantage présentes dans les méningiomes récidivants que dans les méningiomes de novo⁴⁴.

3) *NF2* et la protéine merlin

Le gène *NF2* est situé sur le bras long du chromosome 22 et code pour une protéine de 69 kDA appelée merlin (moesin-ezrine-radixine-like proteine). Merlin également appelée Schwannomine comporte un domaine protéique conservé FERM. Le domaine N-FERM terminal est suivi d'une hélice alpha et d'un domaine C-terminal (Cf **Figure 6**)⁴⁵.

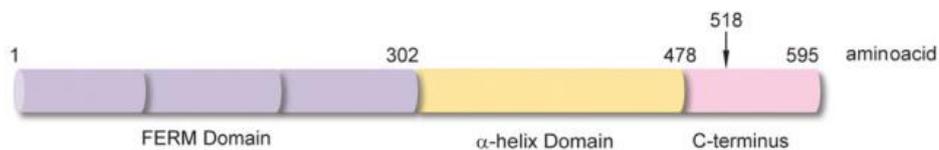


Figure 6 : représentation des domaines protéiques de *NF2*⁴⁵.

Merlin à deux conformations : ouverte et active par déphosphorylation, repliée et inactive par phosphorylation. Cette protéine du cytosquelette lie les filaments d'actine, les récepteurs transmembranaires et les molécules de signalisation intracellulaire. Elle constitue ainsi un véritable carrefour oncosuppresseur qui régule la voie hippo, la voie mTOR, et la voie d'inhibition de contact intercellulaire (Cf **Figure 7**)⁴⁶.

En conformation ouverte elle inhibe RAC1 et PAK1 responsable de la tolérance à la prolifération cellulaire. Elle inhibe aussi la voie Hippo en empêchant l'internalisation intranucléaire de facteur de transcription. Enfin, elle constitue un inhibiteur de la voie mTOR par inhibition indirecte de PI3K et inhibition directe de mTORC1, ce qui empêche la croissance de la cellule.

Plusieurs types de cancer sont liés à une mutation inactivatrice de la protéine. Les schwannomes et les épépendymomes pour le système nerveux central (notamment dans les neurofibromatoses de types 2), mais aussi les mésothéliomes, les cancers anaplasiques de la thyroïde, du sein, de l'endomètre et du foie.

S'agissant des méningiomes, les anomalies touchant le gène *NF2* sont de loin les plus nombreuses. Il s'agit de délétions complètes du gène, de mutations aboutissant à une protéine tronquée (non-sens, micro-délétion et micro-insertion, modification de la zone canonique d'épissage) ou encore de méthylation du gène empêchant son expression.

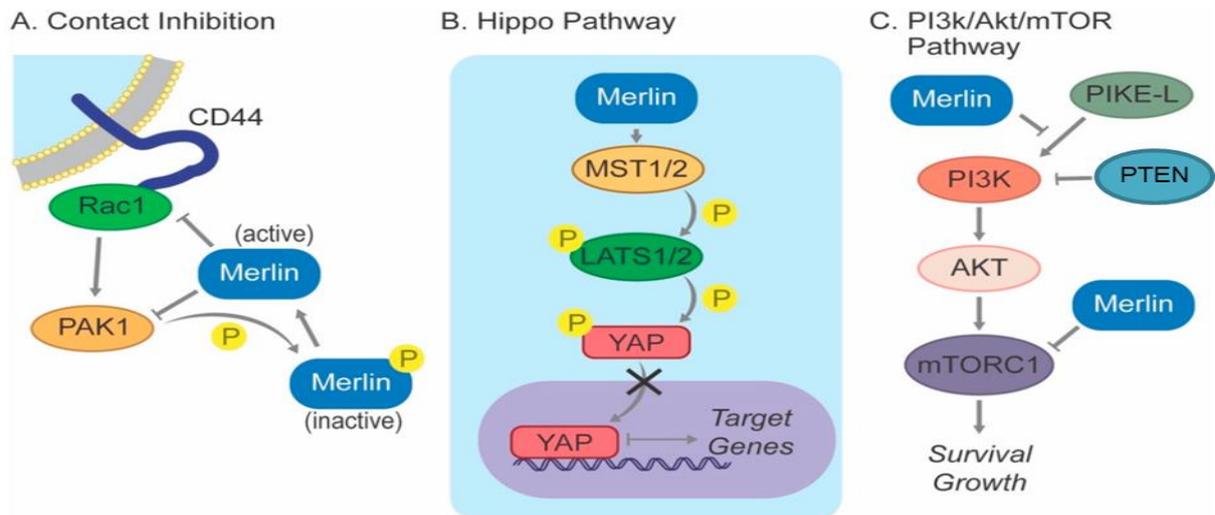


Figure 7 : implication de la protéine merlin dans les différentes voies de signalisation⁴⁶.

4) *TRAF7*, *KLF4* et gènes de la voie PI3K/AKT/mTOR : *AKT1*, *PIK3CA* et *PTEN*

Les mutations concernant *TRAF7* sont les secondes plus fréquentes dans les méningiomes après les mutations *NF2*. Elles sont souvent associées à des mutations sur les gènes *AKT1* ou *KLF4* ou *PIK3CA* selon les observations suivantes :

- Les mutations *AKT1* ou *PIK3CA* sont accompagnées d'une mutation *TRAF7* dans la moitié des cas.
- La mutation de *KLF4* est systématiquement accompagnée d'une mutation sur *TRAF7*
- Les mutations concernant *AKT1*, *KLF4* et *PIK3CA* bien que pouvant s'associer à une mutation *TRAF7*, ne sont jamais retrouvées associées entre elles.

Enfin précisons que les mutations de *TRAF7*, *KLF4* et *AKT1* ne sont jamais associées à celles de *NF2*⁴⁷.

- TRAF7

Le gène *TRAF7* (TNF receptor associated factor) découvert en 2004 dans une étude sur la voie TNF α /NF- κ B est un gène situé sur le chromosome 16p13. Il code pour la protéine transductrice de signal E3 ubiquitin-protein ligase *TRAF7*, membre de la superfamille des TNF récepteurs, exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme. La protéine comporte 4 parties, un anneau de zinc, une portion en doigt de zinc, une portion enroulée et enfin 7 domaines WD40 en C terminal (**Figure 8**)⁴⁸. La protéine codée par *TRAF7* interagit avec MEKK/Map3K3 grâce à son domaine WD40. Elle agit avec sa portion enroulée sur le régulateur de la transcription NF- κ B⁴⁹. Lorsque cette protéine est surexprimée, il en résulte une apoptose.

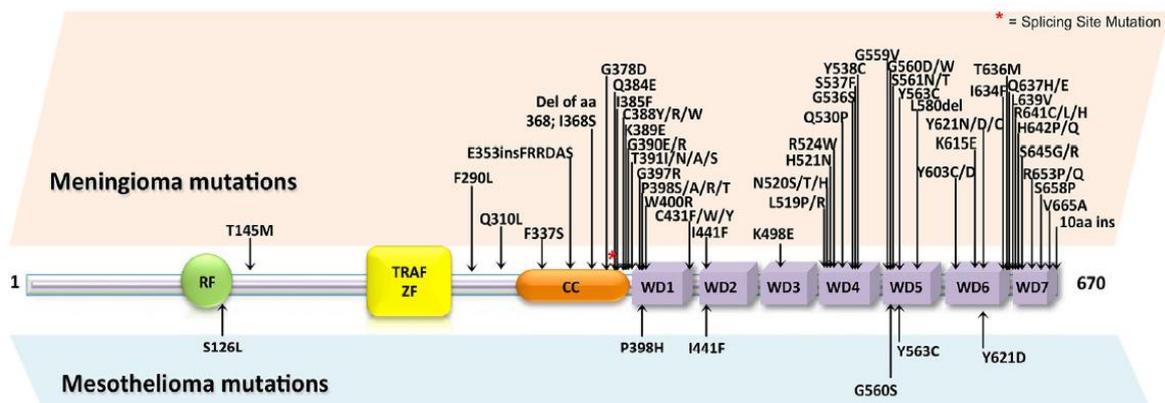


Figure 8 : structure et mutations du gène *TRAF7*⁴⁸.

Ce gène n'est retrouvé muté que dans les mésothéliomes et les méningiomes. Les mutations sont principalement retrouvées sur les parties codantes WD40 du gène et sur sa portion enroulée.

- KLF4

Le gène *KLF4* (Krüppel-like factor 4) appartient à la famille des facteurs de transcription de type Krüppel. Il est situé sur le chromosome 9p31 et comporte un domaine en doigt de zinc. Ce facteur de transcription liant l'ADN est impliqué dans des processus variés tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la reprogrammation de cellules somatiques. En cas d'agression diverse de la cellule, ce facteur de transcription a donc la

possibilité d'induire une reprogrammation d'une cellule mature en cellule souche pluripotente.

Bien que ce gène soit exprimé entre autre dans la peau, le tube digestif et les poumons, les méningiomes sont les seules tumeurs à avoir des mutations sur le gène *KLF4*. Il n'y a qu'une seule mutation rencontrée : K409Q (p.Lys409Gln) située sur le doigt de zinc en charge de la liaison avec l'ADN⁵⁰.

- *AKT1*

AKT1 est porté par le chromosome 14q32. Il code pour une serine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) aussi appelée AKT kinase. La partie PH de l'enzyme est essentielle à son activité, elle permet la liaison avec son substrat. Cette enzyme est un des éléments majeurs de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, elle régule la prolifération la croissance et l'apoptose des cellules. Elle peut donc avoir un effet oncogène en cas de dérégulation de son activité (Cf **Figure 7**).

L'enzyme est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme et est impliquée dans 8 % des cancers du sein, 6 % des cancers du côlon et 2 % cancers de l'ovaire. La mutation retrouvée dans les méningiomes est exclusivement E17K (p.Glu17Lys), mutation activatrice du domaine PH⁴⁴.

- *PIK3CA*

Le gène *PIK3CA* est situé sur le chromosome 3q26. Il code pour une sous unité catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase qui est une enzyme ubiquitaire. Elle est composée d'un domaine catalytique Kinase, un domaine hélicoïdal, impliqué dans la stabilisation de la protéine, un domaine C2, permettant la liaison membranaire, et un domaine de liaison à Ras, domaine de régulation de la protéine (Cf **Figure 9**). Comme indiqué sur la **Figure 7** cette entité est tout comme *AKT1* directement intégrée à la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *PIK3CA* en cas de suractivation est potentiellement oncogène.

Les mutations *PIK3CA* sont retrouvées fréquemment dans de nombreux types de cancer touchant quasiment tous les organes⁵¹. Dans les méningiomes les mutations E545K (p.Glu545Lys) et H1047R (p.His1047Arg) représentent l'essentiel des mutations observées.

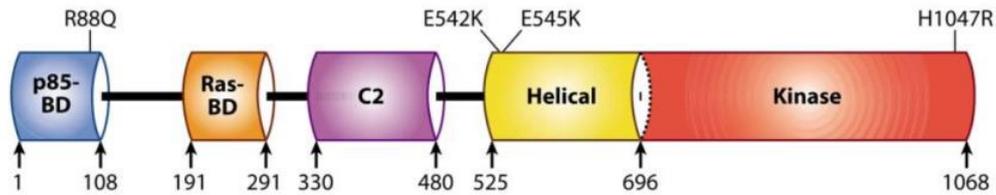


Figure 9 : structure et mutations du gène *PIK3CA*.

- *PTEN*

PTEN est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 10q23. Il code pour une phosphatase, régulatrice de la voie PIK3-AKT-mTOR par antagonisme de la PI3Kinase, et de la voie des MAPKinase (Cf **Figure 9**). Cette enzyme est ubiquitaire. Tout comme sa cible *PIK3CA*⁵¹, elle est bien connue en oncologie notamment dans les glioblastomes, les cancers du sein et les cancers de la prostate. Des méningiomes de haut grade sont détectés concomitamment avec une mutation sur le gène *PTEN* chez les patients présentant le syndrome de Cowden.

5) Les gènes de la voie de signalisation hedgehog : *SMO*, *SUFU* et *PTCH1*.

- *SMO*

SMO est un gène situé sur le chromosome 7p32 codant pour une protéine transmembranaire couplée aux protéines G. Cette protéine appartient à la voie de signalisation sonic the hedgehog⁵² (Cf : **Figure 10**), voie impliquée dans l'embryogénèse et dans divers processus impliquant la différenciation, la prolifération, l'angiogenèse et dans l'agencement du ciment intercellulaire. Une anomalie de la protéine peut aboutir, via le complexe GLI à une surexpression de certains gènes induisant à terme une prolifération tumorale. Cette protéine est surtout présente dans l'endomètre, les ovaires, la peau, les reins et la prostate. Elle est impliquée essentiellement dans les carcinomes basocellulaires et les médulloblastomes. Les deux mutations les plus fréquemment retrouvées dans les méningiomes sont L412F (p.Leu412Phe) et W535L (p.Trp535Leu)⁵³, elles impactent le domaine transmembranaire⁵⁴

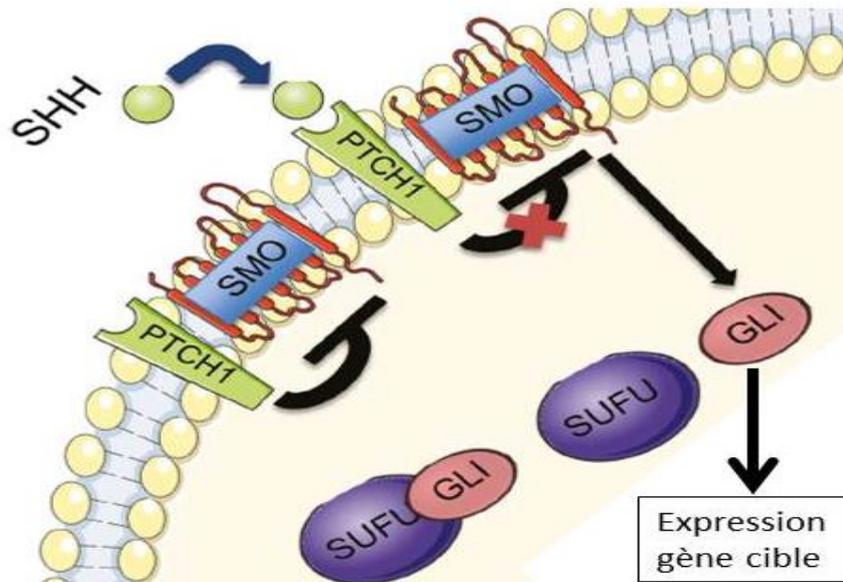


Figure 10 : éléments principaux de la voie sonic the hedgehog⁵⁵.

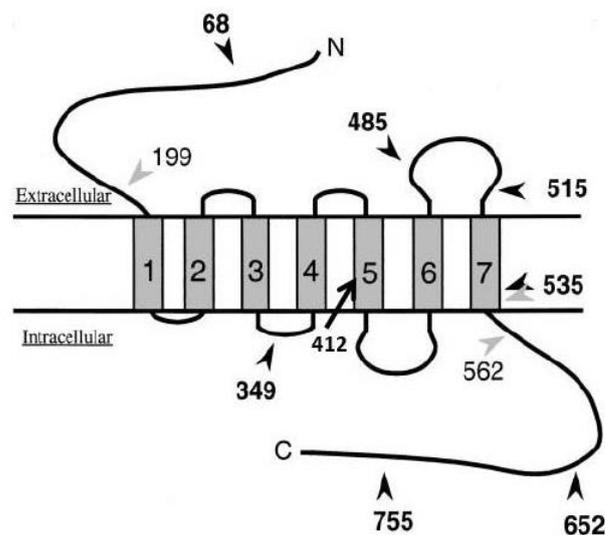


Figure 11 : structure et mutations du gène *SMO*⁵⁶.

- *SUFU* et *PTCH1*

Le gène *PTCH1* porté par le chromosome 9q22 code pour le récepteur transmembranaire de la protéine hedgehog. Lorsqu'il n'est pas au contact de cette protéine il inactive la protéine *SMO*. *SUFU* situé sur le chromosome 10q24 code pour une protéine régulant négativement l'activité de *SMO* et empêchant la libération du facteur de transcription *GLI* dans le noyau. Ces deux gènes sont retrouvés mutés dans les cas familiaux de syndrome de Gorlin et sont soupçonnés d'induire des méningiomes, tout particulièrement *SUFU* à cause

de sa localisation sur un chromosome fréquemment supprimé dans les méningiomes de haut grade⁴².

6) Gènes impliqués dans la progression tumorale

- *TERT*

Le gène *TERT* est situé sur le chromosome 5p15, et code pour une ribonucléoprotéine polymérase, la télomérase dont le rôle est de maintenir les extrémités des télomères en ajoutant la répétition TTAGGG en fin de bras. Le rôle de la télomérase est essentiel dans la sénescence cellulaire. Elle est réprimée dans les cellules somatiques entraînant un raccourcissement progressif des télomères et à terme une mort cellulaire. Une dérégulation de l'expression de la télomérase dans les cellules somatiques peut conduire à une immortalisation des cellules. La présence de mutations somatiques récurrentes dans le promoteur du gène *TERT* a été rapportée dans les cancers du système nerveux central de la vessie, de la thyroïde et dans les mélanomes. Elle est également attestée depuis 2013 dans les méningiomes avec la présence de ces deux mutations : C228T et C250T⁵⁷ et est souvent associée à des mutations de *NF2*.

- *CDKN2A* et *CDKN2B*

Ces deux gènes contigus sont portés par le chromosome 9p21. *CDKN2A* code pour les protéines p16(INK4a) et p14(ARF) et *CDKN2B* code pour la protéine p15(INK4B). Ces protéines se lient aux kinases cyclines dépendantes CDK4 et CDK6. Le rôle de ces kinases est de contrôler la division cellulaire en phase G1 en protégeant notamment le facteur de transcription p53⁴⁴. De la perte d'activité de ces protéines résulte une dégradation accrue de p53 et un échappement du mécanisme de division cellulaire. Aussi, ces deux gènes sont fréquemment mutés dans de nombreux cancers. Il a été retrouvé des mutations somatiques sur *CDKN2A*⁵⁸ et dans une moindre mesure sur *CDKN2B*⁵⁹ dans les méningiomes de haut grade, ainsi que des délétions du bras chromosomique portant le couple de gènes.

- Complexe SWI/SNF et gène *SMARCB1* et *SMARCE1*

Le complexe SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable) est un complexe ATP dépendant, permettant le remodelage chromatinien en vue de la régulation épigénétique chez l'homme. Le complexe en faisant bouger les nucléosomes le long du brin d'ADN permet

l'accès de l'ARN polymérase à l'ADN et active la transcription. Ce complexe ubiquitaire dans l'organisme est composé de plusieurs sous unités, dont les protéines codées par les gènes *SMARCB1* et *SMARCE1* font partie. *SMARCB1* et *SMARCE1* sont portés respectivement par les chromosomes 22q11 (proximité avec *NF2*) et 17q21⁶⁰.

Des mutations constitutionnelles de ces gènes ont été décrites dans des méningiomes multiples familiaux³⁸, dans des schwannomatoses et dans le syndrome de Coffin-Siris. D'un point de vue somatique *SMARCE1* est recensé dans des méningiomes spinaux et *SMARCB1* dans certains méningiomes, notamment de type rhabdoïde⁵⁵.

7) Autres anomalies du génome

- *POLR2A*

Ce gène *POLR2A* est situé sur le chromosome 17p13 et code pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, responsable de la synthèse de l'ARN messager chez les eucaryotes. Cette protéine est présente dans toutes les cellules de l'organisme. En oncologie, aucune mutation de ce gène n'a été clairement corrélée à un processus oncologique, preuve en est que cette fonction cellulaire est tellement essentielle, qu'elle bénéficie de puissants mécanismes de contournement des erreurs éventuelles. Clark *et al.*⁶¹ ont découvert dans leur travaux portant le séquençage par NGS de 775 méningiomes, des mutations somatiques récurrentes p.Gln403Lys ou p.Leu438_His439del dans 6 % des cas.

- Autres mutations

D'autres gènes ont été incriminés dans les méningiomes mais de façon beaucoup plus rare. Citons pour le cas des tumeurs rhabdoïdes l'altération des gènes *BAP1* et *BRAF*, respectivement impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la voie des MAPkinases, avec l'altération très connue en oncogénétique *BRAF* V600E.

La présence de mutations dans les gènes *FAK* et *NOTCH2* responsables des voies de signalisation du même nom est suspectée de provoquer des méningiomes, mais nécessite d'autres études en vue d'une confirmation. Il en va de même pour les mutations sur *DMD* et *CHECK2* responsables respectivement, de la construction du cytosquelette et de la réparation de l'ADN qui, associé à une mutation sur *NF2* constituerait un critère d'agressivité de la tumeur⁴⁴.

Enfin une publication récente fait état de mutations découvertes par NGS sur 23 méningiomes impliquant notamment les gènes *ATM*, *EGFR*, *NRAS*, *PTPN11*, *KRAS*, *MET*, *HRAS*, *VHL* et *JAK3*, jusqu'ici jamais cités comme responsables de méningiomes. Cette découverte demande à être confirmée⁶².

8) Anomalies épigénétiques

- Le méthylome

L'étude du méthylome des méningiomes a permis d'identifier plus d'une trentaine de gènes ayant une anomalie de la méthylation de l'ADN et potentiellement impliquée dans la pathologie. Les anomalies les plus fréquentes sont des hyperméthylations de l'ADN, elles sont souvent corrélées à des grades élevés. Elles touchent des gènes aux fonctions variées : *TP73*, *TIMP3*, *WNK2*, *CDKN2A*, *MEG3*, *RIZ1*, le groupe *HOXA*,⁶³... Au sein de ces gènes nous en présentons 2 fréquents qui touchent chacun à des mécanismes différents :

-*TIMP3*⁶⁴ est un gène situé sur le chromosome 22 tout comme le gène *NF2*, son hyperméthylation est fréquemment associée dans les méningiomes de haut grade à une délétion de *NF2*. Ce gène code pour une métalloprotéase responsable de la régulation de la transcription de l'ADN.

-*WNK2* est un gène situé sur le chromosome 9. Son hyperméthylation est retrouvée dans les trois quart des méningiomes de haut grade. Il code pour une protéine inhibant la voie EGFR.

Plusieurs études sur les micros ARN font état de déséquilibre dans les méningiomes. Par exemple le miR-200a est sous exprimé et le miR de la bêta-caténine est surexprimé chez certains patients.

De la même façon, le statut méthylé ou acétylé des histones peut être corrélé aux méningiomes. Par exemple la déméthylation de l'histone H3K27 est fréquemment associée aux méningiomes mutés *NF2*⁶⁰.

III-Matériel et méthode

Le séquençage de la présente série de méningiomes a été mené en deux temps. Dans un premier temps le Docteur Basset a séquencé au cours de l'année 2017, 38 méningiomes

pour ses travaux de thèse. Puis nous avons pour rédiger le présent ouvrage, séquencé 45 nouveaux méningiomes durant l'année 2019.

Nos deux séries de résultats issus de nos deux travaux expérimentaux respectifs, seront fusionnées en vue d'une analyse statistique génotype-phénotype sur 83 méningiomes. Les conditions d'obtention de nos résultats doivent donc être rigoureusement identiques. Ainsi pour l'ensemble de ce paragraphe relatif aux matériels et à la méthode employée, nous reprendrons pour tout ou partie et avec son aimable accord, le même protocole que celui suivi par le Docteur Basset durant sa thèse.

1) Matériel

- Tumeurs et patients

L'étude a été menée sur 81 patients dont l'exérèse des méningiomes a été réalisée à l'hôpital de la Timone entre octobre 2010 et janvier 2019. Les tissus tumoraux ont été collectionnés, en partie mis en culture pour des études fonctionnelles et en partie congelés pour de futures études génomiques dans le laboratoire MMG (CODECOH DC-2019-3568, Aix Marseille Université). Ceci est le fruit d'une collaboration avec le service de Neurochirurgie du Pr Dufour, le Dr Graillon et le service d'Anatomopathologie du Pr Figarella-Branger. Nous disposons pour cette cohorte de 83 tumeurs (2 des patients ont eu une exérèse conjointe de deux tumeurs) des consentements éclairés des patients (Numéro d'enregistrement de l'étude AD-2018-31053).

- 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 charge 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
- Récidives et localisations multiples

2) Méthode

Le séquençage des méningiomes sera réalisé en NGS avec un panel de gènes, afin de mener des investigations approfondies tout en gardant des coûts maîtrisés^{65,66}. Nous rechercherons en parallèle les délétions de grande taille de *NF2* par PCR en temps réel multiplex.

a) Choix du panel de gènes

Afin d'effectuer le génotypage des tumeurs avec le meilleur rationnel pertinence/coût par analyse, nous avons fait le choix de travailler sur un panel ciblé. Cela nous a permis d'effectuer un nombre restreint de séries d'analyses NGS, tout en assurant une bonne détection des principaux gènes responsables de méningiomes.

In fine 13 gènes ont été retenus : *NF2*, *TRAF7*, *KLF4*, *AKT1*, *SMO*, *PIK3CA*, *TERT*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *SUFU* et *PTEN*.

Ces gènes ont été choisis d'après la revue de la littérature présentée dans le deuxième volet de cette première partie et selon les arguments suivants :

- NF2*, *TRAF7*, *KLF4*, *AKT1*, *SMO* et *PIK3CA* car ils sont cités de façon récurrente tout au long de la littérature et cumulent plus de 80% des anomalies décrites.
- TERT* est le gène rapporté ces dernières années comme influençant le plus la progression des méningiomes vers des grades élevés.
- *CDKN2A* et *CDKN2B* semblent souvent impliqués dans la progression des méningiomes vers des stades supérieurs, de plus ils sont situés sur un chromosome subissant couramment une délétion dans les hauts grades.

- *SMARCB1* et *SMARCE1* car en plus d'être bien connu dans les méningiomes familiaux, ils sont également rapportés dans les méningiomes au niveau somatique et présents sur des chromosomes sujets à délétions pour ces méningiomes. Cela nous permettra d'apprécier la représentation de la voie SWI/SNF dans la tumorigénèse.

-*SUFU* nous apparaît comme un choix cohérent en complément de *SMO* afin d'explorer la voie hedgehog, de plus il est situé sur un chromosome subissant régulièrement une délétion.

-*PTEN* permet d'explorer pleinement la position des anomalies de la voie PI3K/AKT/mTOR et l'implication de ce gène sur les méningiomes somatiques.

Nous avons exclu beaucoup de gènes. Certains pour des raisons de manque de preuve comme *POLR2A* rapporté seulement dans une publication, au moment de la réalisation de nos travaux. D'autres, comme *BAP1* à cause de leur lien spécifique avec les tumeurs rhabdoïdes absentes de notre cohorte. *PTCH1* quant à lui, a été écarté car seulement recensé dans des tumeurs germinales, ce qui est trop restrictif.

b) Préparation de l'ADN : extraction, quantification et qualification de l'ADN

A partir des tumeurs congelées, nous avons procédé à l'extraction de l'ADN tumoral par le kit d'extraction manuelle QiaAmp DNA kit, selon les recommandations du fournisseur. L'ADN ainsi obtenu a été conservé à -80°C avant analyse.

Après extraction les ADN sont quantifiés par fluorimétrie 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/A230 par spectroscopie UV (Nanodrop).

c) Technique d'étude du profil mutationnel des tumeurs par NGS

L'élaboration du design de la librairie se fait en ligne sur le 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'intérêt.

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. Cela constitue un total de 24 486 paires de base, pour 362 amorces.

Le kit QIAseq targeted DNA permet l'introduction de séquences uniques (constituées de 12 nucléotides), appelées codes-barres moléculaires, qui vont être attachées à chaque molécule d'ADN originale avant toute amplification. Ainsi les molécules d'ADN de l'amplification par PCR et ayant la même origine porteront le même code-barre.

Ces codes-barres moléculaires augmentent 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 distinctes, qui porteront des codes-barres différents. Ils vont également discriminer un variant artificiel présent sur une partie seulement des séquences portant un même code-barre, d'un véritable variant de séquence qui sera présent sur l'ensemble des séquences portant le même code-barre (Cf **Figure 12**).

La préparation des bibliothèques de séquençage se déroule en cinq grandes étapes réparties sur 3 jours (Cf **Figure 13**), à partir d'une prise d'essai maximum de 15µL.

Les différents fragments adjoints au cours des 5 étapes sont schématisés sur la **Figure 14**. Les noms des étapes durant lesquelles sont intégrés les différents éléments constitutifs du fragment sont indiqués en rouge

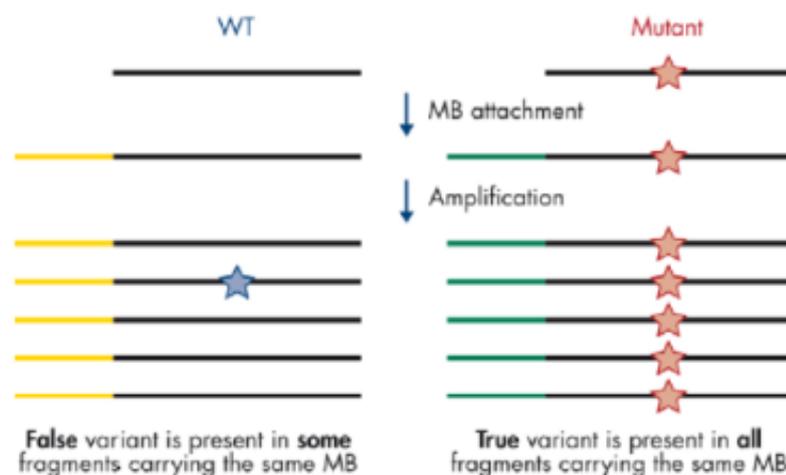


Figure 12 : schéma illustrant l'intérêt de l'utilisation de codes-barres moléculaires dans les technologies de séquençages haut débit, pour limiter les variants artificiels. D'après *QIAseq™ Targeted DNA Panel Handbook, Mai 2017*.

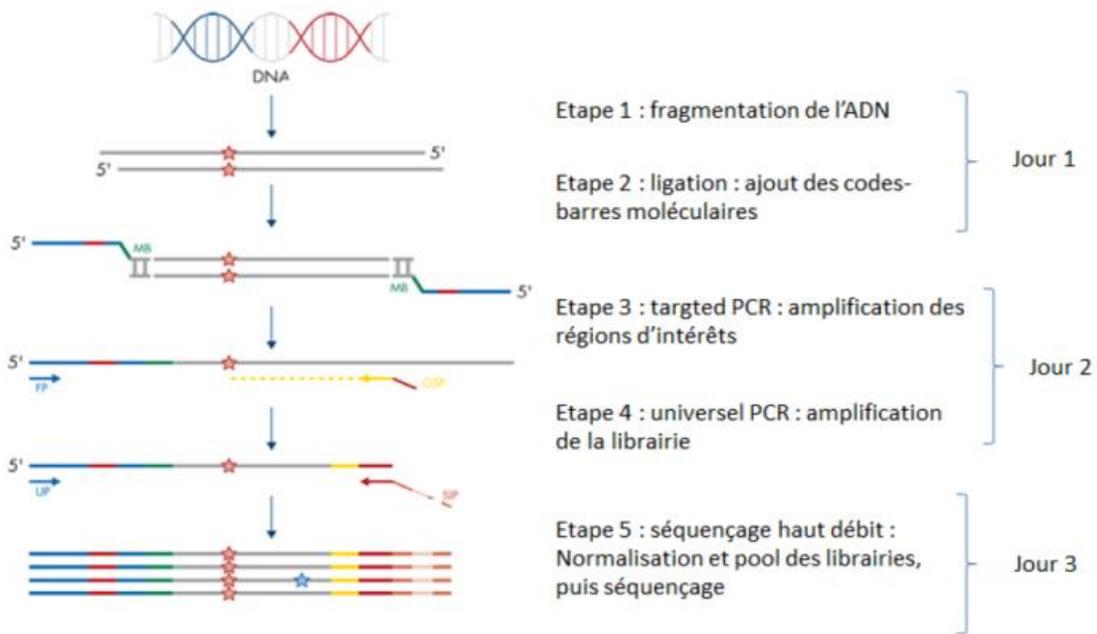


Figure 13: illustration des différentes étapes d'élaboration de la librairie de séquençage haut débit avec le kit QIAseq targeted DNA (UP : Universal Primer ; FP : Forward Primer ; MB : Molecular Barcode ; GSP : Gène Specific Primer ; SIP : Sample Index Primer).
D'après *QIAseq™ Targeted DNA Panel Handbook, Mai 2017*.

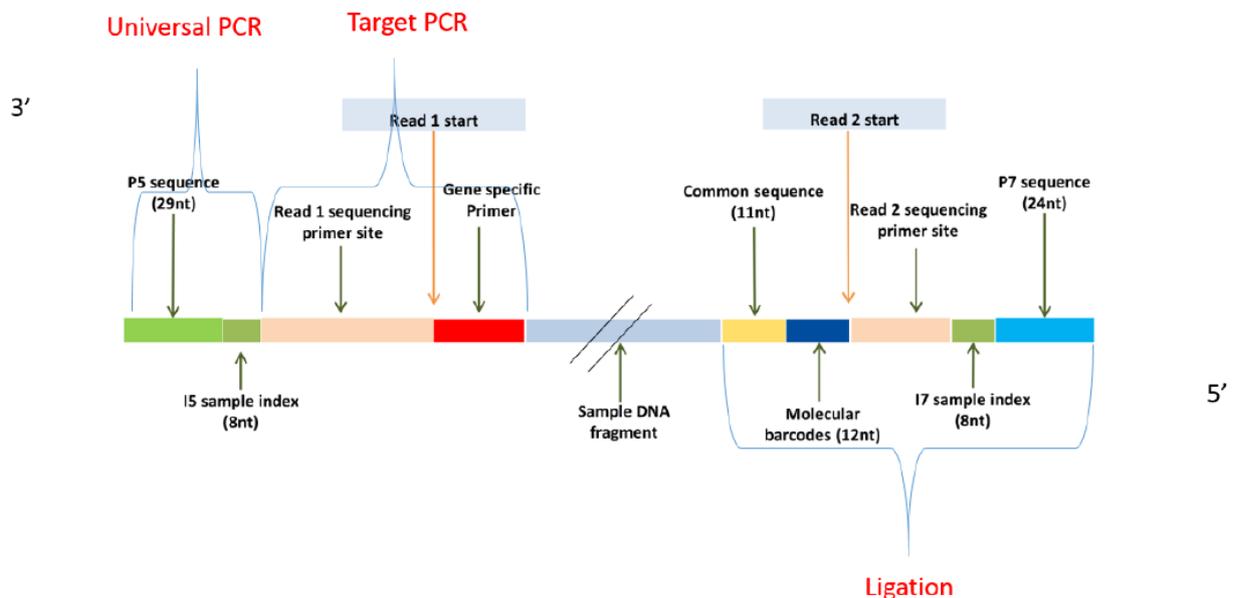


Figure 14 : structure d'un fragment issu de la technologie QIAseq Targeted DNA⁶⁷.

- Première étape : fragmentation

L'ADN est fragmenté de façon aléatoire à une température de 32°C par des endonucléases fournies dans le kit, ces dernières sont ensuite inactivées à 65°C. S'en suit 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 réalisée en parallèle afin de préparer l'étape de ligation.

- Deuxième étape : ligation

Le processus se poursuit avec l'adjonction des codes-barres (ou UMI : unique molecular index en bleu sur la **Figure 14**), à une température de 20°C, grâce à un adaptateur (appelé séquence commune, en jaune sur la **Figure 14**) et une ADN ligase.

Ce code-barre moléculaire est attaché à l'amorce de séquençage haut débit Read 2 sequencing primer (rose sur la **Figure 14**), aux index I7 servant à l'identification des échantillons pour permettre un multiplexage (vert sur la **Figure 14**), ainsi qu'à l'adaptateur de séquençage haut débit P7 (bleu ciel sur la **Figure 14**).

Un lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisé 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-barre 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'un premier index I7.

- Troisième étape : PCR ciblée

Les molécules d'ADN sont soumises à plusieurs cycles de PCR en utilisant tout d'abord des amorces spécifiques des régions d'intérêt (GSP : Gene Specific Primer en rouge sur la **Figure 14**) reliées à l'amorce de séquençage haut débit Read 1 sequencing primer (rose sur la **Figure 14**) puis, des amorces IL-Forward complémentaires à l'adaptateur de séquençage haut débit P7.

Un lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisé 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'intérêt 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-barre moléculaire.

- Quatrième étape : PCR universelle

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, reliées au second adaptateur de séquençage haut débit P5 ainsi qu'aux index I5 (vert sur la **Figure 14**). Sont également incorporées dans le mix des amorces complémentaires à l'adaptateur de séquençage haut débit P7.

Un lavage par billes magnétiques et éthanol est ensuite réalisé sur une plaque magnétique pour purifier l'ADN et enlever les dimères d'amorces.

Les bibliothèques 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.

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

- Cinquième étape : séquençage haut débit

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

Les bibliothèques 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 bibliothèques à l'aide du kit QIAseq targeted DNA, nous avons suivi les recommandations du fournisseur : 100 ng d'ADN et 23 cycles de PCR.

d) 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.

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 sensibilité 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 intégrés à l'échantillon couvrant une base de la région d'intérêt. Dans un second temps à partir du nombre de codes-barres moléculaires, 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.

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

- .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.
- .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.
- 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 basées sur les algorithmes SIFT (Sort Intolerant From Tolerant human Protein), 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. Le site Varsome a également été utilisé pour l'ensemble des données qu'il compile comme la base de données GNOMAD et d'autres outils prédictifs.

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.

e) Technique d'analyse du nombre de copies du gène *NF2* par PCR en temps réel.

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

L'analyse du nombre de copies du gène *NF2* est effectuée 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 conçue 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.

- 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 ΔCt (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 ΔCt est calculée pour chaque échantillon (à partir des 3 réplicats). Chaque échantillon est ensuite normalisé par rapport au calibrateur pour déterminer $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt échantillon - ΔCt 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 $2 \times RQ$.

Lors de l'interprétation des résultats, un écart maximum de 20 % est toléré, selon les recommandations du fournisseur. En cas de valeur de test comprise entre 0,5 et 0,75 on considère qu'il y a délétion d'un allèle.

f) Corrélation génotype-phénotype : outils statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Prism 8.01 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Pour l'analyse clinico-moléculaire statistique de notre cohorte nous avons utilisé, selon les effectifs statistiques impliqués, un test d'indépendance du χ^2 ou un test exact de Fisher. Les p values inférieures à 0,05 sont considérées comme étant significatives et celles comprises entre 0,05 et 0,1 seront tout de même évoquées le cas échéant.

Deuxième partie : résultats de la cohorte et comparaison avec les travaux des pairs

I-Résultats des analyses génétiques de la cohorte

Au cours de l'étude nous avons réalisé sept séquençages haut-débit pour analyser 83 tumeurs congelées provenant de 81 patients. Ces séquençages regroupent 92 analyses de tumeurs, car il a parfois été nécessaire de réaliser une seconde fois certaines analyses de tumeurs afin d'améliorer la qualité des résultats. Nous présentons ici la validation technique de ces séquençages, les données cliniques de la cohorte ainsi que les anomalies génétiques retrouvées.

1) Validation technique des séquençages haut-débit

- Evaluation de la qualité des séquençages à partir des données du séquenceur

Les paramètres de validation technique des données brutes (dont les valeurs sont recommandées par Illumina) des sept séquençages haut débit, sont listés dans le **Tableau A1** en annexe. Ils sont fournis directement par l'automate Miseq et visualisables sur le logiciel Miseq reporter. Ces paramètres permettent d'apprécier deux éléments importants :

- La densité de clusters formée sur la flowcell (cellule d'analyse), sachant qu'un cluster est constitué d'environ 1000 copies d'un même brin d'ADN sur 1 micron carré de la flowcell. Un cluster équivaut à une seule séquence.

- Le filtre de chasteté (PF), appliqué aux 25 premiers cycles c'est-à-dire les 25 premières bases lues. Cela 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 d'une base au cours des 25 premiers cycles alors le cluster est exclu et ne sera donc pas analysé par la suite (Cf **Figure 15**). L'appareil exprime le % de clusters ayant passé ce filtre.

L'analyse du score de qualité des séquences est effectuée à l'aide du logiciel FASTQC pour chaque échantillon à partir des fichiers .fastq produits par l'automate Miseq. Toutes les

séquences que nous avons obtenues, présentent une médiane supérieure à un score de 30 (bonne qualité).

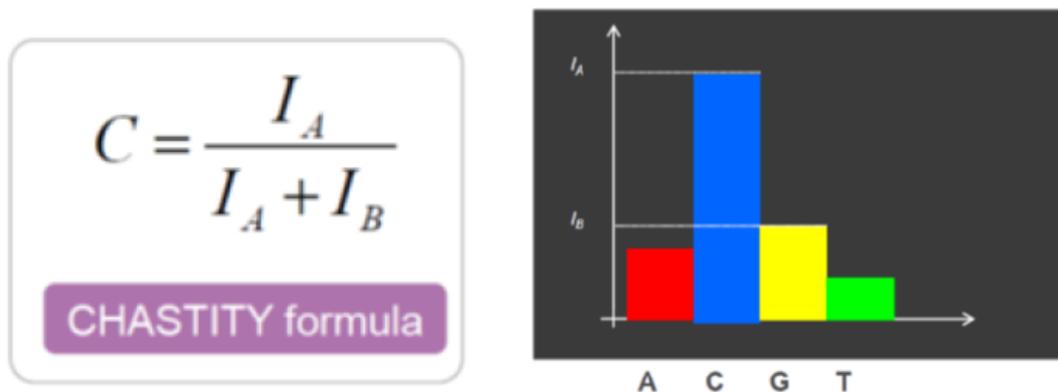


Figure 15 : formule et représentation graphique du filtre de chasteté (PF)

- Evaluation de la qualité des séquençages à partir des données informatiques post-traitement.

Le pipeline d'analyse fourni des informations relatives à la qualité des séquences. Les plus importantes sont :

- La profondeur de lecture moyenne. On estime que sur une zone donnée une profondeur de 100 en analyse des cellules somatiques est suffisante.
- Le nombre de codes-barres moléculaires intégrés par l'échantillon qui dépendent de la qualité et de la quantité d'ADN initial. 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 allélique minimale détectable.
- La couverture des zones ciblées, l'idéal étant d'atteindre 100 % des zones séquencées avec une profondeur de 100.

La profondeur de lecture moyenne pour chaque échantillon est de 4635 x (de 735 x à 11233 x). Le nombre de codes-barres moléculaires intégrés pour chaque échantillon est en moyenne de 327 048 (de 60 888 à 960 447). La couverture à 100 x est jugée supérieure à 99 % pour l'ensemble des gènes. Le nombre moyen de codes-barres moléculaires intégrés à l'échantillon par base situé dans une région d'intérêt est en moyenne de 1125 (208 à 2934). 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 %.

Par sécurité nous avons conservé les variants représentant une fraction allélique d'au moins 5%.

2) Présentation de la cohorte de patients

L'ensemble des données cliniques, anatomopathologiques et génétiques des 81 patients, est exposé dans le **Tableau 2**.

La cohorte de patients est constituée de 23 hommes (28 %) pour 58 femmes (72 %) soit un sex-ratio proche de 1/3 comme observé dans la littérature.

L'âge moyen au moment de l'exérèse chirurgicale est de 59,3 ans. D'un point de vue histologique, on compte 26 tumeurs avec atypies cellulaires et 22 avec un nombre de mitoses supérieur à 3 pour 10 champs. Les tumeurs sont réparties de la façon suivante (Cf **Figure 16**) :

- 53 tumeurs de grade I (64 %) essentiellement des formes méningothéliales (30 %), fibroblastiques (17%) et transitionnelles (7 %).
- 26 tumeurs de grade II (31 %) avec exclusivement des formes histologiques atypiques.
- 4 tumeurs de grade III (5 %) avec exclusivement des formes histologiques anaplasiques.

Les méningiomes de la cohorte sont localisés dans tous les territoires anatomiques du cerveau à l'exception de la zone intraventriculaire. Nous avons regroupé les différentes localisations en 6 grandes zones : sphénoïde (33 tumeurs), frontale (18 tumeurs), occipitale (11 tumeurs), pariétale (8 tumeurs), temporale (8 tumeurs) et la faux du cerveau (5 tumeurs). Les proportions sont représentées sur la **Figure 17**.

Enfin diverses complications cliniques sont retrouvées dans la cohorte : l'envahissement des tissus adjacents (30 tumeurs), la présence de nécrose (15 tumeurs) ou d'œdème (23 tumeurs), les cas de récurrence (8 tumeurs) et de tumeurs multiples (11 tumeurs).

Numéro de la tumeur	Grade OMS	Données histologiques	Ki67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Mitose	Sexe	Oedeme/effet de masse	Nb de tumeur	Récidive	Anomalie NF2	Mutation
M 22	II	atypique	20	occipital	70	osseux massif	non	inflexion lymphocytoïde à haut rapport N/c	> 6 pour 10	m	non	1	non	oui	
M 24	I	meningothélial	3	base du crane	36	non	non	non	non	f	non	1	non	non	TRAF 7
M 25	I	meningothélial	7	inter-orbitaire	51	non	non	non	non	f	non	1	non	non	
M 55	II	atypique avec rares psammomes	7	frontal gauche	37	musculaire	non	inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	< 4 pour 10	f	non	1	non	oui	
M 58	II	atypique	20	sinus caveux	44	parenchyme	non	inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	< 4 pour 10	f	oui	2	non	non	
M 74	II	atypique	8	convexité coté droit	29	non	a l'emporte pièce	non	5 pour 10	m	oui	1	non	non	
M 86	I	transitionnel et sécrétoire	15	frontal gauche	60	dure-mère feuillet interne	non	non	< 4 pour 10	f	oui	1	non	non	TRAF7 + KLF4
M 163	I	fibroblastique avec quelques atypies	7	suprasellaire	40	non	non	nucléole	< 1 pour 10	f	non	1	non	non	
M 164	II	atypique avec psammomes	15	frontal	51	non	Rare foyer	non	4 pour 10	f	non	1	non	non	TRAF7 + AKT1
M 165	I	fibroblastique	6	faux du cerveau	40	non	non	non	non	f	non	3	non	oui	
M 189	II	atypique	20	frontal	36	non	micro foyer	aspect lymphocytoïde, perte de différenciation focale	8 pour 10	f	non	4(méningiome atose)	non	oui	NF2
M 244	I	fibroblastique avec rares psammomes	7	fosse postérieure	70	non	non	non	non	f	œdème seul	2	non	oui	NF2
M 245	II	atypique	4	arrête sphénoïdale gauche	53	parenchyme + os	micro foyer	non	4 pour 10	f	non	1	non	non	TRAF7 + PIK3CA
M 246	I	fibroblastique	3	fosse postérieure	51	non	non	non	non	f	non	1	non	oui	NF2 + PIK3CA
M 251	I	fibroblastique	4	suprasellaire	36	non	non	non	non	f	non	1	non	oui	NF2 + CDKN2A(VAS1)
M 252	II	atypique	10	sphénoïdo-caveux droit	69	os	oui	non	5 pour 10	f	non	1	oui	oui	NF2
M 253	I	meningothélial	1	suprasellaire	73	non	non	non	non	f	non	1	non	non	
M 254	I	méningothélial avec quelques atypies	5	pariétal	69	os	non	aspect lymphocytoïde, perte de différenciation focale + nucléole	< 2 pour 10	f	oui	3	non	non	AKT1
M 255	I	meningothélial	4	pariétal	40	non	non	non	non	f	œdème seul	1	non	oui	
M 256	I	meningothélial et psammomateux	6	sphénoïde droit	80	non	non	non	< 1 pour 10	f	oui	1	non	oui	NF2
M 257	II	atypique	10	occipital	77	dure-mère	non	non	5 pour 10	f	non	1	non	oui	
M 258	I	méningothélial	3	suprasellaire	46	non	non	non	non	m	non	1	non	non	
M 260	I	méningothélial avec rares psammomes	2	inter-optique	86	non	non	non	non	f	non	1	non	non	TRAF7

Numéro de la tumeur	Grade OMS	Données histologiques	Ki67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Mitose	Sexe	Oedeme/effet de masse	Nb de tumeur	Récidive	Anomalie NF2	Mutation
M 261	I	méningothélial et sécrétoires	7	toît de l'orbite	57	dure-mère	non	inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	< 2 pour 10	f	non	1	non	non	TRAF7 + KLF4
M 263	I	méningothélial	3	canal optique	52	non	non	non	< 1 pour 10	f	non	1	non	non	TRAF7
M 264	I	angiomateux	1	temporal gauche	74	non	non	non	non	f	oui	1	non	non	
M 265	I	méningothélial avec quelques atypies	6	parasagittal-frontal gauche	46	dure-mère	non	inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	3 pour 10	f	non	1	non	oui	
M 266	I	transitionnel sécrétoire	3	angle ponto-cérébelleux droit	61	non	non	non	1 pour 10	f	oui	1	non	non	TRAF 7 + KLF4
M 267	II	atypique	17	pariétal parasagittal	72	dure-mère et épicroane	oui	inflexion lymphocytoïde à haut rapport N/c	8 pour 10	f	non	1	oui immédiate	non	NF2
M 269	I	fibroblastique	4	frontal	48	dure mère	non	non	non	f	non	1	non	oui	
M 270	II	atypique	7	pariétal droit	70	dure mère	non	éléments mononuclés inflammatoire et foyer hyper cellulaire	< 3 pour 10	m	non	1	non	oui	NF2
M 272	I	transitionnel avec quelques atypies	6	tubercule et antérieur frontal	31	non	non	non	< 2 pour 10	f	non	2	non	non	TRAF7 + AKT1
M 273	II	atypique	20	temporal gauche	84	non	non	inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	10 pour 10	f	non	1	oui après deux ans	non	NF2
M 275	I	méningothélial avec quelques atypies	7	sphéno orbitaire gauche	54	non	non	non	non	f	non	1	non	non	SMO
M 278	II	atypique	10	temporal droit	49	parenchyme et dure mère	non	inflexion lymphocytoïde	4 pour 10	m	oui	1	non	non	SMO
M 279	I	méningothélial avec quelques atypies	5	faux	63	non	oui	non	< 2 pour 10	f	œdème seul	1	non	non	
M 280	II	atypique	10	angle ponto-cérébelleux gauche	47	non	non	non	5 pour 10	f	non	1	non	oui	NF2 + SMARCB1
M 295	I	méningothélial	5	frontal	52	non	non	remaniment oedemateux + extravasation sanguine	non	f	non	1	non	non	
M332	I	meningothélial + psammomateux	2	olfactif	48	non	non	non	non	f	œdème perilesionnel discret	1	non	non	TRAF7 (VASI) + AKT1
M335	I	transitionnel + psammomateux	2	petro-clivo-caverneux-gauche	43	sinus caverneux, cavum de meckel	non	non	non	f	œdème pontique gauche	1	non	non	
M338	II	atypique	15	base du crane	74	sinus caverneux, cavum de meckel droit et clivus	oui	haut rapport n/c	4 pour 10	f	effet de masse tronc basilaire et mesencephale	1	oui après 18 ans	oui	NF2
M339	I	fibroblastique avec quelques atypies	7	cerebelleux	59	faible cortical	non	non	non	f	effet de masse 4 eme ventricule et cervelet	1	non	oui	NF2
M341	I	méningothélial	4	portion osseuse frontale	52	dure mère	non	non	non	m	non	1	non	non	TRAF7
M343	I	méningothélial	5	frontal-parasagittal	62	non	non	non	non	f	cerveau oedemateux	1	non	non	AKT1
M346	I	fibroblastique	2	suprasellaire de la voute	37	non	non	non	non	f	œdème suprasellaire	3	non	non	

Numéro de la tumeur	Grade OMS	Données histologiques	Ki67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Mitose	Sexe	Oedeme/effet de masse	Nb de tumeur	Récidive	Anomalie NF2	Mutation
M347-s	I	transitonnel	2	frontal	57	non	non	modéré	2 pour 10	f	non	3(méningiomasose)	non	non	
M347-v	I	transitonnel	2	suprasellaire	57	non	non	modéré	2 pour 10	f	non		non	non	
M356	I	méningothélial	7	fosse posterieur	43	non	non	non	1 pour 10	m	masse lobe cerebelleux	1	non	non	
M358	I	méningothélial	3	suprasellaire	46	non	non	non	non	m	non	1	non	non	PIK3CA
M359	I	fibroblastique	3	faux du cerveau	45	non	non	nucléoles marqués	1 pour 10	f	effet de masse 2 lobes frontaux	1	non	oui	NF2
M362	I	fibroblastique	3	fosse temporale	79	non	non	non	non	f	non	1	non	oui	NF2
M363	II	atypique	10	péto-clival gauche	77	non	non	haut rapport n/c+nucléole	2 pour 10	m	effet de masse 3 eme ventricule	1	non	non	NF2
M364	I	méningothélial	5	suprasellaire	80	nerf optique	non	petit nucléole	2 pour 10	f	non	1	non	non	TRAF7
M368	II	méningothélial atypique	10	plaque parietale gauche	77	cortical probable	non	gros noyau gros nucléole	4 pour 10	m	œdème cerveau alentour	?	non	non	NF2
M369	I	méningothélial	4	sinus caverneux	76	fissure orbitaire+foramen	non	non	1 pour 10	f	non	?	oui après 20 ans	non	
M370	I	méningothélial	3	apophyse clinoidienne antérieur	52	sinus caverneux et intra sellaire	non	non	1 pour 10	f	non	1	non	non	
M371	II	méningothélial atypique	8	frontal gauche	74	non	micro foyer	non	4 pour 10	m	oedeme perilesionnel marqué	1	non	non	NF2
M372	I	méningothélial	1	suprasellaire	47	sous arachnoïdien	non	non	1 pour 10	m	non	1	non	non	
M376	I	angiomateux/microkystique	7	golfe jugulaire gauche	63	non	oui	noyaux dystrophiques et nucléolés	1 pour 10	m	effet de masse bulbo pontique et œdème vasogénique	1	non	non	
M378	I	transitionnel + psammomateux	2	sous-dural extra-axial	67	parenchyme cerebral	non	non	1 pour 10	m	non	1	non	non	TRAF7+PIK3CA
M380	I	fibroblastique	5	suprasellaire	57	non	non	non	2 pour 10	f	non	1	non	oui	
M382	II	méningothélial atypique	12	frontal gauche	77	non	oui	nucléole marquée	2 pour 10	f	non	11(méningiomasose)	non	oui	NF2
M383	I	fibroblastique	3	cerebelleux	68	non	non	non	1 pour 10	m	effet de masse 4 eme ventricule +œdème perilesionnel	1	non	oui	NF2
M386	II	atypique	10	sinus caverneux gauche	33	parenchyme cérébral	non	nucléoles marqués	3 pour 10	f	non	1	non	non	
M387	I	fibroblastique transitionnel	6	frontal droit	79	intra osseux	non	non	non	f	effet de masse parenchyme adjacent	1	non	non	CDKN2B VASI
M388-1	II	atypique	7	ptériorial gauche	76	envahissement cortex fronto basal	non	non	2 pour 10	f	non	2	non	non	TRAF7
M388-2	II	atypique	8	suprasellaire	76	envahissement cortex fronto basal	non	non	2 pour 10	f	non		non	non	TRAF7+SOMO

Numéro de la tumeur	Grade OMS	Données histologiques	Ki67 %	Localisation	Age	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Mitose	Sexe	Oedème/effet de masse	Nb de tumeur	Récidive	Anomalie NF2	Mutation
M391	II	atypique	8	suprasellaire	75	non	non	haut rapport n/c	5 pour 10	f	non	1	non	oui	NF2
M393	I	fibroblastique	3	fosse postérieure	70	non	non	non	non	f	effet de masse 4 ^{eme} ventriculaire +œdème perilesionnel	1	non	oui	NF2
M394	III	méningothélial anaplasique	25	fronto-pariétal droit	72	non	oui	oui	20 pour 10	m	effet de masse engagement	1	non	non	
M398	I	fibroblastique	5	clinoidien droit	70	non	non	nucléoles marqués	3 pour 10	f	non	1	non	oui	NF2
M399	I	méningothélial	7	temporal droit	62	dure mère	non	non	non	m	effet de masse vallée sylvienne	1	non	oui	
M404	III	méningothélial anaplasique avec rares secteurs papillaires et rhabdoïdes	30	pariétal	88	non	non	oui	15 pour 10	m	œdème perilesionnel	1	non	non	NF2
M405	I	méningothélial	4	étage antérieur	61	non	non	non	non	m	non	1	non	non	
M407	I	méningothélial	5	ptérior	78	dure mère	non	nucléoles marqués	3 pour 10	f	non	1	non	non	CDKN2B VASI
M408	II	méningothélial-atypique	15	pariétéo-occipital-gauche	34	non	oui	non	4 pour 10	m	effet de masse sur la faux	1	non	non	
M409	III	anaplasique	40	basofrontal droit	83	non	oui	oui	34 pour 10	m	non	1	oui après 5 ans	non	NF2
M417	II	fibroblastique et psamomateux atypique	10	pariétal gauche	62	non	non	non	4 pour 10	f	discret effet de masse	1	non	oui	
M418	II	atypique	15	frontal parasagittal droit	60	non	oui	haut rapport n/c	6 pour 10	m	œdème et effet de masse cortex frontal	1	oui après 3 ans	non	NF2
M419	I	méningothélial et sécrétoire	7	clinioïde antérieur droite	54	non	non	non	non	f	effet de masse pedoncule cerebral droit et œdème perilesionnel	1	non	non	KLF4+TRAF7
M422	I	fibroblastique	8	faux du cerveau	46	non	non	non	non	f	discret effet de masse	1	non	oui	NF2
M423	I	méningothélial	4	inter-optique droit	48	non	non	non	1 pour 10	f	non	2	non	oui	TRAF7+SMO
M424	III	anaplasique	40	faux du cerveau	77	non	oui	nucléoles marqués	12 pour 10	m	non	1	oui après 6 ans	non	CDKN2B VASI

Tableau 2 : données cliniques, biologiques et anatomopathologiques de la cohorte

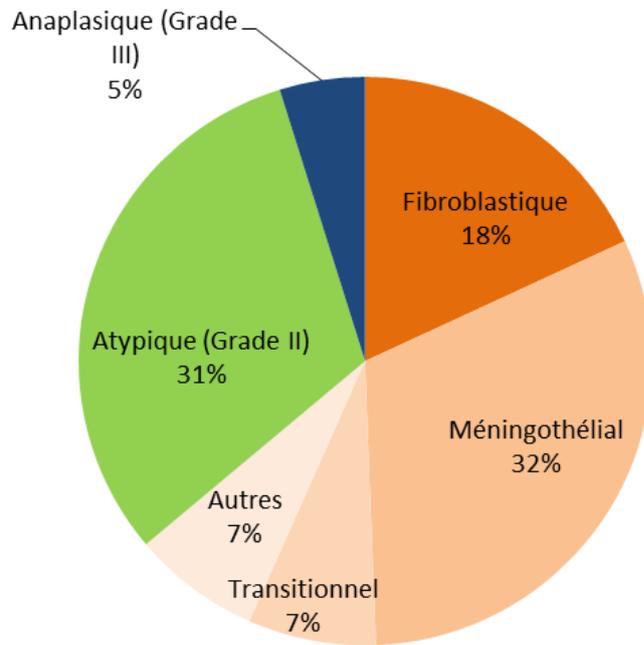


Figure 16 : répartition histologique des tumeurs

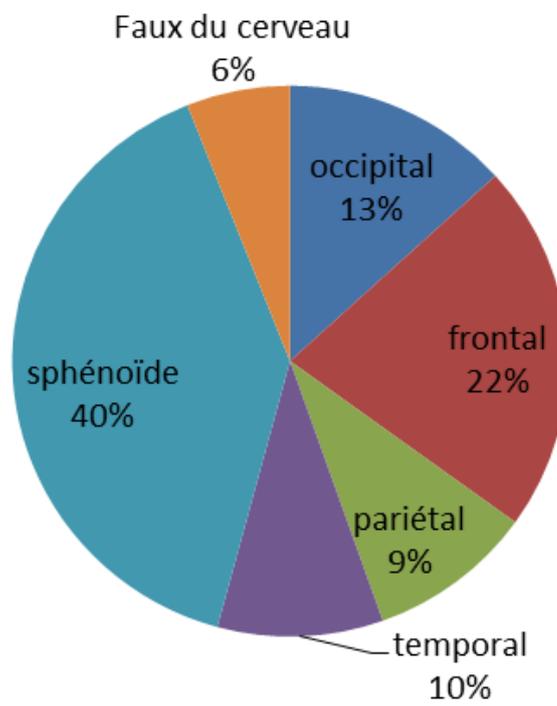


Figure 17 : répartition anatomique des tumeurs

3) Présentation des anomalies génétiques retrouvées dans la cohorte

- Aperçu général

La **Figure 18** donne un aperçu général des proportions des différentes mutations retrouvées au sein des 83 tumeurs. L'ensemble des mutations par tumeurs est consultable en annexe dans le **Tableau A2**.

Un résultat interprétable qui passait les filtres de qualité a été obtenu pour les 83 tumeurs analysées. 58 tumeurs de la cohorte comportent au moins une anomalie génétique et 29 comprennent au moins deux mutations. Parmi les 13 gènes testés de notre panel, nous n'avons pas retrouvé de mutation pour 6 d'entre eux (*TERT*, *SMARCE1*, *PTEN*, *SUFU*, *CDKN2A*, *CDKN2B*).

36 tumeurs comportent une anomalie sur le gène *NF2* : 29 ont un réarrangement de grande taille avec un CNV (copie number variation) et 25 ont une mutation sur le gène *NF2*.

16 tumeurs ont une mutation du gène *TRAF7* dont 10 en association avec d'autres mutations sur d'autres gènes (*KLF4*, *AKT1*, *SMO* et *PIK3CA*). Les 5 autres mutations isolées représentent une portion marginale.

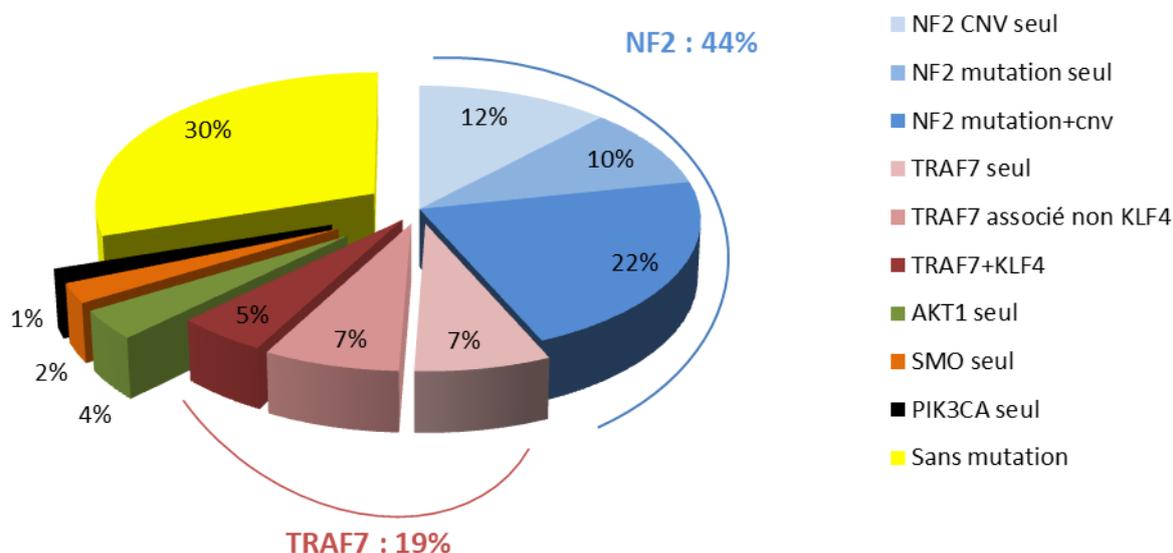


Figure 18 : répartition des anomalies génétiques au sein des 83 tumeurs.

- Mutations du gène *NF2*

Parmi les 25 tumeurs mutées sur le gène *NF2*, 18 ont conjointement un CNV. Toutes les mutations détectées conduisent à une protéine tronquée et ont de ce fait, été classées assez

aisément en variants pathogènes, d'autant que certains variants non-sens étaient déjà recensés sur la base de données COSMIC. On dénombre 26 anomalies (une des tumeurs comporte 2 mutations) : 13 délétions ou insertions de tailles diverses aboutissant à un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré, 8 mutations non-sens et 5 mutations dans les zones canoniques d'épissage.

22 de ces mutations sont situées sur la partie codant pour la portion FERM de la protéine, 6 sur la partie A, 9 sur la partie B et 6 sur la partie C. La partie codant pour l'hélice alpha est touchée par 5 mutations et le domaine C terminal n'est jamais touché dans notre cohorte (cf **Figure 6**).

- Mutations du gène *TRAF7*

Les mutations du gène *TRAF7* sont présentes dans 19% des tumeurs étudiées. Les 12 anomalies retrouvées sont systématiquement des mutations faux-sens. 4 mutations sont situées dans le domaine codant pour la portion enroulée de la protéine et 8 dans la partie WD40.

Toutes ces mutations ont déjà été rapportées par le passé dans diverses publications⁴⁸ (cf **Figure 8**), à l'exception de la mutation p.Gly375Asp (c.1124G>A) que nous reportons ici pour la première fois. Nous l'avons considérée comme étant un variant probablement pathogène du fait (i) de son absence dans les bases de contrôle de population (ii) de ses analyses in-silico la considérant comme délétère (iii) de sa présence dans un hot-spot mutationnel (fin de la portion enroulée de la protéine).

- Mutations des autres gènes

4 tumeurs sont mutées *KLF4* en association avec *TRAF7*. Nous retrouvons ici la seule mutation de *KLF4* connue et récurrente dans les méningiomes : p.Lys409Gln (c.1225A>C).

De même, 5 tumeurs sont mutées *AKT1*, 2 non associées et 3 en association avec *TRAF7*. Tout comme pour *KLF4*, la seule mutation connue et récurrente de *AKT1* pour les méningiomes est celle que nous retrouvons : p.Glu17Lys (c.49G>A).

S'agissant du gène *SMO*, 4 tumeurs portent une mutation dont 2 en association avec une mutation sur *TRAF7*. Les deux mutations faux sens retrouvées ici sont également les plus

fréquentes pour ce gène dans les méningiomes : p.Leu412Phe (c.1234C>T) et p.Trp535Leu (c.1604G>T).

Le gène *PIK3CA* est muté dans 4 tumeurs, 3 fois en association et une fois seul. Les 2 anomalies que nous trouvons dans ces tumeurs sont parmi les plus répandues pour ce gène dans les méningiomes et autres cancers, il s'agit des variants faux-sens : p.Glu545Lys (c.1633G>A) et p.His1047Arg (c.3140A>G)

Enfin, nous signalons une seule mutation sur le gène *SMARCB1*, elle est associée à une mutation du gène *NF2* et à la perte d'un allèle *NF2*. La mutation faux sens p.Arg386His (c.1157G>A) est différente de celles connues recensées dans les cas familiaux.

- Variants de signification inconnue (VASI)

Les trois variants suivants ont été considérés comme variants de signification inconnue pour les raisons suivantes :

- p.Arg103Lys du gène *CDKN2A*. 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 les bases de données GNOMAD et COSMIC.

- p.Asp86Asn du gène *CDKN2B*. Les analyses in silico du variant sont en faveur du caractère pathogène, mais ce variant est recensé dans la base de données GNOMAD (0,1% d'hétérozygote) et comporte sur Varsome un rapport de VASI.

-c.1012+5G>A du gène *TRAF7*. Ce variant n'a jamais été recensé dans la littérature ni dans la base de données GNOMAD. Les analyses in silico du variant sont contradictoires quant à l'effet de cette mutation sur l'épissage. Enfin, pour *TRAF7* aucune anomalie de l'épissage n'a jamais été décrite comme étant responsable d'une mutation pathogène.

Un variant du gène *SMO* : Pro647Ser a également été mis en évidence dans plusieurs tumeurs. Il a été classé précédemment en VASI, néanmoins compte tenu du fait qu'il existe dans la base de données GNOMAD 4 homozygotes sains et 0,5 % d'hétérozygote dans la population globale, nous avons décidé de le considérer comme probablement bénin.

II-Corrélation génotype-phénotype

Afin d'établir des liens statistiques entre le génotype des tumeurs et leurs manifestations phénotypiques, nous avons dressé un tableau synthétique, le **Tableau 3**, représentant la répartition des effectifs de la cohorte selon les données clinico-génétiques précédemment présentées dans le **Tableau 2**. Seuls, les variants pathogènes et probablement pathogènes ont été inclus dans ce tableau. Le **Tableau 3** prend en compte l'essentiel de ces données et permet d'effectuer aisément la plupart de nos tests statistiques.

Bien que l'effectif de notre cohorte reste relativement restreint pour obtenir des résultats interprétables sur les petits effectifs inférieurs à 5 (*SMO*, *PIK3CA*, *SMARCB1*,...), nous avons mis en lumière plusieurs corrélations génotypes-phénotypes statistiquement significatives. Les assertions présentées sont systématiquement considérées comme ayant un seuil de significativité $p < 0,05$ sauf indication contraire.

	Total	Avec mutation	Sans mutation	NF2CNV seul	NF2mut seul	NF2mut+cnv	NF2 tot	TRAF7 seul	TRAF7 associé non KLF4	TRAF7+KLF4	TRAF7 total	AKT1	PIK3CA	SMO	SMARCB1	
Sexe																
Homme	23	14	9	2	6	2	10	1	1	0	2	0	2	1	0	
Femme	60	44	16	8	2	16	26	5	5	4	14	5	2	3	1	
Total	83	58	25	10	8	18	36	6	6	4	16	5	4	4	1	
Age																
Moyenne	59,3	61,1	54,4	53,3	76,87	62,33	62,8	63,7	55,8	60,6	58,7	52,2	54,2	56,7	47	
Localisation																
Occipital	11	10	1	2	0	6	8	0	1	1	2	0	2	0	1	
Frontal	18	13	5	3	3	2	8	1	2	1	4	3	0	0	0	
Pariétal	8	7	1	2	3	1	6	0	0	0	0	1	0	0	0	
Temporal	8	5	3	1	1	1	3	1	0	0	1	0	0	1	0	
Sphénoïde	33	20	13	1	1	6	8	4	3	2	9	1	2	3	0	
Faux du cerveau	5	3	2	1	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
Histologie																
Grade I	53	34	19	6	0	11	17	5	3	4	12	4	3	2	0	
Fibroblastique	15	13	2	3	0	10	13	0	0	0	0	0	1	0	0	
Méningothélial	26	15	11	3	0	1	4	5	1	0	6	3	1	2	0	
Transitionnel	6	2	4	0	0	0	0	0	2	0	2	1	1	0	0	
Autres	6	4	2	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	
Grade II+III	30	24	6	4	8	7	19	1	3	0	4	1	1	2	1	
Ki67																
Moyenne	8,2	8,4	8,2	7,5	18,75	7,44	9,9	6,5	7,1	8	5,9	6,6	3	7,2	10	
Envahissement																
Oui	30	22	8	6	2	4	12	3	3	2	8	1	2	2	0	
Non	53	36	17	4	6	14	24	3	3	2	8	4	2	2	1	
Nécrose																
Oui	15	10	5	0	4	4	8	0	2	0	2	1	1	0	0	
Non	68	48	20	10	4	14	28	6	4	4	14	4	3	4	1	
Atypie cellulaire																
Oui	26	19	7	3	7	6	16	1	0	1	2	1	0	0	0	
Non	57	39	18	7	1	12	20	5	6	3	14	4	4	4	1	
Oedeme																
Oui	23	16	7	1	4	4	9	0	0	3	3	3	0	1	0	
Non	60	42	18	9	4	14	27	6	6	1	13	2	4	3	1	
Mitose																
>3 pour 10	22	18	4	3	7	5	15	0	2	0	2	1	1	1	1	
<=3 pour 10	61	40	21	7	1	13	21	6	4	4	14	4	3	3	0	
Tumeurs multiples																
Oui	11	9	2	1	0	3	4	1	3	0	3	2	0	1	0	
Non	72	49	23	9	8	15	32	5	3	4	13	3	4	3	1	
Récidive																
Oui	8	6	2	0	4	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	
Non	75	52	23	10	4	16	30	6	6	4	16	5	4	4	1	

Tableau 3 : tableau d'effectif clinico-génétique de la cohorte.

- Grades OMS et anomalies histologiques

Les tumeurs ayant une anomalie sur *NF2* (CNV ou mutation) sont corrélées à un grade OMS élevé (II et III) et à des anomalies cytologiques (mitoses élevées et atypies cellulaires) plus nombreuses que ce soit vis-à-vis de l'ensemble des autres tumeurs (17 tumeurs sur 53 de grade I ont un CNV ou une mutation *NF2*, 19 tumeurs sur 30 de grade II ou III ont un CNV ou une mutation *NF2*, $p=0,0058$). Un constat similaire a été fait en prenant cette fois-ci seulement les tumeurs mutées *NF2* vis-à-vis du reste des autres tumeurs (0 tumeur sur 53 de grade I ont une mutation *NF2* isolée, 8 tumeurs sur 30 de grade II ou III ont un CNV ou une mutation *NF2*, $p=0,0006$).

Il ressort de ces constats que les mutations sur *NF2* semblent encore plus agressives que les délétions du gène *NF2* (6 tumeurs de grade I ont un CNV *NF2*, 0 tumeur de grade I ont une mutation *NF2* isolée, 4 tumeurs de grade II ou III ont un CNV *NF2*, 8 tumeurs de grade II ou III ont une mutation *NF2* isolée, $p=0,0128$).

- Types histologiques

On observe une corrélation entre les tumeurs portant les mutations *NF2* et le type fibroblastique.

Le type méningothial est lui clairement corrélé aux mutations sur *TRAF7*, quelles soient isolées ou en association avec une mutation autre que *KLF4*. A contrario la combinaison de mutation *TRAF7+KLF4* est systématiquement associée au type sécrétoire dans notre cohorte (les 4 tumeurs mutées *TRAF7+KLF4* sont de type sécrétoire, aucune des 79 autres tumeurs de la cohorte n'est de ce type $p<0,0001$.)

- Envahissement, nécrose et œdème

Les mutations sur le gène *NF2* sont davantage associées à une nécrose que les autres mutations.

La combinaison de mutation sur les gènes *TRAF7* et *KLF4* est associée à un risque supérieur d'œdème. Ce constat est également effectué entre la mutation sur le gène *AKT1* et les œdèmes mais sans atteindre le seuil statistique fixé ($p=0,067$).

Enfin, nous observons un début d'association intéressante entre la présence d'une mutation sur *TRAF7* et l'envahissement mais une fois encore sans atteindre le seuil statistique nécessaire ($p=0,089$).

- Autres

Comme nous l'avons évoqué dans la partie bibliographique les méningiomes sont des tumeurs connues pour toucher d'avantage les femmes. Cette tendance s'inverse et reviens à l'équilibre pour les méningiomes de haut grade et tout particulièrement pour les méningiomes de haut grade muté *NF2* seul (6 hommes et 2 femmes sont mutés *NF2* seul, le reste de la cohorte étant composé de 17 hommes et 58 femmes $p=0,0049$).

Concernant la localisation anatomique et particulièrement la zone sphénoïde, nous observons une différence statistique significative entre les tumeurs mutées ou ayant un CNV sur le gène *NF2* et les autres mutations. En effet les tumeurs *NF2* sont bien moins fréquentes dans cette zone que les tumeurs des autres mutations.

Notre dernier constat concerne le risque de récurrence qui est corrélé positivement avec la présence d'une mutation *NF2* (4 patients en rechute et 4 patients sans rechute sont mutés isolément sur *NF2* pour le reste de la cohorte 4 patients sont en rechute et 71 patients sans rechute $p=0,0023$).

III-Comparaison avec les travaux des pairs

Nos résultats ont permis de dresser le profil mutationnel des méningiomes mais également d'établir des relations génotypes-phénotypes intéressantes pour le clinicien. Cependant notre étude comporte deux principales limites : (i) un nombre relativement faible de tumeurs dans la cohorte qui bride la puissance statistique de l'étude, particulièrement pour les mutations les moins nombreuses (*SMO*, *SMARCB1* et *PIK3CA*) ; (ii) Le fait de travailler sur un panel de gènes peut exclure de notre champ d'investigation certaines mutations, plus rares, pouvant avoir un impact sur le phénotype. Nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature permettant de sélectionner les mutations/gènes les plus fréquents

Nous comparons ici nos résultats bruts et nos corrélations statistiques, avec la représentation génétique brute obtenue dans la littérature, puis avec les corrélations statistiques qui en découlent.

1) Répartition des mutations et corrélation avec la nature des patients

- Répartition

Plusieurs revues ^{44,54,63,68,69} compilant des données d'articles relatives au séquençage d'exome de méningiomes par NGS, permettent d'obtenir la répartition des mutations génétiques exposée dans la **Figure 19**. Cette représentation donne les pourcentages moyens des mutations observées sur plusieurs séries, avec les intervalles suivants selon les publications : *NF2* 30 - 60 %, *TRAF7* 15 - 25 %, *AKT1* 6 - 12 %, *KLF4* 5 - 12 %, *SMO* 3 - 6 %, *PIK3CA* 3 - 7 % et *TERT* 2 - 6 %. Les mutations sur *CDKN2A*, *CDKN2*, *SUFU*, *SMARCE1* et *SMARCB1* sont également observées à des pourcentages beaucoup plus faibles (moins de 3 %). Certains gènes évoqués dans la première partie de cet ouvrage (*BAP1* et *PTCH1* notamment) sont eux très rarement retrouvés. Le cas particulier de *POLR2A* sera abordé plus tard dans cette thèse du fait de sa présence dans peu de publications.

Signalons enfin qu'un cinquième à un tiers des tumeurs, ne comporte pas de mutation ou du moins, pas de variant identifié comme pathogène en l'état actuel des connaissances.

D'une manière générale, environ 85 % du paysage mutationnel décrit des méningiomes est exploré par le séquençage de 7 gènes (*NF2*, *TRAF7*, *AKT1*, *KLF4*, *SMO*, *PIK3CA* et *TERT*), ce qui confirme la pertinence de notre panel de gènes.

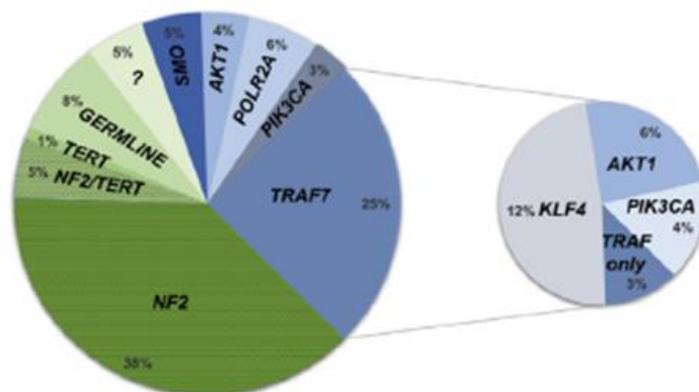


Figure 19 : répartition moyenne des anomalies génétiques des méningiomes d'après les données de la littérature⁶⁸.

On constate que la répartition des mutations observées dans la littérature est assez similaire à celle obtenue dans nos travaux. Il y a toutefois quelques différences qualitatives dans la mesure où nous n'avons pas observé, de mutation sur les gènes *TERT*, *CDKN2A*, *CDKN2*, *SUFU* et *SMARCE1*.

- Sex-ratio et âge

Nous constatons dans la littérature, tout comme dans notre cohorte, un sex ratio modifié (passant de 1/3 à 1/1) pour les tumeurs mutées *NF2* de grade II ou III. Il est également rapporté dans plusieurs travaux⁷⁰ un sex-ratio augmenté pour les tumeurs mutées *TRAF7+KLF4* (de 1/5 à 1/9) et *POLR2A* (1/4). Pour les autres mutations le sex ratio reste de 1/3.

Concernant les autres données liées à la nature du patient, il n'y a pas de corrélation particulière notamment avec l'âge des patients.

2) **Corrélations mutations / grade, récurrence et pronostic**

- Grade OMS

La **Figure 20** illustre le fait que la plupart des gènes fréquemment mutés dans les méningiomes sporadiques puissent être retrouvés à différents grades OMS, mais avec des probabilités différentes selon le gène impliqué. Néanmoins, il a été clairement établi que parmi les mutations les plus fréquentes (*NF2*, *TRAF7*, *AKT1*, *SMO*, *KLF4* et *PIK3CA*), seules les anomalies sur *NF2* sont clairement corrélées à un risque accru de développer une tumeur de grade II ou III. Ceci corrobore nos observations faites sur la cohorte de notre ouvrage. S'agissant des autres gènes fréquemment atteints, *TRAF7*, *AKT1*, *SMO* et *KLF4* semblent assez rarement impliqués dans les tumeurs de grades II et à plus forte raison III. En revanche, deux mutations de *PIK3CA* (Glu545Lys et His1047Arg)⁷¹ sont parfois retrouvées dans des tumeurs de grade II ou III, tandis que les autres mutations de ce gène ne le sont jamais.

Par ailleurs, la littérature met en évidence le rôle de certaines anomalies dans la progression tumorale. Ces anomalies interviennent en sus d'une anomalie déjà présente sur un des gènes majeurs comme *NF2*, *TRAF7* ou *PIK3CA* et leur présence est corrélée à une hausse du grade, que ce soit sur les tumeurs de novo ou bien sur les récurrences. Nous pouvons citer comme principaux exemples :

-Les mutations du gène *TERT* fréquemment associées à des anomalies *NF2* ou plus rarement *TRAF7*, sont clairement liées à une augmentation du grade tumoral. Ces mutations représentent respectivement 1.7%, 5.7%, et 20% des mutations retrouvées dans les grades I, II, et III⁴⁴.

-Les mutations *SMARCB1* et parfois *SMARCE1* lorsqu'elles sont associées à des anomalies concernant *NF2* dans les tumeurs sporadiques, sont corrélées quasi systématiquement à un grade II, comme dans le cas de la tumeur M280 de notre cohorte.

-Les différences de profil mutationnel entre le grade II et le grade III mettent en exergue l'importance du rajout de nouvelles anomalies, parmi lesquelles des altérations cytogénétiques ou bien des mutations dans les gènes *CDKN2A* et *CDKN2B*⁵⁴. Ces anomalies semblent se rajouter plus fréquemment aux tumeurs ayant déjà une anomalie sur le gène *NF2*.

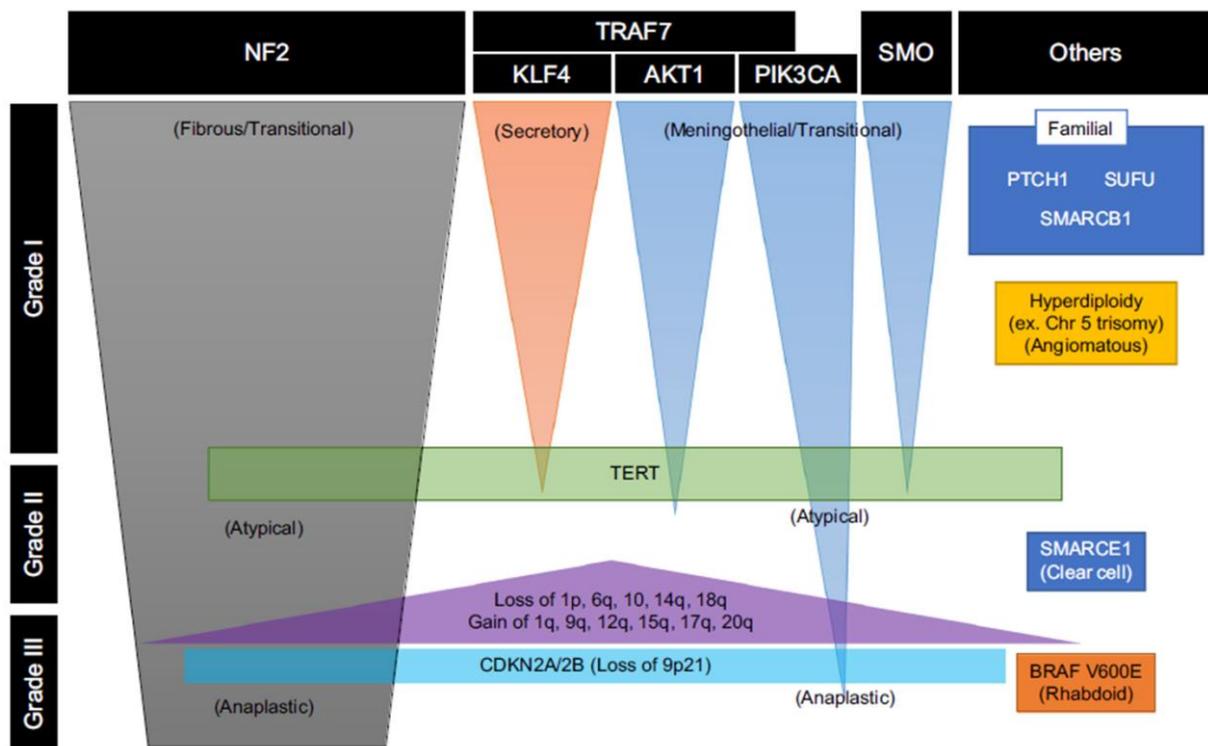


Figure 20 : grade OMS des méningiomes et anomalies génétiques⁵⁴ (Les flèches indiquent la présence de la mutation dans les tumeurs en fonction du grade et leurs largeurs indiquent la proportion de ces mutations au sein du grade.)

Il existe des mutations déterminant systématiquement le grade tumoral. Cela est dû au fait que la mutation détermine également le type histologique. C'est le cas des cancers familiaux impliquant *SMARCE1* qui sont de grade II et ceux impliquant *BAP1* ou *BRAF* qui

sont de grade III. Notons cependant que cette remarque s'applique également pour les cancers sporadiques notamment ceux impliquant *BAP1*⁵⁵.

- Récidive et pronostic

D'une manière générale nous allons retrouver des corrélations analogues à celles obtenues dans le paragraphe « grades OMS », cela était attendu car le grade est lié au pronostic, qui dépend lui-même en partie du risque de récurrence. Dans les cohortes de patients étudiées en NGS, la progression à 6 mois sans rechute est le principal facteur observé, la survie est moins souvent mise en avant car plus difficile à étudier.

Toutes les études constatent une diminution du temps de récurrence et une survie à 5 ans bien plus faible lorsque *NF2* est muté. Ce constat a également été fait dans l'étude de notre cohorte pour la récurrence. L'ajout d'anomalies supplémentaires *CDKN2A*, *CDKN2B*⁷², *TERT*, *SMARCB1* ou encore des délétions chromosomiques, amplifie encore cette diminution. Concernant les mutations du gène *TERT* elles sembleraient bien plus péjoratives dans le cas des récurrences, que sur les tumeurs de novo⁸⁷.

En revanche, les mutations sur *TRAF7*, *KLF4* ou *POLR2A* sont réputées peu récidivantes et de bon pronostic. Pour la mutation *AKT1*, il semble y avoir des discordances dans la littérature, certaines publications la décrivent comme modérément associée à la récurrence d'autres comme bénigne⁷³. Enfin, les mutations Leu412Phe du gène *SMO* et Glu545Lys et His1047Arg du gène *PIK3CA*, impliquent un risque de récurrence plus élevé et un pronostic moins bon que les autres mutations de ces gènes.

Pour les mutations à priori peu agressives affectant des tumeurs délicates à opérer car situées à la base du crâne, le pronostic sera plus réservé, du fait de la difficulté à obtenir une exérèse satisfaisante.

Il ressort concrètement de ces constats que le séquençage permet (i) d'adapter le suivi radiologique des patients les plus à risque de récurrence ; (ii) pour les patients aux pronostics les plus sombres de les orienter vers des essais thérapeutiques en adéquation avec les voies de signalisation susceptibles d'être corrompues.

3) Corrélations mutations / type histologique et localisation

- Type histologique

La revue de la littérature met en évidence des liens statistiques forts entre les gènes mutés et le type histologique de la tumeur.

Les anomalies sur le gène *NF2* conduisent à la formation de méningiomes fibroblastiques ou transitionnels le plus souvent, les anomalies cellulaires et la présence de nécrose y sont également plus fréquentes. Les mutations *POLR2A* et les mutations *TRAF7* prises isolément ou en association avec *AKT1* ou *SMO* sont généralement liées au type méningothélial. L'association de mutation sur *KLF4* et *TRAF7* est systématiquement retrouvée dans les méningiomes sécrétoires et est génératrice d'œdèmes⁷⁴. De la même façon les mutations *SMARCE1* sont quasi systématiquement à l'origine de méningiomes à cellule claire, tandis que les mutations *BAP1* engendrent des méningiomes rhabdoïdes⁶⁸.

Nous avons établi dans notre cohorte les mêmes conclusions pour les gènes *NF2*, *TRAF7* et *KLF4*.

- Localisation

Les corrélations entre le type de mutation et la localisation ont été difficiles à établir dans notre cohorte. Nous avons simplement démontré que les tumeurs mutées *NF2* étaient rarement situées sur la face antérieure de la base du crâne. Cependant, plusieurs travaux^{68,74,75,76,77} ont établi des corrélations poussées entre le type de mutation et la zone cérébrale concernée (Cf. **Figure 21**) :

-Les tumeurs mutées *NF2*, sont plutôt retrouvées dans la partie postérieure du cerveau et sur la convexité hémisphérique.

-Les anomalies *TRAF7*, *KLF4* et *PIK3CA* induisent des tumeurs sur la partie antérieure de la base du crâne.

-Les mutations *AKT1* et *SMO* sont liées à la fosse antérieure, voire au plancher olfactif dans le cas de *SMO*.

-Les méningiomes mutés *POLR2A* touchent la selle turcique.

-Les mutations *SMARCE1* induisent quasi systématiquement des méningiomes spinaux, tandis que les mutations *SMARCB1* sont surtout retrouvées dans la faux du cerveau.

-Les anomalies *BAP1* donnent des tumeurs situées dans la partie frontale de la convexité.

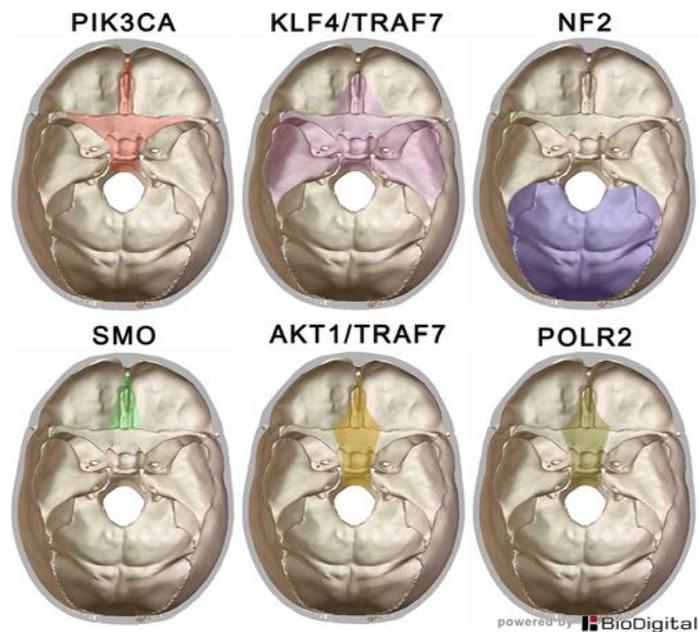


Figure 21 : localisation des tumeurs méningées en fonction des gènes mutés⁷⁵.

IV-Vers d'autres horizons en génétique moléculaire

Nos travaux, en adéquation avec l'ensemble de la littérature, ont démontré qu'il existait pour les méningiomes des liens génotypes-phénotypes suffisamment importants, pour présenter un intérêt clinique à leur séquençage post-exérèse chirurgicale.

A présent nous allons évoquer le futur de la recherche en génétique moléculaire, en nous concentrant sur 3 axes de réflexion : la poursuite des investigations par séquençage, le caractère prometteur du méthylome et le parti que nous pourrions tirer d'une biopsie liquide.

1) Recherche de nouvelles mutations impliquant de nouveaux gènes

Ces cinq dernières années sont marquées par une multiplication d'études par séquençage NGS des méningiomes. L'essentiel des mutations génétiques retrouvées dans la pathologie est situé sur un nombre restreint de gènes. Les corrélations génotypes-phénotypes commencent à être bien connues et les conclusions d'une étude à l'autre sont désormais souvent similaires.

Il reste cependant de 20 à 30% des méningiomes pour lesquels nous ne retrouvons aucune des mutations décrites à ce jour. Ce sont ces tumeurs pour lesquelles la marge de

progression en terme de recherche fondamentale par NGS, est la plus importante. L'ensemble des gènes susceptibles d'être impliqués dans l'oncogenèse des méningiomes, n'a probablement pas été totalement décrit.

Dorénavant et au vue de ces constats, l'objectif est de terminer de décrire le paysage mutationnel des méningiomes. Dans cette optique, le séquençage d'emblée en panel de gènes semble trouver ses limites. La stratégie de recherche par séquençage NGS du génome devrait fonctionner en deux étapes : (i) généraliser le séquençage d'exomes ou de génomes sur de petits échantillons, afin de repérer d'éventuels nouveaux gènes et mutations suspects ; (ii) inclure les gènes suspects ainsi repérés dans un séquençage sur panel de gènes appliqué à un nombre d'échantillons plus important.

L'exemple récent de l'implication de *POLR2A* dans la maladie, permet d'illustrer la pertinence de cette stratégie en deux temps. Le rôle du gène dans les méningiomes fut découvert en 2016⁶¹ avec un séquençage d'exome sur une cohorte. Une seconde étude de 2019⁷⁴ utilisant cette fois le séquençage sur un panel de gènes incluant *POLR2A*, a permis de confirmer que ce gène était muté dans 5% des méningiomes. La cohorte de la seconde étude étant 4 fois plus grosse que la première, des liens génotypes-phénotypes caractéristiques ont également été établis.

2) Le méthylome

L'étude du méthylome des méningiomes est un domaine relativement récent et prometteur. Dans un premier temps il a été démontré qu'environ 70 % des méningiomes avaient au moins un gène régulateur méthylé et 25% plusieurs gènes méthylés⁶⁴. Plus récemment, un lien a été établi dans les tumeurs de grade I, entre les probabilités de récurrence et le nombre ainsi que le type de gènes méthylés. Les tumeurs à priori de bas grade contenant au moins 3 gènes régulateurs méthylés, sont en fait plus agressives qu'escompté⁷⁸.

Une autre partie des études s'intéresse davantage au taux global de gènes méthylés. Leur but est de corréliser l'ensemble des données du méthylome complet avec l'évolution clinique de la maladie, afin d'en tirer une classification pronostique plus pertinente que l'actuelle classification OMS.

L'article de Olar *et al.*⁷⁹ a le premier tenté d'établir une classification basée sur les anomalies du méthylome corrélées avec le risque de rechute. Cette classification en deux groupes permet de déceler les méningiomes potentiellement récidivants.

La dernière étude en date de ce type⁸⁰, a mis en place un indice composite basé entre autre, sur le taux d'anomalie du méthylome et le grade d'exérèse chirurgicale de Simpson. Pour les patients, cet indice s'avère statistiquement plus efficace dans la prédiction du risque de rechute que le grade OMS.

Nous terminerons ce tour d'horizon des travaux récents avec la publication de Sahm *et al.*⁸¹. Les auteurs ont créé à partir de l'étude du méthylome d'une cohorte de près de 500 tumeurs, une classification reliant le profil épigénétique avec la survie sans rechute. Cette classification illustrée par la **Figure 22**, comporte 2 grands ensembles pronostiques (bénin et malin). Chacun des ensembles est lui-même divisé en un total de 6 sous-ensembles au sein desquels le risque de rechute augmente crescendo.

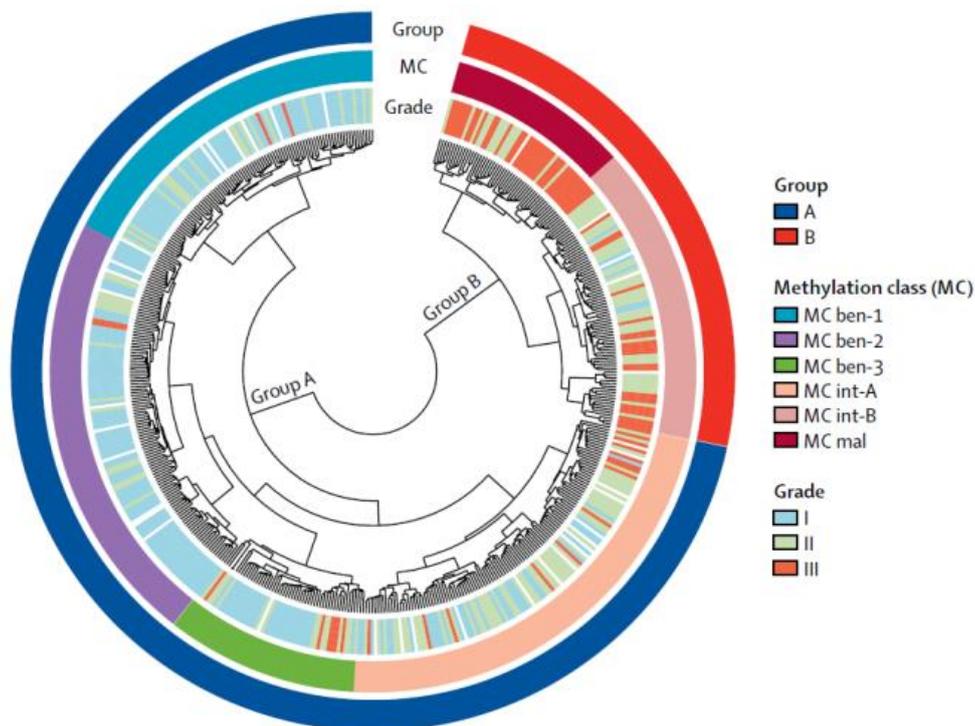


Figure 22 : répartition de 497 méningiomes selon leur profil épigénétique d'après l'étude de Sahm *et al.*⁸¹. (Le grade OMS des méningiomes est indiqué, la répartition se fait en deux grands ensembles subdivisés en 6 sous ensemble. L'ensemble B et le sous ensemble « MC mal » comportent les méningiomes les plus agressifs.

Il ressort de cette étude une classification qui s'avère beaucoup plus précise que le grade OMS pour prédire le risque de rechute. On s'aperçoit, comme l'ont pressenti de nombreux auteurs auparavant, que certains méningiomes de grade I sont plus agressifs que prévu tandis que d'autres de haut grade comme les rhabdoïdes, sont de meilleur pronostic que le grade ne le laisse supposer.

In fine, les résultats de ces études témoignent du réel potentiel du méthylome dans l'aide à la décision et au suivi pour le clinicien. Il semble opportun désormais d'investir ce pan de la recherche en génétique moléculaire sur les méningiomes.

3) La biopsie liquide

La biopsie liquide désigne toute analyse permettant d'obtenir une information sur une tumeur solide à partir d'un prélèvement liquide. Dans des conditions idéales elle permet l'étude du génotype tumoral par une analyse de l'ADN tumoral circulant. Cela présente de nombreux avantages en comparaison avec une biopsie tissulaire classique : prélèvements peu invasifs, pouvant être répétés dans le temps et représentatifs de la tumeur en s'affranchissant de l'hétérogénéité tumorale. Ce type de technique a déjà démontré son utilité dans des cancers solides touchant par exemples les poumons ou le pancréas^{82,83}. Les inconvénients principaux sont la faible sensibilité des techniques (plusieurs tumeurs ne libèrent pas ou peu d'ADN circulant et la demi-vie plasmatique n'est que de 2 heures) et leur faible disponibilité associée à un coût élevé⁸⁴.

Comme nous l'avons vu tout au long de nos travaux de thèse, le séquençage des méningiomes peut fournir beaucoup d'informations, dont une bonne partie est redondante avec l'histologie. Pour ces tumeurs intracrâniennes pour lesquelles la chirurgie n'est pas toujours possible, on perçoit les bénéfices que nous pourrions tirer de la biopsie liquide. Tout en évitant au patient une chirurgie comportant de nombreux risques, nous pourrions avoir accès au type histologique du méningiome, ainsi qu'à d'autres éléments pronostiques. Avec ces informations, le clinicien pourrait plus facilement décider de la prise en charge thérapeutique (chirurgie ou abstention, quelle dose de radiothérapie prévoir par rapport à l'agressivité de la tumeur et aux risques de rechute, etc...).

Actuellement nous pouvons recenser plusieurs tentatives pour mener à bien une biopsie liquide des méningiomes. Au sein de notre laboratoire, le Docteur Basset a tenté au

cours de ses travaux de thèse de réaliser des biopsies liquides sur sang circulant de méningiomes de grades divers. Les résultats sont prometteurs et montrent la possibilité de détecter de l'ADN tumoral circulant pour les méningiomes les plus agressifs. Des travaux plus récents de diverses équipes ont démontré trois faits. Tout d'abord la biopsie liquide est envisageable pour l'étude du méthylome⁸⁵ et permet donc l'accès aux perspectives en matière de pronostic que nous avons déjà évoqué. Ensuite, pour les tumeurs intracrâniennes, les biopsies liquides sur le liquide cébrospinal sont non seulement possibles, mais semblent également plus sensibles que celles effectuées sur sang circulant⁸⁶. Notre équipe a montré la possibilité de détecter de l'ADN tumoral circulant à partir du LCR de patients porteurs de méningiomes.

Ces observations sont encourageantes et nous incitent à désigner la biopsie liquide, comme l'un des axes majeurs de la recherche en biologie moléculaire appliquée aux méningiomes. L'effort apporté à l'amélioration de la sensibilité des techniques, pourrait aboutir à une amélioration franche des capacités diagnostiques non invasives.

Conclusion et perspectives

Les méningiomes font partie des tumeurs intracrâniennes les plus répandues en France. La maladie est souvent bénigne, mais dans certains cas le pronostic reste péjoratif.

Nous avons séquencé par NGS, 83 méningiomes issus d'une cohorte de 81 patients, afin d'atteindre les deux objectifs de nos travaux de thèse :

- Avoir une meilleure connaissance fondamentale des mutations impliquées dans la maladie.
- Etablir des corrélations génotypes-phénotypes mettant en exergue le parti que le clinicien pourrait tirer d'une analyse de la tumeur en biologie moléculaire.

Durant la première partie, nous avons proposé une synthèse bibliographique des méningiomes en abordant dans un premier temps les aspects physiopathologiques, épidémiologiques, histologiques, diagnostiques et thérapeutiques de la pathologie.

Par la suite nous nous sommes focalisés sur les anomalies génétiques connues en évoquant également les aspects cytogénétiques et épigénétiques.

Nous avons terminé cette partie en présentant le matériel tumoral et la méthodologie d'analyse afférente à nos travaux.

La seconde partie, commence par la présentation de nos résultats. Sur 83 tumeurs séquencées, les anomalies génétiques concernent 70 % des échantillons et sont réparties de la façon suivante : *NF2* 44 %, *TRAF7* 19 %, *AKT1* 6 %, *SMO* 5 %, *PIK3CA* 5 %, *KLF4* 5 % et *SMARCB1* 1 %.

Nous avons démontré plusieurs liens statistiques entre les anomalies du génome et la clinique des patients, notamment les liens entre (i) *NF2* et les grades OMS élevés, le risque de récurrence, les types histologiques fibroblastique et transitionnel ; (ii) *TRAF7+KLF4* et le grade I OMS, le type sécrétoire et la présence d'oedème.

L'ensemble de nos résultats et corrélations a été confronté à ceux de la littérature. Globalement les constats issus de nos travaux sont en adéquation avec ceux de nos pairs.

Enfin, nous avons défini les futurs axes de recherche qui nous semblent les plus prometteurs : le méthylome, la biopsie liquide notamment sur le liquide cébrospinal et

l'extension de la technique NGS à l'exome, bien que ce dernier axe risque d'être matériellement assez coûteux.

En bref nos travaux de thèse sur les méningiomes ont permis :

- La mise en évidence de corrélations génotypes-phénotypes, démontrant l'intérêt clinique d'un séquençage NGS des tumeurs opérées.
- Une meilleure connaissance du paysage mutationnel de ces tumeurs.
- De situer nos travaux au sein du domaine de recherche afin de mieux définir nos futures investigations.

Références bibliographiques

1. Histologie. *De Boeck Supérieur*
<https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804156923-histologie> (2020).
2. Les méningiomes - Campus de Neurochirurgie.
<http://campus.neurochirurgie.fr/spip.php?article367>.
3. *Primary Central Nervous System Tumors: Pathogenesis and Therapy*. (Humana Press, 2011). doi:10.1007/978-1-60761-166-0.
4. Whittle, I. R., Smith, C., Navoo, P. & Collie, D. Meningiomas. *The Lancet* **363**, 1535–1543 (2004).
5. Brodbelt, A. R. *et al.* The outcome of patients with surgically treated meningioma in England: 1999–2013. A cancer registry data analysis. *Br. J. Neurosurg.* **33**, 641–647 (2019).
6. Ah-Pine, F. & Rousseau, A. Tumeurs primitives du système nerveux central - Classifications histologique et topographique, et épidémiologie. *Datatraitesne17-83172* (2018).
7. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131**, 803–820 (2016).
8. Harter, P. N., Braun, Y. & Plate, K. H. Classification of meningiomas—advances and controversies. *Chin. Clin. Oncol.* **6**, 3 (2017).
9. Vaubel, R. A. *et al.* Meningiomas With Rhabdoid Features Lacking Other Histologic Features of Malignancy: A Study of 44 Cases and Review of the Literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 44–52 (2016).

10. Champeaux, C., Weller, J. & Katsahian, S. Epidemiology of meningiomas. A nationwide study of surgically treated tumours on French medico-administrative data. *Cancer Epidemiol.* **58**, 63–70 (2019).
11. Anzalone, C. L., Glasgow, A. E., Van Gompel, J. J. & Carlson, M. L. Racial Differences in Disease Presentation and Management of Intracranial Meningioma. *J. Neurol. Surg. Part B Skull Base* **80**, 555–561 (2019).
12. Baldi, I. *et al.* Epidemiology of meningiomas. *Neurochirurgie* **64**, 5–14 (2018).
13. Buerki, R. A. *et al.* An overview of meningiomas. *Future Oncol.* **14**, 2161–2177 (2018).
14. Masalha, W. *et al.* Survival and Prognostic Predictors of Anaplastic Meningiomas. *World Neurosurg.* **131**, e321–e328 (2019).
15. Magill, S. T. *et al.* Relationship between tumor location, size, and WHO grade in meningioma. *Neurosurg. Focus* **44**, E4 (2018).
16. Kessler, R. A. *et al.* Metastatic Atypical and Anaplastic Meningioma: A Case Series and Review of the Literature. *World Neurosurg.* **101**, 47–56 (2017).
17. Goldbrunner, R. *et al.* EANO guidelines for the diagnosis and treatment of meningiomas. *Lancet Oncol.* **17**, e383–e391 (2016).
18. Lilo, T. *et al.* Spectrochemical differentiation of meningioma tumours based on attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* (2019) doi:10.1007/s00216-019-02332-w.
19. Nowosielski, M. *et al.* Diagnostic challenges in meningioma. *Neuro-Oncol.* **19**, 1588–1598 (2017).
20. Li, J., Liang, R., Song, C., Xiang, Y. & Liu, Y. Prognostic Value of Ki-67/MIB-1 Expression in Meningioma Patients: A Meta-Analysis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **29**, 141–150 (2019).

21. Bečulić, H. Correlation of Peritumoral Brain Edema with Morphological Characteristics and Ki67 Proliferative Index in Resected Intracranial Meningiomas. *Acta Clin. Croat.* (2019) doi:10.20471/acc.2019.58.01.06.
22. Graillon, T. *et al.* Octreotide therapy in meningiomas: in vitro study, clinical correlation, and literature review. *J. Neurosurg.* **127**, 660–669 (2017).
23. Dijkstra, B. M., Jeltema, H.-R., Kruijff, S. & Groen, R. J. M. The application of fluorescence techniques in meningioma surgery—a review. *Neurosurg. Rev.* **42**, 799–809 (2019).
24. Ding, Y.-S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in human meningiomas and peritumoral brain areas. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **38**, 344–351 (2008).
25. Bi, W. L. & Dunn, I. F. Current and emerging principles in surgery for meningioma. *Chin. Clin. Oncol.* **6**, S7–S7 (2017).
26. Wang, N. & Osswald, M. Meningiomas: Overview and New Directions in Therapy. *Semin. Neurol.* **38**, 112–120 (2018).
27. Lemée, J.-M., Corniola, M. V. & Meling, T. R. Benefits of re-do surgery for recurrent intracranial meningiomas. *Sci. Rep.* **10**, 303 (2020).
28. Rapport HAS-Tome 1 : les méningiomes
https://www.has.sante.fr/upload/docs/application/pdf/201112/rapport__tome_i_radiotherapie_meningiomes.pdf
29. Nigim, F., Wakimoto, H., Kasper, E., Ackermans, L. & Temel, Y. Emerging Medical Treatments for Meningioma in the Molecular Era. *Biomedicines* **6**, 86 (2018).
30. Kaley, T. *et al.* Historical benchmarks for medical therapy trials in surgery- and radiation-refractory meningioma: a RANO review. *Neuro-Oncol.* **16**, 829–840 (2014).
31. Franke, A. *et al.* Role of bevacizumab for treatment-refractory meningiomas: A systematic analysis and literature review. *Surg. Neurol. Int.* **9**, 133 (2018).

32. Graillon, T. *et al.* Pasireotide is more effective than octreotide, alone or combined with everolimus on human meningioma *in vitro*. *Oncotarget* **8**, (2017).
33. Ji, Y. *et al.* Double-Blind Phase III Randomized Trial of the Antiprogestin Agent Mifepristone in the Treatment of Unresectable Meningioma: SWOG S9005. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 4093–4098 (2015).
34. Venur, V. A., Santagata, S., Galanis, E. & Brastianos, P. K. New molecular targets in meningiomas: the present and the future. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 740–746 (2018).
35. Juric, D. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase α -Selective Inhibition With Alpelisib (BYL719) in *PIK3CA* -Altered Solid Tumors: Results From the First-in-Human Study. *J. Clin. Oncol.* **36**, 1291–1299 (2018).
36. Graillon, T. *et al.* Everolimus and Octreotide for Patients with Recurrent Meningioma: Results from the Phase II CEVOREM Trial. *Clin. Cancer Res.* **26**, 552–557 (2020).
37. Ardern-Holmes, S., Fisher, G. & North, K. Neurofibromatosis Type 2. *J. Child Neurol.* **32**, 9–22 (2017).
38. Smith, M. J. *et al.* Loss-of-function mutations in SMARCE1 cause an inherited disorder of multiple spinal meningiomas. *Nat. Genet.* **45**, 295–298 (2013).
39. Christiaans, I. *et al.* Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *J. Med. Genet.* **48**, 93–97 (2011).
40. Hidden association of Cowden syndrome, PTEN mutation and meningioma frequency. *Oncoscience* 149 (2016) doi:10.18632/oncoscience.305.
41. Chau, C. *et al.* Families with BAP1-Tumor Predisposition Syndrome in The Netherlands: Path to Identification and a Proposal for Genetic Screening Guidelines. *Cancers* **11**, (2019).

42. Askaner, G., Lei, U., Bertelsen, B., Venzo, A. & Wadt, K. Novel *SUFU* Frameshift Variant Leading to Meningioma in Three Generations in a Family with Gorlin Syndrome. *Case Rep. Genet.* **2019**, 1–5 (2019).
43. Bi, W. L., Prabhu, V. C. & Dunn, I. F. High-grade meningiomas: biology and implications. *Neurosurg. Focus* **44**, E2 (2018).
44. Lee, Y. S. & Lee, Y. S. Molecular characteristics of meningiomas. *J. Pathol. Transl. Med.* **54**, 45–63 (2020).
45. Petrilli, A. M. & Fernández-Valle, C. Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* **35**, 537–548 (2016).
46. Lee, S. *et al.* The Role of Merlin/NF2 Loss in Meningioma Biology. *Cancers* **11**, 1633 (2019).
47. Clark, V. E. *et al.* Genomic Analysis of Non-NF2 Meningiomas Reveals Mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* **339**, 1077–1080 (2013).
48. Zotti, T., Scudiero, I., Vito, P. & Stilo, R. The Emerging Role of TRAF7 in Tumor Development: TRAF7 IN TUMOR DEVELOPMENT. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1233–1238 (2017).
49. Xie, P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J. Mol. Signal.* **8**, Art. 7 (2013).
50. Tang, H. *et al.* KLF4 is a tumor suppressor in anaplastic meningioma stem-like cells and human meningiomas. *J. Mol. Cell Biol.* **9**, 315–324 (2017).
51. Chalhoub, N. & Baker, S. J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 127–150 (2009).
52. Jia, Y., Wang, Y. & Xie, J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch. Toxicol.* **89**, 179–191 (2015).

53. Boetto, J., Bielle, F., Sanson, M., Peyre, M. & Kalamarides, M. SMO mutation status defines a distinct and frequent molecular subgroup in olfactory groove meningiomas. *Neuro-Oncol.* **19**, 345–351 (2017).
54. Yuzawa, S., Nishihara, H. & Tanaka, S. Genetic landscape of meningioma. *Brain Tumor Pathol.* **33**, 237–247 (2016).
55. Kerr, K., Qualmann, K., Esquenazi, Y., Hagan, J. & Kim, D. H. Familial Syndromes Involving Meningiomas Provide Mechanistic Insight Into Sporadic Disease. *Neurosurgery* (2018) doi:10.1093/neuros/nyy121.
56. Couvé, S., Bouadjar, B., Avril, M., Sarasin, A. & Daya-Grosjean, L. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothed gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.* **62**, 7186–9 (2003).
57. Biczok, A. *et al.* TERT promoter mutation is associated with worse prognosis in WHO grade II and III meningiomas. *J. Neurooncol.* **139**, 671–678 (2018).
58. Guyot, A. *et al.* Analysis of CDKN2A gene alterations in recurrent and non-recurrent meningioma. *J. Neurooncol.* **145**, 449–459 (2019).
59. Boström, J. *et al.* Alterations of the Tumor Suppressor Genes CDKN2A (p16INK4a), p14ARF, CDKN2B (p15INK4b), and CDKN2C (p18INK4c) in Atypical and Anaplastic Meningiomas. *Am. J. Pathol.* **159**, 661–669 (2001).
60. Pereira, B. J. A., Oba-Shinjo, S. M., de Almeida, A. N. & Marie, S. K. N. Molecular alterations in meningiomas: Literature review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **176**, 89–96 (2019).
61. Clark, V. E. *et al.* Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. *Nat. Genet.* **48**, 1253–1259 (2016).

62. Next generation sequencing identifies novel potential actionable mutations for grade I meningioma treatment. *Histol. Histopathol.* 1 (2019) doi:10.14670/HH-18-195.
63. Suppiah, S. *et al.* Molecular and translational advances in meningiomas. *Neuro-Oncol.* **21**, i4–i17 (2019).
64. He, S. *et al.* A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg. Focus* **35**, E5 (2013).
65. Kamps, R. *et al.* Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
66. Yohe, S. & Thyagarajan, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **141**, 1544–1557 (2017).
67. Xu, C., Nezami Ranjbar, M. R., Wu, Z., DiCarlo, J. & Wang, Y. Detecting very low allele fraction variants using targeted DNA sequencing and a novel molecular barcode-aware variant caller. *BMC Genomics* **18**, 5 (2017).
68. Proctor, D. T., Ramachandran, S., Lama, S. & Sutherland, G. R. Towards Molecular Classification of Meningioma: Evolving Treatment and Diagnostic Paradigms. *World Neurosurg.* **119**, 366–373 (2018).
69. Al-Rashed, M., Foshay, K. & Abedalthagafi, M. Recent Advances in Meningioma Immunogenetics. *Front. Oncol.* **9**, 1472 (2020).
70. Reuss, D. E. *et al.* Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **125**, 351–358 (2013).
71. Abedalthagafi, M. *et al.* Oncogenic PI3K mutations are as common as *AKT1* and *SMO* mutations in meningioma. *Neuro-Oncol.* **18**, 649–655 (2016).
72. Domingo-Arrué, B. *et al.* Molecular progression in unusual recurrent non-pediatric intracranial clear cell meningioma. *Curr. Oncol.* **24**, 244 (2017).

73. 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.* **19**, 1088–1096 (2017).
74. Youngblood, M. *et al.* Correlations between genomic subgroup and clinical features in a cohort of more than 3000 meningiomas. *J. Neurosurg.* 1–10 (2019)
doi:10.3171/2019.8.JNS191266.
75. Karsy, M. *et al.* Clinical potential of meningioma genomic insights: a practical review for neurosurgeons. *Neurosurg. Focus* **44**, E10 (2018).
76. Preusser, M., Brastianos, P. K. & Mawrin, C. Advances in meningioma genetics: novel therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 106–115 (2018).
77. Smith, M. J. *et al.* Germline SMARCE1 mutations predispose to both spinal and cranial clear cell meningiomas. *J. Pathol.* **234**, 436–440 (2014).
78. San-Miguel, T. *et al.* Epigenetic changes underlie the aggressiveness of histologically benign meningiomas that recur. *Hum. Pathol.* **84**, 105–114 (2019).
79. Olar, A. *et al.* Global epigenetic profiling identifies methylation subgroups associated with recurrence-free survival in meningioma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **133**, 431–444 (2017).
80. Nassiri, F. *et al.* DNA methylation profiling to predict recurrence risk in meningioma: development and validation of a nomogram to optimize clinical management. *Neuro-Oncol.* **21**, 901–910 (2019).
81. Sahm, F. *et al.* DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **18**, 682–694 (2017).
82. Pietrasz, D. *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. *Bull. Cancer (Paris)* **103**, 55–65 (2016).

83. Cheng, F., Su, L. & Qian, C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget* **7**, (2016).
84. Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. & Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 531–548 (2017).
85. Shen, S. Y. *et al.* Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature* **563**, 579–583 (2018).
86. De Mattos-Arruda, L. *et al.* Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
87. Peyre, M. *et al.* De novo and secondary anaplastic meningiomas: a study of clinical and histomolecular prognostic factors. *Neuro oncol.* **20**, 1113-1121 (2018).

Annexes

Paramètres	Seq 1	Seq 2	Seq 3	Seq 4	Seq 5	seq6	seq7	Valeurs attendues recommandées par Illumina
% de cluster passant le filtre (PF)	88,09	82,11	96,18	92,01	90,05	94,91	96,71	supérieur à 87%
Densité de clusters	1441	1527	793	1128	1082	886	731	900k/mm2 +/- 600 k/mm2
%>= Q30 Read 1	93,21	93,01	97,49	93,42	86,56	96,7	98,03	supérieur à 90 %
%>= Q30 Read 4	88,07	86,4	94	84,28	62,99	90,67	92,56	supérieur à 85 %
Score qualite moyen sur le sequencage (%)	90,8	89,7	95,7	89,03	75,4	93,8	95,33	supérieur à 87 %
Nombre d'échantillons	15	16	14	12	12	12	11	

Tableau A1 : paramètres de validation technique de l'analyse primaire des données NGS issu du Miseq d'Illumina

Numéro de la tumeur	CNV NF2	Gène et mutation 1	Gène et mutation 2
M 22	oui		
M 24	non	TRAF7 (c.1862A>G / p.tyr621Cys)	
M 25	non		
M 55	oui		
M 58	non		
M 74	non		
M 86	non	TRAF7 (c.1189G>C / p.Gly397Arg)	KLF4 (c.1225A>C / p.Lys409Gln)
M 163	non		
M 164	non	AKT1 (c.49G>A / p.Glu17Lys)	TRAF7 (c.1843A>G / p.Lys615Glu)
M 165	oui		
M 189	oui	NF2 (c.517-2A>G)	
M 244	oui	NF2 (c.380_388del / p.Leu127_Lys130delinsTer)	
M 245	non	TRAF7 (c.1124G>A / p.Gly375Asp)	PIK3CA (c.1633G>A / p.Glu545Lys)
M 246	oui	PIK3CA (c.1633G>A / p.Glu545Lys)	NF2 (c.94G>T / p.Glu32Ter)
M 251	oui	NF2 (c.481G>T / p.Gly161Ter)	NF2 (c.1036delA / p.Arg346GlyfsTer18)
M 252	oui	NF2 (c.500delA / p.Glu167AspfsTer7)	
M 253	non		
M 254	non	AKT1 (c.49G>A / p.Glu17Lys)	
M 255	oui		
M 256	oui	NF2 (c.139delT / p.Phe47LeufsTer76)	
M 257	oui		
M 258	non		
M 260	non	TRAF7 (c.1606G>A / p.Gly536Ser)	
M 261	non	TRAF7 (c.1675G>T / p.Gly559Cys)	KLF4 (c.1225A>C / p.Lys409Gln)
M 263	non	TRAF7 (c.1911G>C / p.Gln637His)	
M 264	non		
M 265	oui		
M 266	non	TRAF7 (c.1559A>G / p.Asn520Ser)	KLF4 (c.1225A>C / p.Lys409Gln)
M 267	non	NF2 (c.852_853insT / p.Asn286Ter)	
M 269	oui		
M 270	oui	NF2 (c.734delA / p.Asp245AlafsTer6)	
M 272	non	AKT1 (c.49G>A / p.Glu17Lys)	TRAF7 (c.1911G>C / p.Gln637His)
M 273	non	NF2 (c.448-1G>A)	
M 275	non	SMO (c.1234C>T / p.Leu412Phe)	
M 278	non	SMO (c.1234C>T / p.Leu412Phe)	
M 279	non		
M 280	oui	SMARCB1 (c.1157G>A / P.Arg386His)	NF2 (c.447+1G>T)
M 295	non		
M332	non	AKT1 (c.49G>A / p.Glu17Lys)	TRAF7 (c.1922G>A / p.Arg641His)
M335	non		
M338	oui	NF2 (c.364-1G>A)	
M339	oui	NF2 (c.143_151delATTGGTGT / p.Asp48_Cys51delinsGly)	
M341	non	TRAF7 (c.1559A>G / p.Asn520Ser)	
M343	non	AKT1 (c.49G>A / p.Glu17Lys)	
M346	non		
M347-s	non		
M347-v	non		

Numéro de la tumeur	CNV NF2	Gène et mutation 1	Gène et mutation 2
M356	non		
M358	non	PIK3CA (c.3140A>G / p.His1047Arg)	
M359	oui	NF2 (c.1343_1347delCCAAinsT / p.Ala448fs)	
M362	oui	NF2 (c.666delT / p.Phe222fs)	
M363	non	NF2 (c.942_949delTTCTTTGG / p.Asp314fs)	
M364	non	TRAF7 (c.1168G>A / p.Gly390Arg)	
M368	non	NF2 (c.48delG / p.Lys17fs)	
M369	non		
M370	non		
M371	non	NF2 (c.389delA / p.Lys130fs)	
M372	non		
M376	non		
M378	non	TRAF7 (c.1172C>T / p.Thr391Ile)	PIK3CA (c.3140A>G / p.His1047Arg)
M380	oui		
M382	oui	NF2 (c.1021C>T / p.Arg341*)	
M383	oui	NF2 (c.784C>T / p.Arg262*)	
M386	non		
M387	non		
M388-1	non	TRAF7 (c.1293T>G / p.Cys431Trp)	
M388-2	non	TRAF7 (c.1293T>G / p.Cys431Trp)	SMO (c.1604G>T / p.Trp535Leu)
M391	oui	NF2 (c.169C>T / p.Arg57*)	
M393	oui	NF2 (c.691G>T / p.Glu231*)	
M394	non		
M398	oui	NF2 (c.784C>T / p.Arg262*)	
M399	oui		
M404	non	NF2 (c.634C>T / p.Gln212*)	
M405	non		
M407	non		
M408	non		
M409	non	NF2 (c.363+3A>T)	
M417	oui		
M418	non	NF2 (c.28_29dupAG / p.Ser10fs)	
M419	non	TRAF7 (c.1922G>A / p.Arg641His)	KLF4 (c.1225A>C / p.Lys409Gln)
M422	oui	NF2 (c.1345A>T / p.Lys449*)	
M423	oui	TRAF7 (c.1293T>G / p.Cys431Trp)	SMO (c.1604G>T / p.Trp535Leu)
M424	non		

Tableau A2 : types de mutations et CNV sur *NF2* par tumeur.

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.